



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Comparação dos extratos aquoso e hidroalcólico das folhas de
Bauhinia holophylla (Bong.) Steud. quanto ao efeito
hipoglicemiante, com vistas à produção de medicamento
fitoterápico

Aislan Quintiliano Delgado

BOTUCATU – SP
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Comparação dos extratos aquoso e hidroalcólico das folhas de
Bauhinia holophylla (Bong.) Steud. quanto ao efeito
hipoglicemiante, com vistas à produção de medicamento
fitoterápico

Aislan Quintiliano Delgado

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração:
Biologia de processos e Sistemas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

BOTUCATU – SP
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Delgado, Aislan Quintiliano.

Comparação dos extratos aquoso e hidroalcólico das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. quanto ao efeito hipoglicemiante, com vistas à produção de medicamento fitoterápico / Aislan Quintiliano Delgado. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: José Roberto Bosqueiro
Capes: 20702000

1. Farmacologia. 2. *Bauhinia*. 3. Diabetes mellitus.
4. Fitoterapia. 5. Hipoglicemiantes. 6. Plantas medicinais.

Palavras-chave: Atividade Biológica; *Bauhinia holophylla*; Diabetes mellitus; Fitoterapia; Hipoglicemiante.

Dedico esse trabalho a Deus, que me capacitou para a realização do mesmo, e aos meus pais, Edinês e Rosenwald, pelo amor, paciência dedicação e apoio em todo meu período acadêmico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me deu a oportunidade de viver para realizar mais este sonho e por todas as dádivas que me são oferecidas diariamente.

Aos meus pais Edinês e Rosenwald, aos quais dedico todas as conquistas da minha vida, e agradeço por todo amor, incentivo e apoio incondicionais. Obrigado por sempre acreditarem em mim e por serem meus maiores incentivadores. À minha irmã Stephanie por toda a torcida e cumplicidade de sempre e por ser a irmã mais incrível do mundo. A vocês três dedico essa conquista.

A todos da minha família, que de alguma forma contribuíram para meu crescimento e me apoiaram e incentivaram quando precisei. Sou grato por tê-los em minha vida. Minha avó Inez, meu tio Edson, minha tia Tania e minha prima Júlia, vocês também fazem parte de minhas conquistas, e sem vocês, passar por tudo isso teria sido impossível.

Ao meu orientador, mestre e amigo José Roberto Bosqueiro (Beto), minha eterna gratidão por toda confiança, pelas inúmeras portas que me foram abertas, conselhos, incentivos, suporte e cuidado durante todos esses anos que estivemos trabalhando no Laboratório de Fisiologia do Pâncreas Endócrino (LAFIPE). O senhor me incentivou e acreditou em meu trabalho, minha sincera admiração e respeito pela pessoa que é e pelo profissional diferenciado, dedicado, íntegro, competente que todos reverenciam. Muito obrigado pela oportunidade de tê-lo como orientador.

Agradeço imensamente a todos os colaboradores que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho. Em especial ao pessoal do laboratório de Química de Produtos Naturais da Unesp- Bauru. A Juliana e Laura do laboratório de Bioquímica da Usp-Bauru. A Roberta (Ro) do laboratório de doenças não transmissíveis, envelhecimento e exercício físico. Ao Henrique (Sucess) do laboratório de controle do metabolismo Usp-Ribeirão Preto.

Agradeço a professora Heloisa Aparecida Barbosa da Silva Pereira, pela atenção, disponibilidade, leitura, análise crítica, comentários e sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento de minha tese em sua versão final.

Agradeço aos professores Ariane Leite Rozza e Edson Luis Maistro, pela gentileza, prontidão e disponibilidade por terem aceitado participar como banca de minha tese na qualificação e também na defesa. Agradeço também a professora Marília Afonso Rabelo Buzalaf e a professora Cristiane Mengue Feniman Moritz por terem aceitado participar da banca na defesa. Aos quatro, agradeço a prontidão, gentileza, dedicação de tempo e disponibilidade pela revisão da tese, avaliação e pelas sugestões.

Para não correr o risco da injustiça, agradeço a todos os meus amigos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho. Muito obrigado pelo companheirismo, amizade, confiança, suporte, incentivo, conversas e momentos de diversão.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro (Código de Financiamento 001) que viabilizou o desenvolvimento desta tese.

A todos, meu muito obrigado!!!

“Deve-se convencer muita gente de que o estudo também é um trabalho, e muito cansativo, com um tirocínio particular próprio, não só intelectual, mas também muscular-nervoso, é um hábito adquirido com esforço, aborrecimento e até mesmo sofrimento.”

Antônio Gramsci

RESUMO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica, caracterizada por hiperglicemia decorrente de defeitos na ação ou secreção de insulina, ou ambos, sendo considerado um enorme problema de saúde no mundo todo. Os atuais tratamentos do DM incluem medicamentos hipoglicemiantes orais e/ou insulino-terapia. Entretanto, possuem muitos efeitos colaterais adversos que diminuem a qualidade de vida do paciente e a resposta por uso prolongado. As plantas medicinais vêm tornando-se alvo de diversas pesquisas científicas para comprovação de suas ações na melhora do quadro diabético e também para o entendimento de seus mecanismos de ação. Com isso, o interesse pela pesquisa com plantas medicinais com ação antidiabética, dentre elas, *Bauhinia holophylla* é cada vez maior. Por meio de estudos fitoquímicos, foram identificados três compostos principais que constituem o extrato e apresentam funções antidiabéticas, que são o p-pinitol, os heterosídeos de flavonoides e o cianoglicosídeo não cianetogênico litospermosídeo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar e comparar os efeitos do tratamento por 14 dias com os extratos hidroalcoólico e aquoso na dose de 400 mg/Kg, esse último amplamente utilizado pela população em geral, de *Bauhinia holophylla* em camundongos diabéticos do tipo 1 induzidos por estreptozotocina, na busca de uma alternativa para o tratamento do diabetes. Para isso, foram utilizados camundongos machos Swiss que foram separados em um grupo normoglicêmico e quatro grupos diabéticos. Foram mensurados a glicemia em jejum nos dias 7 e 14, além da ingestão alimentar, hídrica e peso corpóreo mensurados diariamente. No 14º dia, foram analisadas as sensibilidades à glicose, insulina e piruvato. Após os 14 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e tiveram seus órgãos pesados. Foram retirados fragmentos de músculo gastrocnêmio para a quantificação de glicogênio hepático e muscular, e o sangue foi coletado para análise dos parâmetros bioquímicos, como o perfil lipídico e a hepatotoxicidade. Os tratamentos com ambos os extratos se mostraram capazes de aumentar a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina. Houve diminuição da perda de proteínas e da proteólise, assim como da desidratação e, conseqüentemente, diminuição da perda de peso e de massa muscular. O extrato hidroalcoólico também foi o responsável por provocar diminuição da ingestão hídrica e alimentar para valores próximos aos do grupo controle, enquanto o aquoso apenas diminuiu a ingestão alimentar. O tratamento também foi responsável por melhorar o perfil lipídico dos camundongos, diminuindo os níveis de colesterol total, triglicerídeos, LDL, VLDL e aumentando o colesterol HDL, albumina sérica, proteínas totais e o armazenamento de glicogênio hepático. Em suma, os tratamentos controlaram os níveis glicêmicos, bem como apresentaram efeito positivo sobre a massa corporal, das ingestões hídrica e alimentar, dos parâmetros bioquímicos e metabólicos (tolerância à glicose e sensibilidade à insulina), evidenciando, assim, que os extratos foram capazes de melhorar o quadro diabético por apresentarem propriedades. Por fim, foi possível observar que o extrato hidroalcoólico se sobressai em relação ao extrato aquoso.

Palavras-chave: Atividade Biológica, *Bauhinia holophylla*, *Diabetes mellitus*, Fitoterapia, Hipoglicemiante, Pata de Vaca, Plantas Medicinais.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease, characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin action or secretion, or both, and is considered a huge health problem worldwide. Current DM treatments include oral hypoglycemic drugs and/or insulin therapy. However, they have many adverse side effects that decrease the patient's quality of life and response to prolonged use. Medicinal plants have become the target of several scientific researches to prove their actions in improving the diabetic condition and also to understand their mechanisms of action. With this, the interest in research with medicinal plants with antidiabetic action, among them, *Bauhinia holophylla*, is increasing. Through phytochemical studies, three main compounds that constitute the extract and have antidiabetic functions were identified, which are p-pinitol, flavonoid heterosides and the non-cyanetogenic cyanoglycoside lithospermoside. The aim of this study was to evaluate and compare the effects of a 14-day treatment with hydroalcoholic and aqueous extracts at a dose of 400 mg/Kg, the latter widely used by the general population, of *Bauhinia holophylla* in type 1 diabetic mice induced by streptozotocin, in the search for an alternative for the treatment of diabetes. For this, male Swiss mice were used, which were separated into a normoglycemic group and four diabetic groups. Fasting blood glucose was measured on days 7 and 14, in addition to food and water intake and body weight measured daily. On the 14th day, glucose, insulin and pyruvate sensitivities were analyzed. After 14 days of treatment, the animals were euthanized and their organs weighed. Fragments of the gastrocnemius muscle were removed for quantification of hepatic and muscle glycogen, and blood was collected for analysis of biochemical parameters, such as lipid profile and hepatotoxicity. Treatments with both extracts were able to increase glucose tolerance and insulin sensitivity. There was a decrease in protein loss and proteolysis, as well as in dehydration and, consequently, a decrease in weight loss and muscle mass. The hydroalcoholic extract was also responsible for causing a decrease in water and food intake to values close to those of the control group, while the aqueous extract only reduced food intake. The treatment was also responsible for improving the lipid profile of the mice, decreasing the levels of total cholesterol, triglycerides, LDL, VLDL and increasing HDL cholesterol, serum albumin, total proteins and hepatic glycogen storage. In short, the treatments controlled glycemic levels, as well as had a positive effect on body mass, water and food intake, biochemical and metabolic parameters (glucose tolerance and insulin sensitivity), thus showing that the extracts were capable of to improve the diabetic condition due to their properties. Finally, it was possible to observe that the hydroalcoholic extract stands out in relation to the aqueous extract.

Keywords: Biological Activity, *Bauhinia holophylla*, *Diabetes mellitus*, Phytotherapy, Hypoglycemic, Medicinal Plants.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos hidroalcoólico e aquoso de <i>B. holophylla</i>	26
Figura 2: Glicemia de jejum (mg/dL) de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de <i>B. holophylla</i> durante 14 dias	36
Figura 3: Corpos Cetônicos (mmol/L) de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de <i>B. holophylla</i> durante 14 dias	37
Figura 4: Ingestão alimentar (g ração/100g peso corpóreo) de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de <i>B. holophylla</i> durante 14 dias	38
Figura 5: Ingestão hídrica (mL/animal) de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de <i>B. holophylla</i> durante 14 dias	39
Figura 6: Teste de tolerância sensibilidade à insulina de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de <i>B. holophylla</i> durante 14 dias	43
Figura 7: KITT (%min) de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de <i>B. holophylla</i> durante 14 dias	44
Figura 8: Teste de tolerância à glicose de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de <i>B. holophylla</i> durante 14 dias	45
Figura 9: Área sob a curva do decaimento da glicose de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de <i>B. holophylla</i> durante 14 dias	45
Figura 10: Teste de tolerância ao piruvato de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de <i>B. holophylla</i> durante 14 dias	46
Figura 11: Área sob a curva do decaimento da glicose de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de <i>B. holophylla</i> durante 14 dias	47

Figura 12: Glicogênio hepático (mg%) de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de *B. holophylla* durante 14 dias 48

Figura 13: Glicogênio muscular (mg%) de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de *B. holophylla* durante 14 dias 49

Lista de Tabelas

Tabela 1- Classes de medicamentos adjuvantes no tratamento do diabetes 23

Tabela 2- Efeito da administração de salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de *B. holophylla* sobre o peso dos órgãos de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina 41

Tabela 3- Efeito da administração de salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de *B. holophylla* sobre o peso corpóreo de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina 42

Tabela 4- Efeito da administração de salina, insulina, extratos hidroalcoólico ou aquoso de *B. holophylla* sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina 51

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADA	Associação Americana de Diabetes
ATP	Adenosina Trifosfato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CS	Grupo controle normoglicêmico tratado com salina
DAQ	Grupo diabético tratado com o extrato aquoso de <i>B. holophylla</i> , 400mg/Kg
DHB	Grupo diabético tratado com o extrato hidroalcoólico de <i>B. holophylla</i> , 400mg/Kg
INS	Grupo diabético tratado com insulina
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMT1	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo1
DMT2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Grupo diabético tratado com salina
3-mpa	Ácido 3-mercapto-picolínico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Et al.	E outros
Glut2	Transportador de glicose do tipo 2
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
Kg	Quilogramas
KOH	Hidróxido de Potássio
M	Molar
g	Micrograma

μl	Microlitros.
μm	Micrômetro
mM	Millimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
Na_2SO_4	Sulfato de sódio
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
RI	Resistência à Insulina
SEM	erro padrão da média
STZ	Estreptozotocina

Sumário

1. Introdução.....	17
1.1 Pâncreas.....	17
1.2 <i>Diabetes Mellitus</i>	18
1.3 Diabetes Experimental	20
1.4 Fitoterapia.....	21
1.5 Gênero <i>Bauhinia</i>	23
1.51 Extratos de <i>Bauhinia holophylla</i>	24
2. Justificativa.....	27
3. Objetivo Geral	28
3.1 Objetivos Específicos	28
4. Material e Método	29
4.1 Obtenção dos Extratos	29
4.2 Animais	29
4.3 Indução ao Diabetes	30
4.4 Tratamento com os Extratos e Insulina	30
4.5 Glicemia em Jejum.....	31
4.6 Corpos Cetônicos	31
4.7 Ingestão Hídrica e Alimentar	31
4.8 Peso Corpóreo	31
4.9 Teste Intraperitoneal de Tolerância à Insulina (IpITT)	31
4.10 Teste Intraperitoneal de Tolerância à Glicose (IpGTT)	32
4.11 Teste Intraperitoneal de Tolerância ao Piruvato (IpPTT).....	32
4.12 Glicogênio Hepático e Muscular.....	32
4.13 Obtenção do Soro	33
4.14 Parâmetros Bioquímicos	33
4.15 Análise Estatística	34
5. Resultados	35
5.1 Glicemia	35
5.2 Corpos Cetônicos	36
5.3 Ingestão Hídrica e Alimentar	38
5.4 Peso dos Órgãos	39
5.5 Peso Corpóreo	41
5.6 IpITT.....	42
5.7 IpGTT	44
5.8 IpPTT	46
5.9 Glicogênio Hepático.....	47
5.10 Glicogênio Muscular	48
5.11 Parâmetros Bioquímicos	49

6. Discussão	52
6.1 Sumarização dos Efeitos do Tratamento com o Extrato Hidroalcoólico de <i>B. holophylla</i>	60
6.1 Sumarização dos Efeitos do Tratamento com o Extrato Aquoso de <i>B. holophylla</i>	61
7. Conclusão	62
8. Referência Bibliográfica	63
9. Anexo	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pâncreas

O pâncreas é uma glândula retroperitoneal mista (possui função endócrina e exócrina), innervada e vascularizada, localizada na cavidade abdominal na parte dorsal, dividida em três partes: lobo direito, esquerdo e corpo (Koning & Liebich, 2016). Sua aparência se assemelha a uma glândula salivar mais amolecida e frouxamente entrelaçada (Moreira et al., 2017).

O pâncreas é envolto por uma capsula de tecido conjuntivo frouxo, formado por ácinos (responsáveis por fabricar o suco pancreático) e as ilhotas pancreáticas, separados por estroma. O tecido conjuntivo pancreático possui vasos sanguíneos, nervos, corpúsculos lamelares e ductos (Koning & Liebich, 2016 e Jennings et al 2017).

Mesmo sendo uma glândula mista, 95% do pâncreas é composto por tecido exócrino. Suas células acinares sintetizam e secretam por exocitose enzimas digestivas como amilase, lipase e proteases na luz do duodeno por meio de ductos. As células do ducto produzem fluidos ricos em mucina e bicarbonato que têm a função da neutralização do conteúdo do ácido estomacal (Jennings, et al 2017).

As ilhotas pancreáticas são as responsáveis pela porção endócrina do pâncreas. São altamente vascularizadas e contém quatro tipos de células responsáveis pela produção de um tipo de hormônio, que embora diferentes, estão todos envolvidos no controle do metabolismo e homeostase de glicose. As células são: célula α (produtoras de glucagon), células β (produtoras de insulina), células δ (produtoras de somatostatina) e as células PP ou F (produtoras de polipeptídio pancreático) (Cobb, M. H, 2017).

A regulação da secreção dos hormônios pancreáticos é de responsabilidade da secretina e a colecistoquinina (sintetizadas no intestino delgado). Entretanto, as ilhotas pancreáticas também são innervadas por fibras do sistema nervoso, tanto simpático quanto parassimpático, permitindo assim que o sistema nervoso autônomo, por meio do nervo vago, module a secreção dos hormônios (Carvalho *et al.* 2002). Os neurotransmissores derivados das fibras parassimpáticas são a acetilcolina (estimula a liberação de glucagon, insulina e polipeptídio pancreático), o polipeptídio

intestinal vasoativo e o liberador de gastrina (estimula a liberação de glucagon, insulina, polipeptídio pancreático e somatostatina). Os neurotransmissores provindos das fibras simpáticas são a noradrenalina (estimula a secreção de glucagon e inibe a secreção de insulina), galanina e o neuropeptídio Y (ambos inibem a secreção de insulina) (Jennings et al., 2017).

A insulina é um hormônio peptídico com características hipoglicemiantes, secretada pela célula β nas ilhotas pancreáticas. A insulina desempenha funções como estímulo para a captação da glicose em tecido adiposo e muscular esquelético, estimulação da lipogênese, inibição da lipólise, estimulação da glicogênese, inibição da glicogenólise e da gliconeogênese, inibição do catabolismo, estimulação do anabolismo, estimulação da síntese proteica e inibição da proteólise (Fares, 2001; Wilcox 2005; Franco, 2016).

A sinalização intracelular da insulina, em tecidos sensíveis à sua ação, ocorre quando ela se liga em seu receptor de membrana, denominado receptor de insulina (IR), ocasionando assim a fosforilação intracelular do IR. Ocorre então uma ativação de toda a cascata de sinalização ativando a PI3k e a AKT, translocando a GLUT4 para a periferia da membrana.

Deficiência na produção ou secreção da insulina ou em suas vias de sinalização, fazem com que os níveis de glicose na circulação aumentem, causando diferentes tipos de diabetes (Fares, 2001; Wilcox 2005; Franco, 2016).

1.2 Diabetes Mellitus

O *Diabetes Mellitus* (DM) é a doença crônica não transmissível mais comum em todas as faixas etárias em todo o mundo. A hiperglicemia é a principal característica do DM e ocorre devido a defeitos na secreção e ação de insulina em ambos. Tal hiperglicemia é resultado da dificuldade de entrada da glicose em células insulino dependentes, resultando em um desequilíbrio nos metabolismos de carboidratos, lipídeos e proteínas, o que leva à perda de peso, cetose, alterações micro e macrovasculares, retinopatia, neuropatia, nefropatia, coma, entre outras grandes complicações a longo prazo (Bhargava & Shah, 2021; IDF, 2019; Vareda et al., 2014). Por essa razão, o DM exige cuidados constantes e um rápido e precoce diagnóstico para reduzir ao máximo

os danos à saúde do indivíduo (Costa e Moreira, 2021).

Em termos gerais, o DM é classificado em 3 subtipos principais, sendo eles: O Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1), causada por reações autoimune, Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2), hiperglicemia proveniente de obesidade, resistência à insulina e sedentarismo e o Diabetes Mellitus gestacional (DMG), ocasionado pela presença do feto, que pode ou não, desaparecer após o parto (IDF, 2019).

O DMT1 corresponde a 5 a 10% dos casos, provindos da destruição progressiva de células beta pancreáticas. O DMT1 pode ser classificado em 2 subtipos, o *Diabetes mellitus do tipo 1A (DMT1A)* considerada autoimune e *Diabetes mellitus do tipo 1B (DMT1B)* considerada idiopático (SBD, 2018).

O DMT1A é um processo lento e de autoagressão inflamatória (insulite) que pode levar anos até ocasionar manifestações que possibilitem sua identificação. Quando os sintomas (hiperglicemia e em alguns casos cetoacidose) se manifestam, significa que as células betas já sofreram baixa em seu número, podendo até estarem ausentes. A taxa de destruição das células betas pode variar, sendo mais rápida em crianças (Oram et al., 2019; Redondo et al., 2001.). Os fatores genéticos envolvidos no aparecimento do DMT1A estão inclusos no sistema leucocitário humano (HLA). Já os fatores ambientais que desencadeiam o DMT1A em organismos predispostos estão fatores nutricionais, deficiência vitamínica, infecções virais, entre outros (Casellini et al., 2013; Vinik et al., 2015). A produção e liberação de citocinas, ocasionados pelo ataque autoimune, podem alterar as funções das células beta pela ação citotóxica, induzindo apoptose e auxiliando na destruição das ilhotas pancreáticas e células beta (Rabinovitch & Suarez-Pinzon, 2003).

Sendo minoria dos casos, o DMT1B tem etiologia ainda desconhecida. A ausência de marcadores de imunidade em relação a células beta e sua não associação com o sistema HLA tornam-se as características principais do DMT1B e, também, os motivos de sua causa ainda ser desconhecida. Esse tipo de diabetes apresenta diversos graus de deficiência insulínica, podendo apresentar cetoacidose (Selvarajah et al., 2015).

Em 2019, 1,1 milhão de crianças e adolescentes entre 14 e 19 anos apresentavam quadro de

DMT1 conforme a OMS, e dados da Federação Internacional de Diabetes (FID) estimaram que existiam mais de 600 mil crianças e adolescentes (menores de 15 anos) com DMT1. Dessa estimativa, 98.200 foram novos diagnósticos anuais. A FID estimou o aumento de 48% da prevalência da DM até 2045 (425.000.000 para 629.000.000 de doentes), afetando sobretudo os países de baixo e médio desenvolvimento. O Brasil é o 3º país no ranking com o maior número de crianças e adolescentes de 0-14 anos com DMT1, perdendo apenas para os Estados Unidos e Índia (IDF, 2019). No Brasil, 7,7% da população brasileira com mais de 18 anos é portadora de DMT1 correspondendo a 12,3 milhões de pessoas. Destes, 8,4% são mulheres e 6,9% são homens (PNS-IBGE 2020).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil (2006), o DMT1 reduz, em média, 15 anos a expectativa de vida do indivíduo, enquanto o DMT2, reduz de 5 a 7 anos (Brasil, 2006).

O principal tratamento para o diabetes do tipo 1 é a insulinoaterapia, que consiste em injeções diárias de insulina para garantir o controle glicêmico (Danne et al., 2018).

O aumento significativo de indivíduos com DM torna necessário que ocorra incremento nos estudos relativos à doença, para que o conhecimento traga melhora no tratamento, assim como melhora na qualidade de vida dos pacientes pela tentativa de se reduzir o número de complicações associadas ao DM e de sua morbimortalidade (Costa e Moreira, 2021), mesmo sabendo-se que fatores ambientais e predisposição genética são alguns dos mecanismos propostos para a quebra da homeostasia imunológica e o desenvolvimento do DMT1.

1.3 Diabetes experimental

A estreptozotocina (STZ), 2-desoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureido) D-glicopirranose, derivada do fungo *Streptomyces achromogenes*, é utilizada para indução do diabetes experimental. Pesquisas com diabetes experimental utilizando STZ são feitas para elucidação e estudos de sintomas e sinais associados ao diabetes em diversos órgãos (Adeghate et al., 2010).

Os efeitos danosos da STZ às células betas se dão por danos mitocondriais nas células betas, alcalinização do DNA celular e a subsequente ativação da poli-AP ribose sintetase, que causa depleção letal intracelular de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), induzindo quebras na fita

de DNA e metilação. Além disso, com a redução do nível de ATP e posterior inibição e secreção da insulina, ocorre a formação de óxido nítrico, que ocasiona a degradação intracelular (Adeghate et al., 2010; Bennett, 1981; Bolzán, 2002; Szkudelski, 2001).

Sua atividade caracteriza-se por apresentar um efeito de natureza trifásica, com um período inicial (2 a 4 horas) de hiperglicemia, ao inibir a liberação de insulina, um período intermediário (7 a 9 horas) de hipoglicemia através da ação ofensiva sobre as células β com a liberação da insulina que estava armazenada, e um período final caracterizado por apresentar um quadro irreversível de hiperglicemia (24 horas após a indução) (Rerup, 1970).

1.4 Fitoterapia

Desde os primórdios da humanidade, as plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de diversas doenças (Muthee et al., 2011). Após um declínio, devido à descoberta dos fármacos modernos e sintéticos, a fitoterapia vem registrando um aumento exponencial nos últimos tempos, grande parte em países industrializados (Barata, 2008; Spiteri, et al., 2013). Na atualidade, 84% das drogas disponíveis no mercado são derivadas de plantas, em comparação com 50% que são de origem sintética, mas tendo em sua composição substâncias ativas isoladas derivadas de plantas medicinais (Barata, 2008; Muthee et al., 2011). A movimentação financeira causada pelo mercado de fitoterápicos chega a US\$ 21,7 bilhões por ano em todo o mundo (Carvalho et al., 2004). De acordo com pesquisas da Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais (SBPM), desde 2013 o Brasil apresenta um crescimento no mercado de fitoterápicos, chegando a movimentar de 400 a 500 milhões de dólares por ano no país. No mundo, estima-se que o custo com fitoterápicos chegue à 27 bilhões de dólares, o que corresponde a 7% do mercado mundial de medicamentos. O mercado farmacêutico de fitoterápicos cresce cerca de 6 a 7%, enquanto o mercado farmacêutico sintético sobe de 3 a 4%.

A utilização de fitoterápicos vem aumentando e tem como justificativa em sua grande parte a boa aceitação social e devido à crença da qualidade dos produtos naturais quando comparados aos produtos de origem sintética (Barata, 2008). Na medicina popular há diversos exemplos de plantas utilizadas para os mais variados fins, geralmente pela população com menor poder aquisitivo, devido

ao fácil acesso e baixo custo (Amaral et al., 2005; Da Silva & Cechinel Filho, 2002). A fitoterapia é uma área abrangente que envolve a prevenção e tratamento de inúmeras patologias, incluindo o DM (Bent et al., 2003). O uso benéfico de plantas medicinais é extensamente documentado na medicina tradicional de diversas culturas. Diversas plantas têm sido alvo de estudo científico para a comprovação dos seus efeitos terapêuticos em DM e têm mostrado efeitos muito promissores (Patel et al., 2012; Zhang et al., 2012).

A etnobotânica indica cerca de 800 plantas que podem possuir propriedades antidiabéticas e mais de 1200 espécies de plantas têm sido testadas com base na etnofarmacologia. A ação da grande maioria dessas plantas está relacionada à presença dos chamados metabólitos secundários, moléculas ligadas a processos de desenvolvimento das plantas, como compostos fenólicos, alcaloides, terpenos, flavonoides, entre outros (Patel et al., 2012).

As plantas com propriedades hipoglicemiantes apresentam mecanismos de ação que pode ser atribuído a fatores como aumento da liberação de insulina por meio da estimulação das células β pancreáticas, indução de resistência aos hormônios que aumentam a taxa de glicose, aumento do número e da sensibilidade dos sítios receptores de insulina, diminuição da perda de glicogênio, aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos, eliminação de radicais livres, resistência à peroxidação de lipídeos, correção da desordem metabólica causada em lipídeos e proteínas e estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo (Li et al., 2004; Marles & Farnsworth, 1995; Said et al., 2002; Volpato et al., 2002).

Os agentes hipoglicemiantes orais e a insulina são a base do tratamento do diabetes e os efeitos colaterais adversos associados incluem reações de hipersensibilidade, ganho de peso, hipoglicemia, acidose láctica, edema periférico, disfunção hepática, além de outros (Tabela 1).

Tabela 1. Classes de medicamentos consideradas como terapias adjuvantes no diabetes mellitus tipo 1

CLASSIFICAÇÃO DO MEDICAMENTO	EXEMPLOS	BENEFÍCIOS	EFEITOS ADVERSOS
BIGUANIDA	Metformina, Glucophage	Redução do requerimento da insulina. Perda de peso. Sem aumento de grave hipoglicemia ou cetoacidose diabética	Efeitos gastrointestinais
AMILINA	Pramlintide	Melhora a hiperglicemia pós prandial	Aumento das taxas de hipoglicemia. Efeitos gastrointestinais. Requer injeções adicionais
AGONISTA DO RECEPTOR DO GLP-1	Exenatida, Exenatida LAR, Liraglutida, Dulaglutida, Semaglutida e Lixisenatido	Redução do requerimento da insulina. Perda de peso.	Efeitos gastrointestinais. Aumento da hipoglicemia. Aumento na cetoacidose.
INIBIDORES DE SGLT2	Canagliflozina, Dapagliflozina, Empagliflozina, Ertugliflozina	Redução do requerimento da insulina. Perda de peso. Não causa hipoglicemia	Infecção Urogenital e aumento na cetoacidose

Retirado e adaptado de Lane, K. Freeby, M, 2021

Os efeitos adversos exigiram uma maior pesquisa e investigação de outras medidas terapêuticas e de gerenciamento, particularmente de sistemas medicinais popular e indígenas. O estudo científico de plantas medicinais tem direcionado não apenas o estabelecimento de entidades químicas, mas também eficácias terapêuticas substanciadas dessas plantas. O diabetes é uma síndrome com causas e origens multifatorial e complexas, que requer uma abordagem integrada para abordar vários alvos que, dificilmente, se obtém em uma terapia convencional. Por isso, plantas que possuem diversos tipos de componentes químicos que oferecem vantagens e efeitos sinérgicos provocando ação através de alvos multi receptores são importantes alvos de estudos (Popović et al., 2016; Taye et al., 2020).

1.5 Gênero *Bauhinia*

O gênero *Bauhinia*, pertencente à família Fabaceae, compreende aproximadamente 300 espécies. Muitas destas plantas são usadas via oral, em forma de chás ou outras preparações

fitoterápicas de suas cascas e folhas no tratamento de diversas doenças, como diabetes, agindo como anti-inflamatórias, diuréticas e analgésicas. São popularmente conhecidas como “Pata-de-vaca” ou “Unha-de-boi” (Cechinel Filho, 2002; Vasconcelos et al., 2004).

Plantas pertencentes ao gênero *Bauhinia* e seus compostos isolados vêm despertando grande interesse por parte da comunidade científica nos últimos anos, desde que alguns estudos mostraram a sua eficácia no tratamento de doenças, dentre elas o diabetes (Da Silva & Cechinel Filho, 2002; Da Silva et al., 2010; Ribeiro et al., 2018, Camaforte et al., 2019; Saldanha et al., 2021).

Foram realizados estudos fotoquímicos e farmacológicos demonstrando que plantas do gênero *Bauhinia* possuem significativas quantidades de glicosídeos, esteróides, triterpenos, lactonas e flavonoides. Por mais que muitos compostos sejam conhecidos, pouco se conhece sobre a atividade farmacológica das plantas do gênero *Bauhinia* (Silva e Cechinel, 2002).

Fonseca *et al.* (2022) concluíram que o extrato de *B. holophylla* apresenta atividade antifúngica e capaz de inibir a formação de biofilme e crescimento de hifas em todas as cepas testadas de *Candida*, indicando que a *B. holophylla* interfere na virulência das espécies de *Candida* e apoiam o uso de *Bauhinia* na medicina popular.

Dos Santos *et al.* (2021) avaliaram que *B. holophylla* tem uma atividade anti-dengue promissora, associada principalmente com a presença de flavonoides.

Ribeiro *et al.* (2017) demonstraram in vitro que o extrato bruto de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. não apresenta efeitos citotóxicos e ainda mostrou efeitos protetores que podem estar associados a uma possível atividade quimiopreventiva contra agentes carcinogênicos.

Rozza *et al.* (2015) verificaram que o extrato bruto de *B. holophylla* apresenta atividade antiulcerogênica, principalmente por diminuir o estresse oxidativo e atenuar a resposta inflamatória, sem induzir efeitos adversos.

1.5.1 Extrato de *Bauhinia Holophylla*

Foram realizadas análises fitoquímicas com a finalidade de identificar os compostos com as atividades hipoglicemiantes presentes no extrato das folhas de *B. holophylla*. Os extratos foram

fracionados e purificados levando a identificação de 11 compostos. Através de estudos bioguiados, demonstrou-se que a atividade hipoglicemiante provinda do extrato das folhas de *B. holophylla* é resultante da ação de três compostos, sendo eles: heterosídeos de flavonoides, poliol pinitol e cianoglicosídeo não cianetogênico litospermosídeo (Saldanha et al., 2021).

Os heterosídeos de flavonoides são conhecidos por suas atividades antioxidantes. Entretanto, também possuem atividades hipoglicemiantes. Valle (2016), demonstrou que a ingestão de flavonoides tanto em sua forma isolada quanto por meio de extratos de plantas diminui as glicemias de jejum e pós-prandial, além de estimular a secreção de insulina e aumentar a sensibilidade à insulina em humanos e ratos diabéticos. Pessoa e colaboradores (2020), constataram que a ingestão de flavonoides pode contribuir para a redução do risco de desenvolvimento e para o tratamento do DM.

O cianoglicosídeo não cianetogênico litospermosídeo já demonstrou que possui propriedades que diminuem a glicemia em jejum, aumentam a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose (Saldanha et al., 2021).

O p-pinitol também apresenta atividades benéficas a organismos diabéticos, entre elas e talvez a mais importante, a regulação da glicose por dois mecanismos principais: a sensibilização à insulina e a mimetização da ação da insulina (Azab, 2022). Acarreta, também, incremento na secreção de insulina induzida pela glicose, que pode aumentar a lipogênese hepática (Junior et al., 2020).

Analises fitoquímicas também foram realizadas para verificar a presença de tais compostos e a similaridade no extrato hidroalcoólico e na infusão aquosa. A cromatografia (CLAE-DAD) demonstrou que ambos os extratos possuem um perfil cromatográfico similar (Figura 1) na região de composto de polaridade média (30-60 mim) e diferença na região de compostos de maior polaridade (0-30mim) como açúcares (Saldanha et al., 2021).

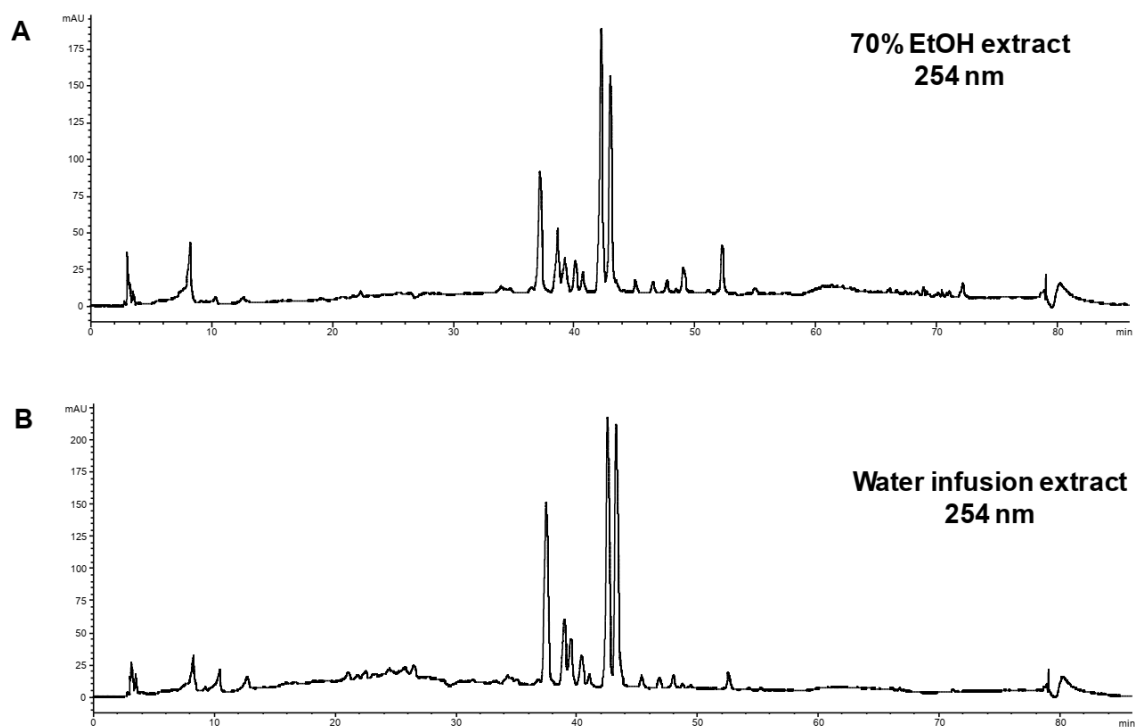


Figura 1. Análise por CLAE-DAD do extrato hidroalcoólico das folhas (A) e da infusão aquosa (B) de *Bauhinia holophylla*. Condições do CLAE: coluna X-Bridge C18 (250 × 4,6 mm i.d., 5 µm, Waters, Milford, MA, EUA), sistema solvente MeOH (B) e H₂O (A), ambos contendo 0,1% FA. A separação foi realizada no modo gradiente como se segue: 60% de B a 100% de B em 60 minutos. Vazão: 1 mL/min; volume de injeção 10 µL; concentração da amostra 10mg/mL em metanol. Retirado de Saldanha et al. (2021).

2. Justificativa

O desenvolvimento de medicamentos à base de plantas envolve um processo longo, trabalhoso e de alto custo (Brown et al., 2021). Uma estratégia para acelerar esse processo é o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos similares ao produto fitoterápico de uso tradicional. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) possui normas que possibilitam o procedimento acelerado, com menor número de etapas necessárias, para o registro desse tipo de produto. O Capítulo V da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 26/2014 regulamenta o registro simplificado de produtos tradicionais fitoterápicos (PTF). Essa determinação da Anvisa está inserida no contexto da Política Nacional de Plantas Medicinais, que visa resgatar e valorizar o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais. No entanto, a lista publicada pela ANVISA com PTFs passíveis de notificação simplificada (Anvisa, PTF, 2014) contém inúmeras espécies exóticas, principalmente europeias, contribuindo pouco para o processo acelerado com espécies nativas do Brasil. Portanto, existe a necessidade da inclusão de mais espécies nativas da flora brasileira passível de notificação simplificada.

Tendo por base os resultados obtidos com o extrato de *B. holophylla*, em 2018 houve o depósito da Patente WO/2018/000057 - Use of cyanoglucosides and pharmaceutical formulations thereof in the treatment of diabetes, juntamente com o grupo do Dr. Jean-Luc Wolfender, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Genebra, Suíça.

Para viabilizar o registro simplificado de um PTF produzido a partir de uma espécie nativa do Brasil, investigamos o potencial hipoglicemiante de um lote piloto industrial do extrato aquoso das folhas de *B. holophylla*. Esse extrato aquoso foi preparado por decocção, de modo similar ao indicado na medicina popular, e teve seu potencial hipoglicêmico comparado com o extrato hidroalcolico ativo. Esses resultados são importantes para fornecer evidências científicas para solicitar a inclusão dessa espécie na lista de PTF de registro simplificado. Os resultados e a potencial inclusão dessa espécie na lista poderá atrair investidores do setor industrial farmacêutico para viabilizar a produção de um PTF de *B. holophylla*.

3. Objetivo Geral

Investigar alterações fisiológicas após os tratamentos com os extratos hidroalcoólico e aquoso de *Bauhinia holophylla* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar AST e ALT sérica para verificar uma possível hepatotoxicidade.
- Avaliar glicemia de jejum, triglicérides, colesterol total, colesterol HDL, LDL, VDL, proteínas totais e albumina de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com insulina, salina, extrato aquoso ou hidroalcoólico de *B. holophylla* por 14 dias.
- Avaliar os graus de tolerância à glicose, piruvato e sensibilidade à insulina, por meio do ipGTT, ipPTT e ipITT.
- Comparar os efeitos dos extratos de *B. holophylla* em função das diferenças quantitativas dos composto.
- Avaliar a ingestão hídrica, ingestão alimentar e peso corpóreo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com insulina, extrato hidroalcoólico ou aquoso de *B. holophylla* ou solução salina por 14 dias.
- Quantificar os níveis de glicogênio hepático e muscular de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com insulina, extrato hidroalcoólico ou aquoso de *B. holophylla* ou solução salina por 14 dias.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos Extratos

O isolamento e purificação dos extratos hidroalcoólico e aquoso estiveram a cargo do Laboratório de Química de Produtos Naturais da FC/Bauru, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Anne Lígia Dokkedal. Em resumo, as folhas de *B. holophylla* foram secas em estufa a 60 °C. As folhas secas foram trituradas em moinho de facas e foram submetidas à extração. O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação à temperatura ambiente utilizando EtOH:H₂O 7:3% v/v (Hostettmann, 2013; Saldanha et al., 2021). A solução obtida foi concentrada sob pressão reduzida a 40 °C em rota evaporador, congelada e liofilizada, produzindo o extrato hidroalcoólico (EtOH70%). Outra porção de folhas em pó foi submetida a extração por infusão aquosa (preparação tradicional) com 100 mL de água durante 30 min para o preparo do extrato aquoso. A solução obtida foi filtrada, congelada e liofilizada fornecendo o extrato aquoso.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos com 60±10 dias de idade, provenientes Biotério Central da UNESP, localizado no Campus de Botucatu, SP. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (23 ± 2°C) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), com livre acesso à comida e água, recebendo ração balanceada e água *ad-libitum*. Os procedimentos foram executados de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas éticas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Faculdade de Ciências, campus Bauru (Processo nº 959/2022, v.1) (Anexo 1). Para formar os grupos experimentais os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos:

Grupo controle salina (CS): animais controle tratados com salina.

Grupo diabético salina (DS): animais induzidos ao diabetes por administração de estreptozotocina e tratados com salina.

Grupo diabético tratado com insulina (INS): animais induzidos ao diabetes por administração de estreptozotocina e tratados com Insulina NPH (Humulin®) de forma subcutânea duas vezes ao dia – 9 e 18 horas.

Grupo diabético tratado com extrato hidroalcoólico de *B. holophylla* (DHB): animais induzidos ao diabetes por administração de estreptozotocina e tratados com o extrato hidroalcoólico de *B. holophylla*, 400 mg/Kg.

Grupo diabético tratado com extrato aquoso de *B. holophylla* (DAQ): animais induzidos ao diabetes por administração de estreptozotocina e tratados com o extrato aquoso de *B. holophylla*, 400mg/kg.

4.3 Indução do diabetes

A indução do diabetes foi realizada por meio de uma injeção diária de STZ durante 5 dias consecutivos, na dose de 40 mg/kg, em camundongos em jejum de 4 horas. A STZ foi dissolvida em tampão citrato com pH 4,5 e injetada por via intraperitoneal, imediatamente após o preparo. Os animais foram deixados em jejum por mais 1 hora após a indução. Após um período de 7 dias, a glicemia dos camundongos foi medida com glicosímetro (OneTouch-Johnson & Johnson) para verificação do estabelecimento do diabetes. Os animais que apresentaram glicemia de jejum superior à 250mg/dL foram considerados diabéticos e incluídos nos respectivos grupos.

4.4 Tratamento com os extratos e insulina

Os animais CS e DS receberam apenas salina na dose de 1ml/kg. Animais dos grupos DAB e DHB receberam diariamente, por gavagem, respectivamente, o extrato aquoso e o extrato hidroalcoólico de *B. holophylla* diluído em salina e administrado na dose de 400 mg/kg de peso corpóreo durante 14 dias consecutivos. 7 dias após a indução do diabetes, a gavagem foi realizada uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, entre 7 e 9 horas da manhã. Os animais do

grupo INS, receberam diariamente 1/3 de U de insulina NPH (Humilin®) via subcutânea, por 14 dias, sendo uma administração as 9h00 (1/3 UI) e a outra as 18h00 (1/3UI) (Vilhena et al., 2020).

4.5 Glicemia em Jejum

Animais de todos os grupos foram deixados em jejum de 8 a 10 horas e tiveram a glicemia medida com glicosímetro (OneTouch-Johnson & Johnson) a partir do sangue retirado da ponta da cauda, a cada sete dias do tratamento.

4.6 Corpos Cetônicos

Animais de todos os grupos foram deixados em jejum de 8 a 10 horas e tiveram os corpos cetônicos medidos com glicosímetro (FreeStyle Optium Neo), por meio de cetofitas (Optium β -Ketone) a partir do sangue retirado da ponta da cauda, ao sétimo e décimo quarto dia do tratamento.

4.7 Ingestão hídrica e alimentar

Animais de todos os grupos tiveram suas ingestões hídrica e alimentar mensuradas diariamente. A ingestão alimentar foi corrigida pelo peso dos animais e expressa em gramas de ração por 100g de animal (g ração/100g animal).

4.8 Peso Corpóreo

Animais de todos os grupos foram pesados diariamente durante o tratamento, em balança eletrônica (Marte AD2000) e os pesos expressos em gramas.

4.9 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT)

Ao final do tratamento (14º dia) os camundongos foram submetidos a um jejum de

12h antes do procedimento experimental, que se iniciou com a coleta de sangue para a dosagem da glicemia de jejum dos animais (tempo 0'). Em seguida, foi administrada glicose intraperitonealmente na dose de 2g/kg e, a partir de então, o sangue foi coletado nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. A coleta de sangue em todos os tempos foi realizada pela cauda do animal e a glicemia medida através de glicômetro.

4.10 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)

Ao final do tratamento (14º dia), os camundongos (alimentados) foram anestesiados com tiopental sódico (30mg/kg, peso corpóreo). Insulina humana recombinante (Biohulin®) equivalente a 2U/kg de peso corpóreo, foi injetada intraperitonealmente logo após verificação da glicemia basal no tempo 0 a partir da extremidade caudal. Amostras de sangue foram coletadas para dosagem dos níveis séricos de glicemia nos tempos 5, 10, 20 e 30 min. A constante de decaimento de glicose (K) foi calculada a partir do “slope” da linha de regressão obtida com valores de glicose log-transformadas entre 0 e 30min depois da administração da insulina.

4.11 Teste de tolerância ao piruvato intraperitoneal (ipPTT)

Ao final do tratamento (14º dia), os camundongos foram submetidos a um jejum de 14h antes do procedimento experimental. Onde 30 minutos antes, metade dos animais de cada grupo recebeu na forma de gavagem ácido 3-mercaptopicolínico (3mpa) na dose de 30mg/Kg. O experimento iniciou com a coleta de sangue para a dosagem da glicemia de jejum dos animais (tempo 0'). Em seguida, foi administrada Piruvato de sódio (Sigma®) intraperitonealmente na dose de 1,5g/kg e, a partir de então, o sangue foi coletado nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. A coleta de sangue em todos os tempos foi realizada pela cauda do animal e a glicemia medida através de glicômetro.

4.12 Glicogênio Hepático e Muscular

Foram removidos cerca de 300 a 500mg de amostras de fígado e músculo gastrocnêmio dos animais e digeridos em 2 ml de solução de KOH 30% em tubos Falcon em banho Maria fervente por 1 hora. Após esta fase, foi acrescentado 0,2 ml de Na₂SO₄ e o material foi agitado. Em seguida, foram acrescentados 6,0 ml de etanol, agitado novamente e levado ao banho Maria por cerca de 15 segundos. Em seguida, o material foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 22°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 2 ml de água destilada à 60°C. Posteriormente, foram acrescentados 6,0ml de etanol e o material foi agitado e aquecido em banho Maria e novamente centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 22°C. O precipitado foi diluído em 15 µl de solução fenol e 2 ml de ácido sulfúrico. Após diluição do precipitado o conteúdo de glicogênio foi levado ao banho fervente por 15 minutos e então foi quantificado por espectrofotometria a 490nm (Rafacho *et al.*, 2008).

4.13 Obtenção do Soro

Ao final do tratamento (14º dia) os camundongos de todos os grupos foram deixados em jejum por período de 8-10 horas. Após esse período, foram eutanasiados, o sangue foi coletado através de punção cardíaca e colocado em tubos de ensaio de vidro, previamente lavados com solução salina, e levado à estufa (Olidef CZ) a 37°C por 1 hora para formação e distinção do precipitado (coagulado) do soro. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos a 22°C (eppendorf 5810R) e o soro foi aliquoteado e armazenado em freezer -80°C (Harris ELT-13V-85D34) para posterior análise de parâmetros sorológicos por meio de kits bioquímicos específicos (BioSystems, Espanha) lidos em espectrofotômetro automático A15 (BioSystems Analyzer) e respeitando o limite de detecção de cada protocolo.

4.14 Parâmetros Bioquímicos

- Disfunção hepática: foi avaliada através da determinação das enzimas AST e ALT presentes

no soro através de kits específicos (BioSystems, Espanha).

- Albumina e proteínas totais mensuradas a partir do soro por kits específicos (BioSystems, Espanha).

- Perfil lipídico: foram dosados triglicérides, colesterol total, LDL, VLDL e HDL a partir do soro por kits específicos (BioSystems, Espanha).

4.15 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Para comparação múltipla de resultados paramétricos foi utilizado ANOVA seguido de pós teste de Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Glicemia

Após sete dias de tratamento, os camundongos do grupo DS apresentaram um aumento da glicemia de jejum de 5,62% quando comparado ao primeiro dia. Os animais do grupo DHB apresentaram uma diminuição de 12,23% da glicemia; já os do grupo INS apresentaram uma diminuição de 62,67% em relação ao primeiro dia. Ambos os grupos apresentaram diferença significativa ($P < 0,001$) em relação ao grupo DS. No grupo DAQ ocorreu um aumento da glicemia de 11,09% quando comparado com o primeiro dia, apresentando diferença significativa ($P < 0,001$) quando comparado com o grupo INS e CS e diferença ($P < 0,01$) quando com comparado com o grupo DHB. O grupo DAQ não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) em relação com grupo DS.

No décimo quarto dia os animais do grupo DHB apresentaram uma queda no valor da glicemia de 37,80% e o INS 72,26%, quando comparados ao primeiro dia de tratamento. Ambos os grupos apresentaram diferença estatística ($P < 0,001$) em relação ao DS e DAQ. O grupo DAQ aumentou 8,25% em relação ao primeiro dia. Os animais do grupo DS tiveram um aumento de 12,38% em relação ao primeiro dia. O grupo DAQ em relação ao grupo DS e o grupo INS em relação ao grupo CS, não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) (Figura 2).

.

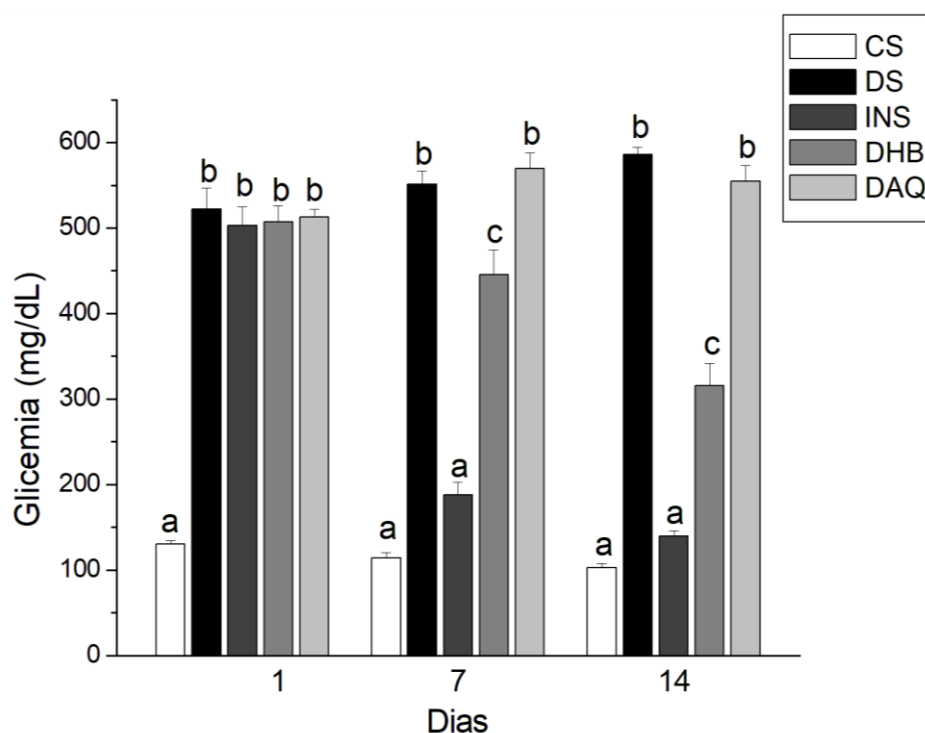


Figura 2. Glicemia de jejum (mg/dL) dos camundongos controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CS e DS), insulina (INS) e com extrato hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* (DHB e DAQ), respectivamente. Resultados expressos como média $\pm$ SEM, n=10. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.2 Corpos Cetônicos

No primeiro dia de tratamento, o grupo normoglicêmico (CS) apresentou diferença significativa ($P < 0,001$) quando comparado com os grupos diabéticos (DS, INS, DHB e DAQ). Já os grupos diabéticos, não apresentaram diferença ($P > 0,05$) quando comparados entre si.

Após sete dias de tratamento os grupos diabéticos tratado com o extrato hidroalcoólico de *B. holophylla* (DHB) e com insulina (INS) apresentaram uma diminuição nos corpos cetônicos presentes no sangue que os diferenciou significativamente ($P < 0,001$) com o grupo diabético controle (DS) e não se diferenciaram significativamente ($P > 0,05$) do grupo normoglicêmico (CS). Camundongos diabéticos que receberam o extrato hidroalcoólico, não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparado com o grupo diabético tratado com insulina (INS). O grupo controle não diabético (CS) apresentou diferença significativa ($P < 0,001$) quando comparado com os grupos diabéticos controle (DS), e os tratados com o extrato de *B. holophylla* tanto o hidroalcoólico (DHB) quanto o aquoso (DAQ). Entretanto, não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) quando

comparado com o diabético tratado com insulina (INS).

No decimo quarto dia tanto os grupos diabéticos tratados (DAQ, DHB e INS) quanto o controle normoglicêmico (CS), apresentaram uma diminuição que os diferiram ($P<0,001$) do grupo diabético controle (DS). O grupo diabético tratado com o extrato aquoso (DHB) não apresentou diferença quando comparado com os grupos diabéticos tratado com insulina (INS) e com extrato aquoso (DAQ), mas apresentou uma diferença ($P<0,05$) quando comparado com o grupo controle (CS). Já o grupo tratado com o extrato aquoso (DAQ), apresentou uma diferença ($P<0,05$) quando comparado com o grupo diabético tratado com insulina (INS) e uma diferença ($P>0,01$) quando comparado com o grupo controle (CS) (Figura 3).

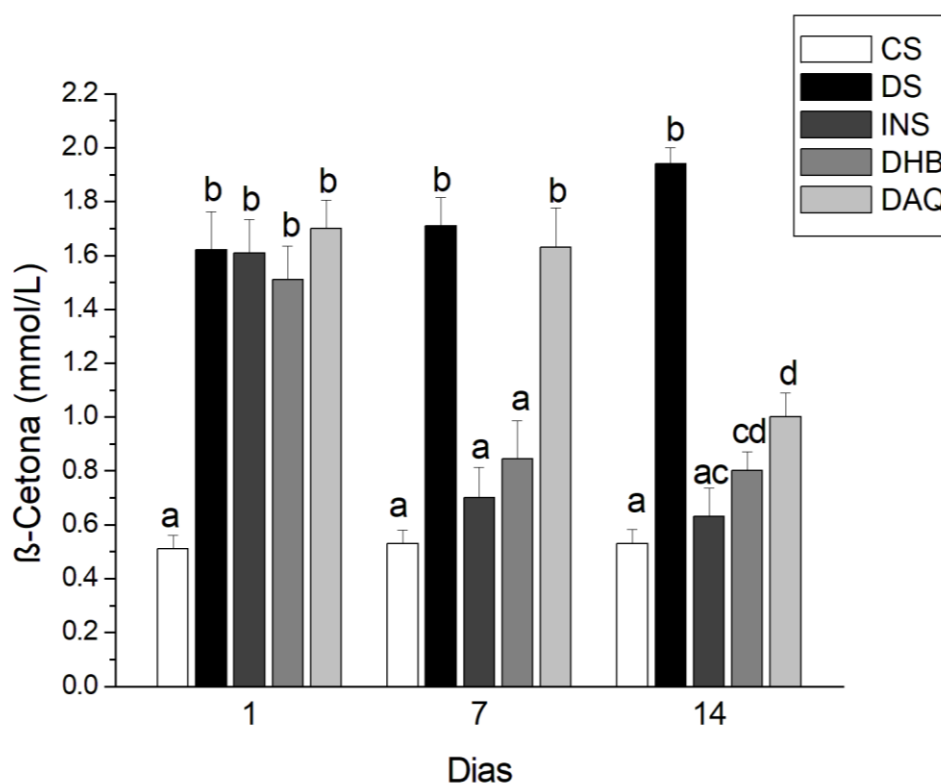


Figura 3. β -Cetona dos camundongos controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CS e DS), insulina (INS) e com extrato hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* (DHB e DAQ), respectivamente. Resultados expressos como média $\pm$ SEM, $n=10$. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de Tukey, $p<0,05$.

5.3 Ingestão Hídrica e Alimentar

Os animais do grupo DHB e INS tiveram ingestão alimentar significativamente menor ($P<0,001$) em relação aos grupos diabéticos controle (DS) e tratado com extrato aquoso (DAQ). O tratamento com o extrato hidroalcoólico (DHB) não causou uma diminuição na ingestão alimentar como o tratamento com insulina (INS) ocasionou, tornando-os assim diferente significativamente ($P<0,01$). Os camundongos diabéticos DAQ apresentaram diferença significativa ($P<0,01$) quando comparados com os animais do grupo DS. Todos os grupos diabéticos (DS, DAQ e DHB) apresentaram um aumento na ingestão alimentar significativo ($P<0,001$) em relação ao grupo controle (CS) (Figura 4).

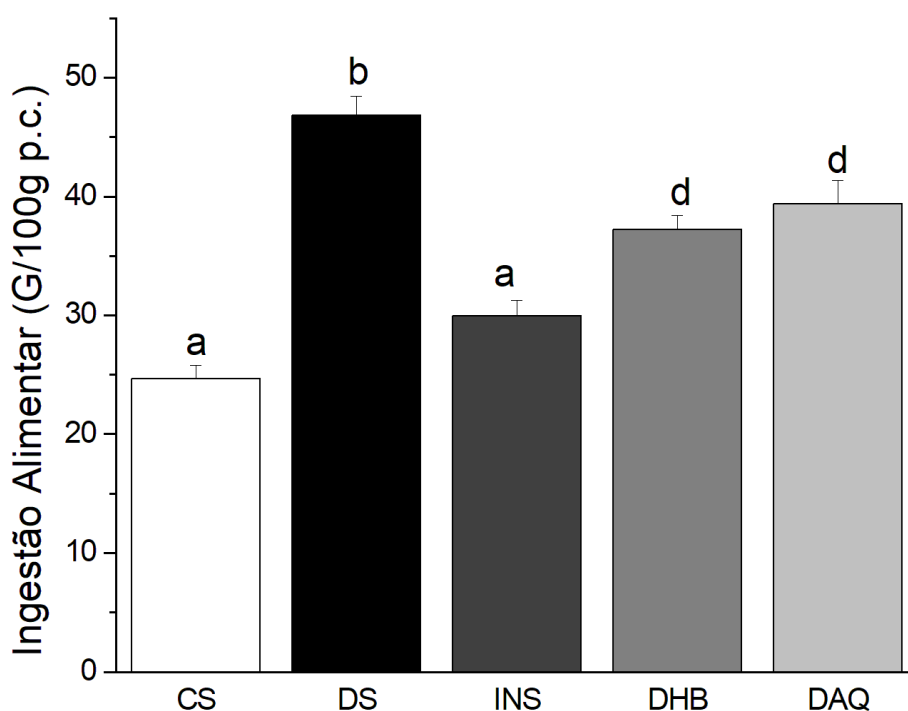


Figura 4. Ingestão alimentar (G/100g p.c) dos camundongos controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CS e DS), insulina (INS) e com extrato hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* (DHB e DAQ), respectivamente. Resultados expressos como média $\pm$ SEM, $n=10$. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de Tukey, $p<0,05$.

Na ingestão hídrica todos os grupos (CS, DS, INS, DHB e DAQ) apresentaram diferença significativa ($P<0,001$) quando comparados entre si (Figura 5).

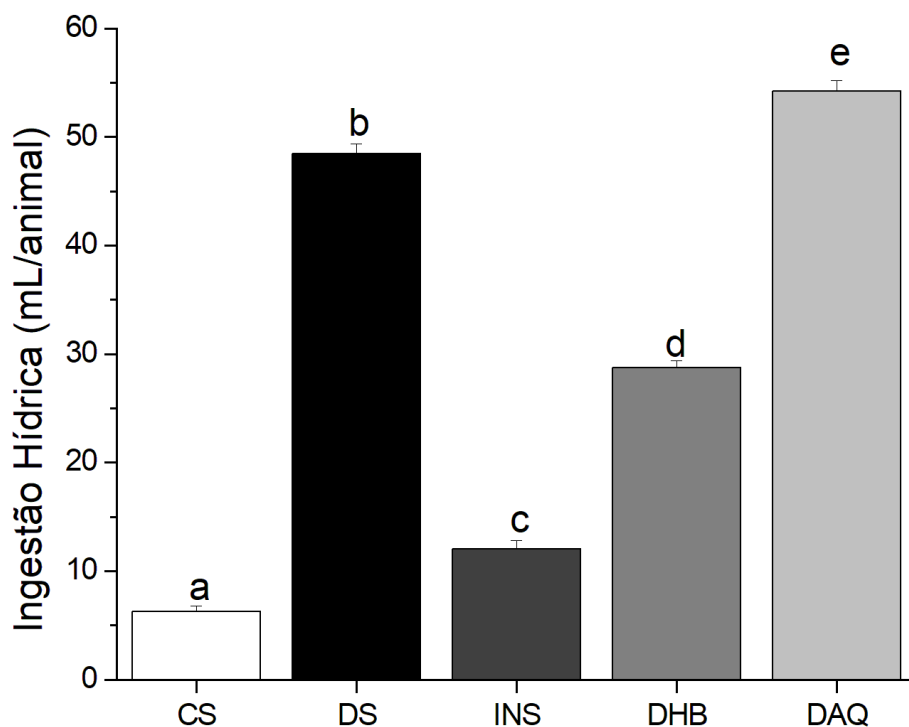


Figura 5. Ingestão hídrica (mL/animal) dos camundongos controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CS e DS), insulina (INS) e com extrato hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* (DHB e DAQ), respectivamente. Resultados expressos como média $\pm$ SEM, n=10. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de *Tukey*, $p < 0,05$.

5.4 Peso dos órgãos

Após os quatorze dias de tratamento, o peso do baço não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos (Tabela 2).

O peso do coração dos grupos diabético tratado com o extrato hidroalcoólico (DHB), com insulina (INS) e normoglicêmico (CS), não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparado entre si. O grupo DHB apresentou uma diminuição ($P < 0,05$) no peso do coração quando comparado com o grupo diabético sem tratamento (DS). Já o grupo tratado com insulina apresentou uma diminuição ($P < 0,01$) quando comparado com o grupo DS. O grupo diabético tratado com o extrato aquoso não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparado com o grupo DS. Os animais do grupo DHB apresentaram diminuição ($P < 0,05$) no peso do coração quando comparado com o grupo DAQ. O grupo diabético sem tratamento apresentou um aumento ($P < 0,001$) quando comparado com o grupo normoglicêmico (CS) (Tabela 2).

O peso do fígado dos grupos DAQ e DHB não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$)

quando comparados entre si. O grupo DHB apresentou um aumento no peso do fígado significativo ($P<0,001$) quando comparado com o grupo diabético controle (DS). O grupo DAQ apresentou um aumento significativo ($P<0,01$) do peso do fígado quando comparado com o grupo DS. O grupo diabético tratado com insulina apresentou um aumento significativo ($P<0,001$) no peso do órgão quando comparado com os grupos DAQ e DHB. Os três grupos diabéticos (DS, DAQ e DHB) apresentaram uma redução significativa ($P>0,001$) no peso do fígado quando comparado com o grupo normoglicêmico (CS) (Tabela 2).

O músculo gastrocnêmio dos grupos diabético tratado com extrato hidroalcoólico (DHB), aquoso (DAQ) e insulina (INS) não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) quando comparado entre si. Os animais do grupo DHB tiveram um aumento significativo ($P<0,05$) quando comparado com o grupo diabético sem tratamento (DS). O grupo DAQ não apresentou diferença ($P>0,05$) quando comparado com o grupo DS. O grupo INS apresentou um aumento significativo do peso do gastrocnêmio ($P<0,001$) quando comparado com o grupo DS. Os dois grupos diabéticos tratados com os extratos (DAQ e DHB) apresentaram uma diminuição ($P<0,01$) no peso dos músculos quando comparado com o grupo CS. O grupo INS não apresentou diferença estatística ($P>0,05$) quando comparado com o grupo CS (Tabela 2).

Os rins do grupo tratado com o extrato hidroalcoólico (DHB) apresentou uma diminuição significativa ($P<0,001$) quando comparado com o grupo tratado com o extrato aquoso (DAQ). O grupo DHB não apresentou diferença significativa ($P>0,05$) quando comparado com o grupo diabético tratado com insulina (INS). O grupo INS e CS apresentaram uma redução no peso dos rins significativa ($P<0,001$) quando comparado com o grupo DS. Os grupos DAQ e DHB não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) quando comparado com o grupo DS e apresentaram um aumento significativo ($P<0,001$) quando comparado com o grupo CS (Tabela 2).

Tabela 2. Peso relativo dos órgãos (mg/Kg) após 14 dias dos grupos controle (CS) e diabéticos tratados com salina (DS), insulina (INS), extrato hidroalcoólico (DHB) e aquoso (DAQ).

Peso relativo dos órgãos (mg/Kg)	CS	DS	INS	DHB	DAQ
Baço	3,35±0,23a	3,95±0,19a	3,48±0,38a	3,80±0,40a	3,79±0,38a
Coração	4,39±0,12a	6,26±0,24b	4,62±0,23a	5,24±0,14a	6,32±0,37b
Fígado	61,45±1,62a	41,85±1,17b	64,95±1,30a	52,48±1,45c	50,06±1,49c
Gastrocnêmio	10,70±0,40a	7,46±0,25b	9,74±0,41ac	8,97±0,36c	8,68±0,30bc
Rim	12,22±0,39a	17,87±0,72b	13,99±0,64ac	15,81±0,57bc	19,38±0,58b

Valores expressões como média ± EPM, n=10. Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.5 Peso Corpóreo

Os grupos DHB e DAQ não apresentaram diferença significativa ($P < 0,001$) no peso no sétimo dia de tratamento em relação ao grupo DS. Entretanto, no décimo quarto dia, os animais tiveram um aumento de peso que os tornaram diferente significativamente ($P < 0,001$) dos camundongos do grupo DS. Os camundongos do grupo INS tanto no sétimo dia quanto no décimo quarto dia, apresentaram ganho de peso significativo ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo DS. Quando comparado o grupo INS com os animais do grupo CS, eles apresentam uma perda de peso significativa ($P < 0,05$) tanto no sétimo quanto no decimo quarto dia. Os grupos diabéticos tratados (INS, DAQ e DHB) não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre si tanto no sétimo quanto no decimo quarto dia. Tanto os animais diabéticos tratados com extrato de *B. holophylla* (DHB e DAQ), quanto os diabéticos controle (DS) apresentaram perda de peso significativa ($P < 0,001$) no sétimo e decimo quarto dia de tratamento (Tabela 3).

Tabela 3. Peso corpóreo do grupo controle e diabéticos tratados com salina (CS e DS), insulina (INS), extrato hidroalcoólico (DHB) e extrato aquoso (DAQ).

Peso (g)	CS	DS	INS	DHB	DAQ
1 Dia	40,05± 1,07 a	33,24± 1,56 b	31,30± 1,90 b	32,15± 1,63 b	33,26± 1,16 b
7 Dia	42,18± 1,78 a	28,90± 1,19 b	36,08± 1,99 c	33,62± 1,12 b c	33,19± 1,01 b
14 Dia	44,28± 1,55 a	26,53± 1,05 b	40,11± 1,60 c	35,81± 1,92b c	36,61± 1,85 c

Resultados expressos como média ± SEM, n=10. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de *Tukey*, $p < 0,05$.

5.6 IpITT

O teste de tolerância à insulina (IpITT) demonstrou que os camundongos diabéticos tratados com o extrato hidroalcoólico, aquoso e insulina (DHB, DAQ e INS) se mostraram estatisticamente ($P < 0,001$) mas sensíveis à administração de insulina intraperitoneal quando comparados com o grupo diabético não tratado (DS) e não apresentaram diferença ($P > 0,05$) quando comparados entre si. Os três grupos diabéticos DBH, DAQ e DS apresentaram diferença ($P > 0,001$), enquanto o grupo INS apresentou uma diferença ($P < 0,01$) em relação ao grupo CS (Figura 7).

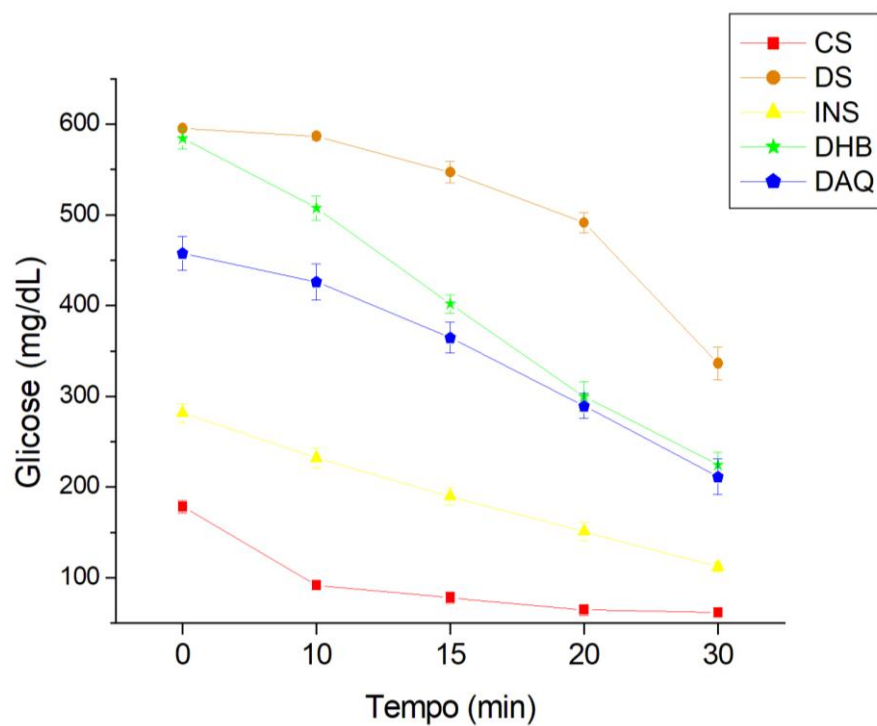


Figura 6. Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT), nos camundongos controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CS e DS), insulina (INS) e com extrato hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* (DHB e DAQ), respectivamente. Resultados expressos como média $\pm$ SEM, n=10. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de Tukey, $p < 0,05$.

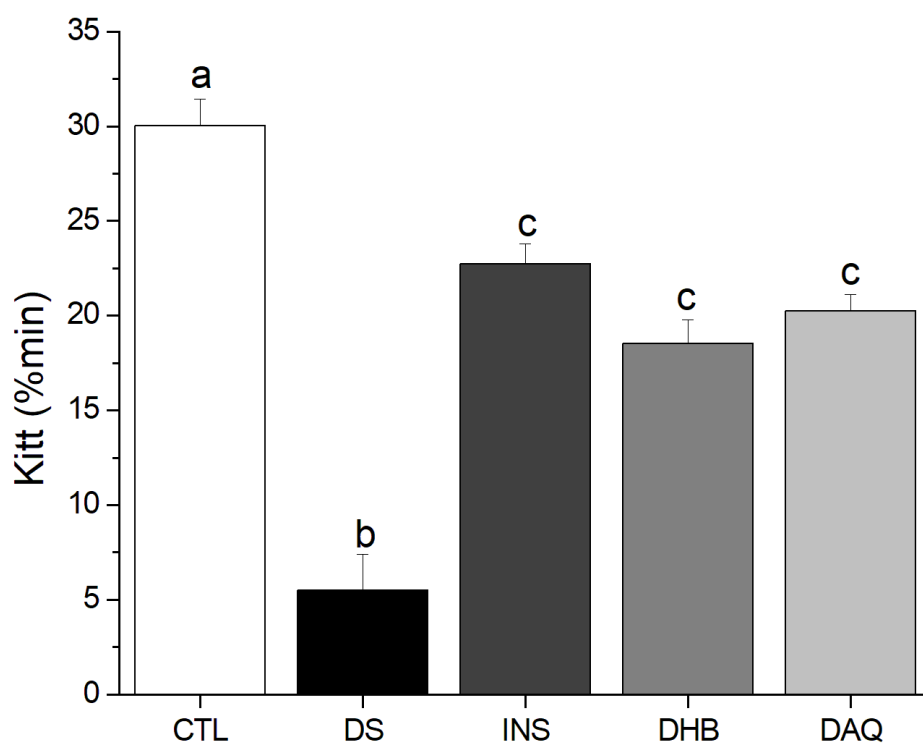


Figura 7. Cinética de decaimento da glicose (KITT). Camundongos controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CS e DS), insulina (INS) e com extrato hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* (DHB e DAQ), respectivamente. Resultados expressos como média $\pm$ SEM, $n=10$. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de Tukey, $p<0,05$.

5.7 IpGTT

Os resultados revelaram que os camundongos tratados com o extrato hidroalcoólico de *B. holophylla* (DHB) apresentaram maior tolerância à glicose quando comparado aos animais diabéticos controle (DS), os tratados com insulina (INS) ($P<0,01$) e os tratados com extrato aquoso e *B. holophylla* (DAQ) (Figura 9).

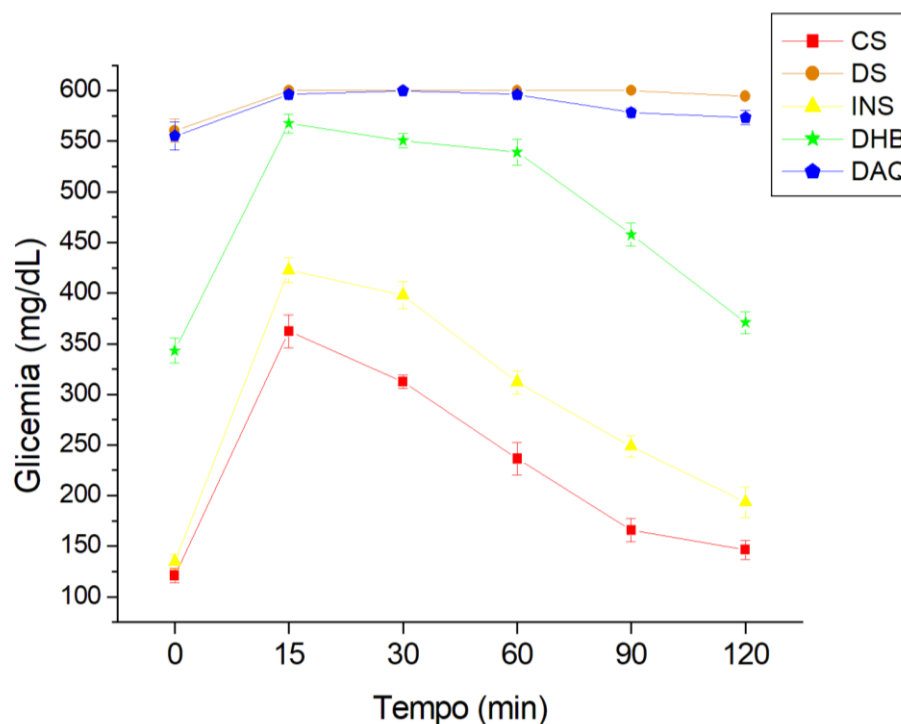


Figura 8. Valores referentes ao teste de tolerância à glicose (GTT), dos camundongos controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CS e DS), insulina (INS) e com extrato hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* (DHB e DAQ), respectivamente. Resultados expressos como média $\pm$ SEM, $n=10$. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de Tukey, $p<0,05$.

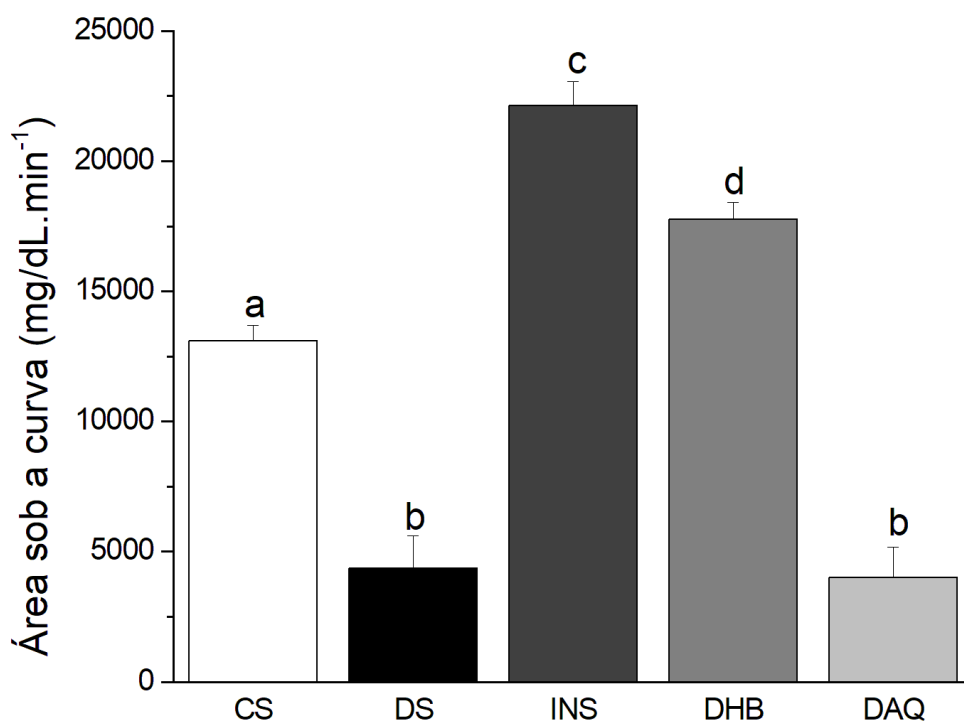


Figura 9. Gráfico de área sob a curva. Camundongos controles normoglicêmicos e diabéticos

tratados com salina (CS e DS), insulina (INS) e com extrato hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* (DHB e DAQ), respectivamente. Resultados expressos como média $\pm$ SEM, n=10. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de Tukey, $p<0,05$.

5.8 IpPTT

O teste de tolerância ao piruvato (IpPTT) revelou que os camundongos diabéticos tratados com o extrato hidroalcoólico (DHB) e insulina (INS) tem um aumento ($P<0,001$) do grau de sensibilidade hepática à insulina em relação aos grupos diabético controle (DS) e diabéticos tratados com o extrato aquoso (DAQ). Os animais do grupo DHB e INS não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$) quando comparados entre si ou com o grupo de animais normoglicêmico (CS). O grupo DAQ e DS apresentam uma diminuição estatística ($P<0,001$) quando comparado com o grupo CS. Também, os grupos DAQ e DS não apresentam diferença estatística ($P>0,05$) um em relação ao outro (Figura 11).

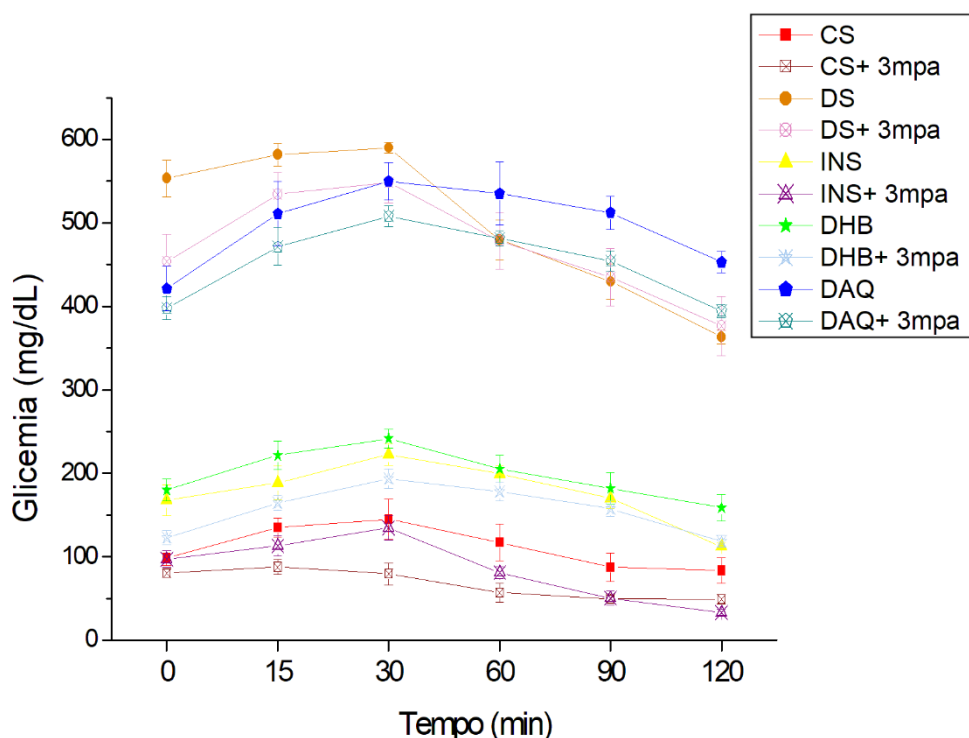


Figura 10. Valores referentes ao teste de resistência ao piruvato (PTT), dos camundongos controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CS e DS), insulina (INS) e com extrato hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* (DHB e DAQ), respectivamente. Resultados expressos como média $\pm$ SEM, n=10. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de Tukey, $p<0,05$.

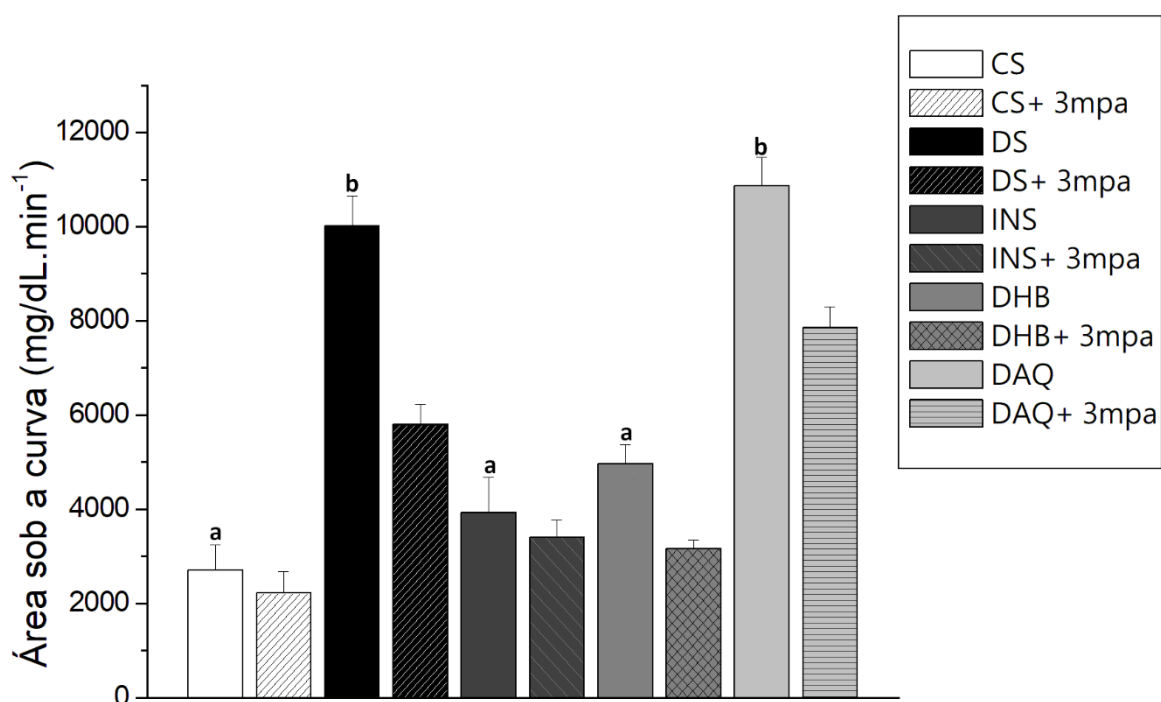


Figura 11. Gráfico de área sob a curva. Camundongos controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CS e DS), insulina (INS) e com extrato hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* (DHB e DAQ), respectivamente. Resultados expressos como média $\pm$ SEM, n=10. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de *Tukey*, $p < 0,05$.

5.9 Glicogênio Hepático

Os grupos diabéticos tratados tanto com o extrato aquoso, quanto com o extrato hidroalcoólico (DAQ e DHB) não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparados entre si, mas quando comparado com o grupo diabético controle (DS), tiveram um aumento significativo ($P < 0,001$) na quantidade de glicogênio armazenado. Entretanto, quando comparados ao grupo normoglicêmico (CS), apresentaram uma queda significativa ($P > 0,01$) na armazenagem do glicogênio hepático. O grupo INS, apresentou um aumento ($P < 0,001$) no glicogênio aumentando quando comparado o DS, o grupo INS também não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparado com os grupos diabéticos tratados (DHB e DAQ) e não apresentou diferença ($P > 0,05$) em relação ao CS. O grupo DS apresentou uma diminuição significativa ($P < 0,001$) na armazenagem de glicogênio hepático, quando comparado com o grupo CS (Figura 12).

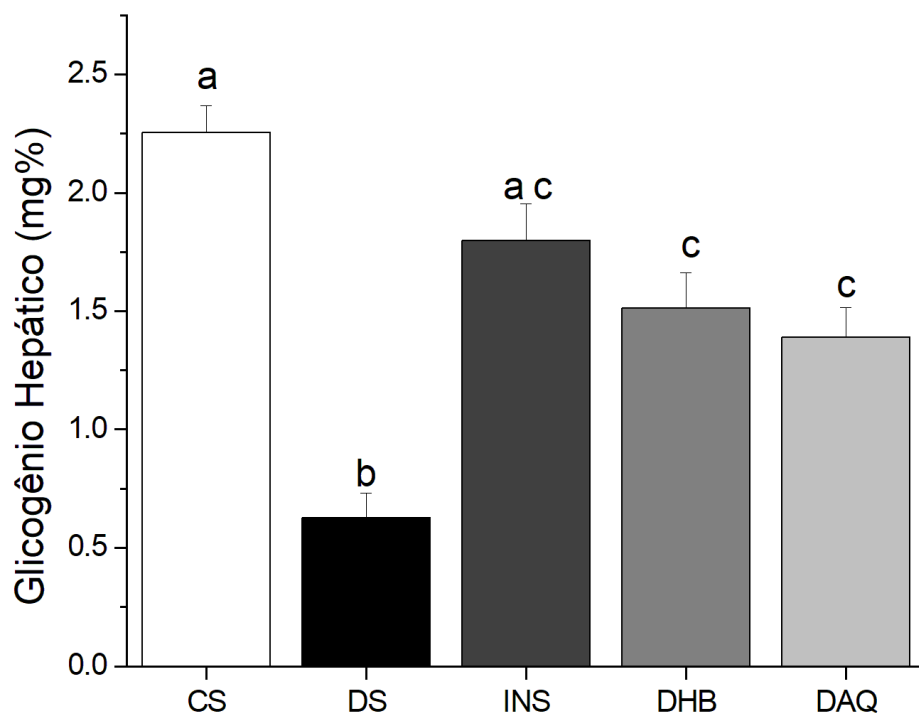


Figura 12. Glicogênio hepático (mg%) dos camundongos controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CS e DS), insulina (INS) e com extrato hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* (DHB e DAQ), respectivamente. Resultados expressos como média $\pm$ SEM, n=10. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de *Tukey*, $p < 0,05$.

5.10 Glicogênio Muscular

Os grupos diabéticos tratados ou não com o extrato aquoso e hidroalcoólico (DS, DAQ e DHB) não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$) quando comparados entre si, entretanto apresentaram queda significativa ($P < 0,001$) no armazenamento do glicogênio muscular quando comparado com os grupos controle normoglicêmico (CS) e diabético tratado com insulina (INS). O grupo INS não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) em relação ao grupo CS no armazenamento de glicogênio muscular.

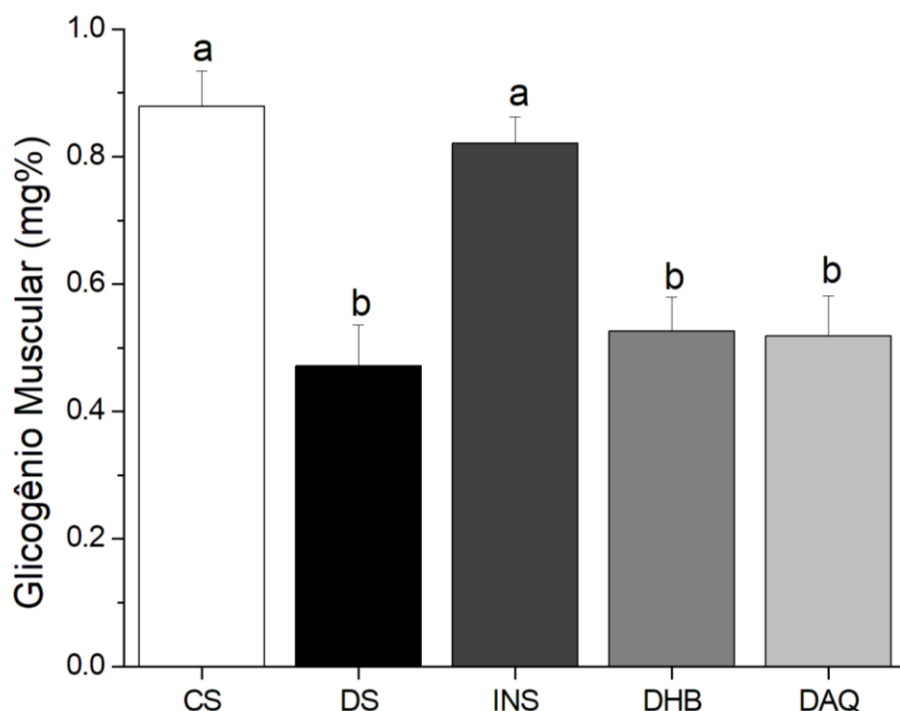


Figura 13. Glicogênio muscular (mg%) dos camundongos controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CS e DS), insulina (INS) e com extrato hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* (DHB e DAQ), respectivamente. Resultados expressos como média $\pm$ SEM, n=10. Letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.11 Parâmetros Bioquímicos Plasmáticos

Os camundongos tratados por 14 dias com o extrato hidroalcoólico (DHB) e com o extrato aquoso (DAQ) apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,001$) nos níveis séricos de ALT quando comparado com o grupo diabético controle (DS). Os animais pertencentes ao grupo DHB tiveram uma diminuição significativa ($P < 0,01$) quando comparados com os animais do grupo DAQ. Os grupos diabéticos tratados com os extratos (DHB e DAQ) e não tratado (DS) tiveram um aumento significativo ($P < 0,001$) quando comparado com o grupo controle normoglicêmico (CS). Já o grupo diabético tratado com insulina (INS) apresentou um aumento ($P < 0,01$) quando comparado ao grupo CS e uma diminuição ($P < 0,001$) quando comparado com os outros 3 grupos diabéticos (Tabela 4).

Os níveis séricos de AST nos animais que receberam o extrato aquoso, hidroalcoólico e insulina (DAQ, DHB e INS) apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,001$) quando comparado com os animais do grupo que não receberam tratamento (DS). Os animais do grupo INS

não apresentaram diferença estatística quando comparado com os grupos CS e DHB, mas apresentou uma diminuição estatística ($P < 0,001$) quando comparado com o grupo DAQ. Os animais DHB apresentaram uma diminuição ($P < 0,001$) nos níveis de AST quando comparados com os animais do grupo DAQ. Os grupos diabéticos DHB, DAQ e DS apresentaram um aumento ($P < 0,001$) quando comparado com o grupo normoglicêmico CS (Tabela 4).

Os níveis de proteínas totais séricos dos grupos DHB, DAQ e INS não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparados com o grupo CS e quando comparados entre si. O grupo INS apresentou um aumento ($P < 0,05$) nos níveis de proteína total, o grupo CS apresentou um aumento ($P < 0,01$) e o grupo DAQ um aumento ($P < 0,001$) em comparação ao grupo DS. O grupo DHB não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) em comparação ao grupo DS.

Os animais pertencentes ao grupo DHB, DAQ e INS não apresentaram diferença ($P > 0,05$) nos níveis de albumina séricas quando comparado com os grupos diabético controle DS e controle normoglicêmico (CS). O grupo CS apresentou um aumento ($P < 0,05$) nos níveis de albumina em comparação ao grupo DS (Tabela 4).

A quantidade de colesterol total não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) quando se compara os grupos CS, INS, DHB e DAQ entre si. Os dois grupos tratados com os extratos (DHB e DAQ) apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,01$) quando comparado com o grupo DS. Já os grupos INS e CS apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,001$) na quantidade de colesterol quando comparado com o grupo DS (Tabela 4).

Os grupos CS, INS, DHB não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) quando comparados entre si. Entretanto, todos eles apresentaram um aumento significativo ($P < 0,001$) no conteúdo de colesterol HDL quando comparado com os grupos DS e DAQ. Os grupos DS e DAQ não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre si (Tabela 4).

Animais do grupo DHB, DAQ e INS apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,001$) nos níveis de triglicerídeos quando comparados ao grupo diabético não tratado (DS). Entretanto, quando comparado com o grupo controle (CS), o grupo INS não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$). O grupo DHB apresentou um aumento ($P < 0,01$) e o grupo DAQ apresentou um aumento

($P<0,001$). Os grupos INS, DAQ e DHB não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) quando comparados entre si (Tabela 4).

Os níveis de LDL séricos não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) quando comparado os grupos CS, INS, DHB e DAQ. Apenas o grupo DS apresentou um aumento nos níveis de LDL quando comparado aos demais grupos CS e DAQ ($P<0,01$) e INS E DHB ($P<0,001$) (Tabela 4).

Os grupos DHB, DAQ e INS apresentaram uma diminuição significativa ($P<0,001$) nos níveis de VLDL quando comparados com o grupo DS. Entretanto, não apresentaram diferença ($P>0,05$) quando comparados entre si. Os animais do grupo INS não apresentou diferença ($P>0,05$) quando comparado com o grupo CS. Os animais do grupo DHB apresentaram um aumento significativo ($P<0,01$) quando comparado com o grupo CS. Os animais do grupo DAQ e DS apresentaram um aumento ($P<0,001$) em comparação com o grupo CS (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros Bioquímicos Plasmáticos (mg/dL) após 14 dias dos grupos controle (CS) e diabéticos tratados com salina (DS), insulina (INS), extrato hidroalcoólico (DHB) e aquoso (DAQ).

Parâmetros Bioquímicos Plasmáticos (mg/dL)	CS	DS	INS	DHB	DAQ
AST	145±2,95a	236±3,10b	155±2,84ac	166±2,96c	184±2,93d
ALT	55,2±1,84a	126,1±2,39b	66,8±2,20c	83,5±2,28d	94,2±2,11e
Colesterol Total	72,6±3,82a	113±5,56b	79,9±4,99a	86,5±4,62a	84,9±5,43a
Triglicérides	80,4±2,45a	131±2,89b	87,3±2,60ac	94,5±3,13c	98,7±3,20c
LDL	16,6±2,61a	37,0±4,96b	12,8±3,63a	11,1±3,98a	16,9±3,36a
VLDL	16,1±0,50a	26,3±0,58b	17,5±0,52ac	18,9±0,63c	19,8±0,64c
HDL	70± 2,17a	50±2,58b	67±1,68a	66±1,75a	52±1,81b
Proteína Total	4,9±0,14a	3,8±0,16b	4,7±0,16a	4,5±0,28ab	5,2±0,24a
Albumina	2,30±0,12a	1,71±0,13b	2,10±0,14ab	2,20±0,15ab	1,98±0,15ab

Valores expressões como média ± EPM, n=08. Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença significativa; ANOVA seguido de pós teste de Tukey, $p<0,05$

6. DISCUSSÃO

O DM é considerado uma associação de doenças heterogêneas, que tem em comum o aumento das concentrações de glicose no sangue, ou seja, hiperglicemia. A hiperglicemia é um sintoma grave que ocasiona vários outros sintomas clássicos do DM como polidipsia, polifagia, poliúria, fadiga, perda de desempenho, perda de peso, distúrbios visuais, suscetibilidade a infecções para cetoacidose e síndrome hiperosmolar não cetoacidótica com risco de coma, além de a longo prazo ocasionar disfunções de vários tecidos e órgãos (olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos) (Harreiter & Roden, 2019).

Tratar a hiperglicemia visa resolver a curto prazo os sintomas como polidipsia, polifagia, poliúria e perda de peso, e à prevenção e retardação de complicações crônicas e morte associados ao DM a longo prazo (OMS, 2018). A redução dos níveis glicêmicos pode empregar o uso de medicamentos antidiabéticos, quando intervenções como alimentação saudável e a prática de exercícios não atinjam os níveis glicêmicos desejáveis (SBD, 2015).

O tratamento de camundongos diabéticos induzidos por STZ durante quatorze dias consecutivos com o extrato hidroalcoólico de *B. holophylla* foi capaz de diminuir a glicemia desses animais em comparação ao grupo de animais diabéticos que não receberam tratamento. Os animais tratados com o extrato aquoso de *B. holophylla* não tiveram diminuição glicemia, provavelmente pelo fato de que no extrato aquoso existe a presença de açúcares (0-30mm) que ocasionam o aumento da glicemia (Figura 1).

A ação hipoglicemiante provinda de plantas medicinais, geralmente está relacionada com uma possível estimulação da secreção de insulina, regulação da captação das moléculas de glicose no intestino, função da inibição e absorção de carboidratos pela inibição da α -glicosidase (Valle, 2016). A inibição dessa enzima aumenta o tempo necessário para que os carboidratos ingeridos sejam absorvidos, reduzindo assim a glicemia sanguínea. (Kappel *et al.*, 2013). Outra enzima relacionada com a diminuição da glicemia é a α -amilase, que limita a digestão de amido (Williamson, 2013). O extrato hidroalcoólico de *B. holophylla* é capaz de inibir tanto a α -glicosidase quanto a α -amilase

(Camaforte, 2019).

A cetoacidose diabética é consequência da elevada taxa de gliconeogênese do organismo. Em uma situação de ausência de insulina, o organismo, mesmo possuindo alto teor de glicose no sangue, começa a produzir glicose de fontes que não são carboidratos. Isso se deve ao fato de a glicose não penetrar em ritmo e quantidade adequados nas células, situação similar ao jejum prolongado. Nessa tentativa, ocorre a quebra de lipídios, que no processo de seu metabolismo, liberam cetonas. A alta taxa dessas quebras acarreta altos níveis de corpos cetônicos, que são tóxicos, causando diversos malefícios, dentre eles, a cetoacidose diabética. (ADA, 2022; Gebel, 2018). O tratamento com os extratos aquoso e hidroalcoólico de *B. holophylla* em camundongos diabéticos induzidos por STZ durante quatorze dias consecutivos foi capaz de diminuir a concentração de corpos cetônicos no sangue desses animais em comparação ao grupo de animais diabéticos sem tratamento.

O fígado é considerado o órgão fundamental para a manutenção da homeostase da glicose, porque é por meio dos processos de glicogênese, glicogenólise e gliconeogênese, que ele fornece glicose ao organismo ou retira glicose da circulação, aumentando a síntese de glicogênio (Yan, 2015).

A homeostase da glicose só é alcançada pela regulação e ação coordenadas de enzimas envolvidas na produção e utilização de glicose. A insulina influencia na utilização intracelular de glicose de diversas maneiras, seja ativando enzimas glicolíticas ou inibindo enzimas gliconeogênicas, para que assim, o organismo possa conseguir a regulação da glicose no sangue. A resistência e/ou deficiência à insulina é uma característica do diabetes que prejudica a utilização periférica de glicose com um aumento da produção hepática de glicose. O glicogênio é uma forma armazenável de glicose no tecido muscular e hepático. Sob condições fisiológicas, a insulina aumenta a deposição intracelular de glicogênio pelo estímulo da glicogênio sintase e inibição da atividade da glicogênio fosforilase. Essa função regulatória da insulina é prejudicada em organismos diabéticos (Chandrasekaran *et al.*, 2018), justificando a depleção dos níveis de glicogênio hepático e muscular dos camundongos diabéticos do grupo tratados com salina (DS).

Os resultados do presente estudo mostraram um aumento no conteúdo de glicogênio hepático

em camundongos diabéticos após o tratamento com os extratos hidroalcoólico ou aquoso de *B. holophylla*, mesmo na ausência de insulina. Isso demonstra que a modulação causada pelos extratos pode ocorrer por meio do metabolismo de glicose, armazenando a glicose do organismo, ou por estimulação da síntese de glicogênio por vias independentes de insulina (Camaforte, 2013).

O DM, como já dito, está associado à polifagia, polidipsia e perda de peso corporal. A ausência de insulina gera uma desregulação nos centros de fome e saciedade, localizados no núcleo hipotalâmico centro-medial. Nessa situação, corre a inibição do centro de saciedade, aumentando a ingestão de alimentos no organismo diabético (Chandrasekaran *et al.*, 2018). Considerando que o centro de saciedade precisa captar glicose para ser inibido, e que essa captação é estimulada por insulina, essa inibição não acontece, mantendo assim, uma sensação constante de fome e levando o organismo diabético a comer constantemente (Jacobson, 1996). Os camundongos tratados com extrato hidroalcoólico e aquoso tiveram uma redução na quantidade de alimento consumido.

A desidratação que ocorre no organismo diabético devido à alta concentração, basicamente constante, de glicose no sangue, ocasiona elevação da concentração osmótica, percebida pelos osmorreceptores, levando à produção de arginina vasopressina (AVP). A AVP é o principal hormônio envolvido na regulação do metabolismo de fluidos corporais, responsável pela sensação de sede, no caso de diabéticos, constante (Refardt, 2020). O tratamento com o extrato hidroalcoólico resultou numa menor ingestão hídrica, devido à redução dos níveis de glicose sanguíneo circulante.

O estado hiperglicêmico gerado tanto pelo diabetes do tipo 1 ou 2, ocasiona uma série de fatores que podem afetar o coração, como, por exemplo, aumento da produção de espécies reativas a oxigênio e nitrogênio, acúmulo de produtos finais de glicação avançada, disfunção do manejo de cálcio intracelular comprometendo a função cardíaca, aumento da matriz extracelular e fibrose cardíaca. Todos esses fatores levam ao deterioramento da função do coração por hipertrofia, fibrose miocárdica e disfunção diastólica. Além disso, no coração existem estruturas compostas de tecido conjuntivo que além de o sustentarem, também fornecem a inserção a musculatura. Pelas lesões nas coronárias ocasionadas pelo DM, as plaquetas se agregam com mais facilidade devido à glicolização do colágeno, e assim, estimulam a produção do fator de crescimento, o que causa o aumento da

espessura da membrana basal e o estreitamento dos vasos. O aumento do coração é ocasionado pelo avanço da idade e também por patologias, como o diabetes (Diniz et al., 2011 e Tate et al., 2017). O peso do coração dos ratos diabéticos tratados com o extrato hidroalcoólico apresentou uma diminuição quando comparado com o grupo diabético controle, demonstrando assim, que o tratamento com o extrato hidroalcoólico apresenta uma função cardioprotetora diminuindo a hipertrofia sofrida no organismo diabético.

O aumento no peso do fígado pode ser explicado pelo aumento na quantidade de glicogênio hepático, que associado à uma perda de peso corpóreo ocasiona um discreto aumento no peso relativo desse órgão (Soares Filho., 2011)

O aumento do peso dos rins dos animais diabéticos pode ser explicado pelo fato das próprias complicações ocasionadas pelo DM. Assim como ocorre no coração, o DM também gera nos rins uma hiperplasia e hipertrofia que resultam no aumento de tamanho e peso desses órgãos (Forbes & Cooper, 2013; Smith, 2017). O aumento no peso dos rins só se mostrou diferente quando comparamos os grupos diabéticos com o grupo controle, demonstrando assim que o tratamento com os extratos não afeta os rins de forma negativa e que tais complicações ocorrem por conta da enfermidade.

Sarcopenia é a perda de massa muscular (cerca de 6% por década) que todo organismo sofre mediante ao envelhecimento. Tal perda pode ser potencializada por fatores genéticos, sedentarismo, tabagismo e o diabetes. Organismos diabéticos sofrem perda de peso por diversas causas adicionais, quais sejam, perda pela potencialização da sarcopenia, por desidratação, já que os altos níveis de glicose no sangue fazem com que ocorra uma poliúria (eliminação excessiva de urina), e pelo aumento da lipólise. A diminuição da oferta de nutrientes para as células no organismo diabético, contribui significativamente (ou é a principal causa) para a perda de peso, uma vez que, mesmo existindo alto teor de glicose no sangue, esta não consegue não consegue penetrar nas células, levando o organismo a recorrer a outras fontes para conseguir suprir suas demandas, o que causa alteração no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e aumento do catabolismo proteico. O aumento da proteólise leva à perda e/ou degradação de diversas proteínas inclusive proteínas estruturais, o que

ocasiona a perda da massa muscular e atrofia, afetando também ramos nervosos, vasos sanguíneos e contratilidade, que exercem função no reparo muscular (RAJAEI et al., 2015, Coleman, 2016; Hillson, 2017). O tratamento com os extratos hidroalcoólico e aquoso de *B. holophylla* foi capaz de impedir a perda de peso quando comparado com o grupo diabético controle. Apenas o grupo diabético tratado com insulina apresentou tecido adiposo branco detectável.

A resistência à insulina (RI) é uma condição na qual a insulina não consegue exercer sua função de maneira adequada, apesar de a secreção ou reposição exógena estarem adequadas e preservadas. Sendo assim, uma quantidade maior de insulina é necessária para exercer seu efeito. No DMT1, condição na qual não ocorre a produção e secreção de insulina, pouca atenção é dada a essa ocorrência, principalmente quando comparado ao DMT2. Entretanto, já é sabido que organismos DMT1 possuem essa característica e que altas concentrações de glicose sanguíneas ocasionam o desenvolvimento de resistência à insulina em tecidos periféricos (Simoniene, 2020 e Ordonez et al., 2006). O tratamento com os extratos aquoso e hidroalcoólico nos camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina, tornou os camundongos mais sensíveis à insulina que os camundongos diabéticos não tratados.

A RI causa um aumento da lipólise, que já está aumentada em organismo diabéticos, o que resulta numa maior quantidade de ácidos graxos livres para o fígado, gerando assim, um aumento de triglicerídeos (Savage & Semple, 2010). A RI também aumenta a produção de glicose hepática, considerando que é a insulina a inibidora da gliconeogênese, através da regulação da expressão de enzimas, e a ineficiência para inibir uma acentuada gliconeogênese, significa uma maior quantidade de glicose no sangue de organismos que já estão com quantidades tóxicas de glicose no sangue (Petersen et al., 2017). O fígado é o órgão responsável por manter a glicemia adequada na condição de jejum. Nos indivíduos com DM, devido à RI, seu organismo tem a capacidade de controlar sua produção de glicose endógena (gliconeogênese) afetada, tornando-se ainda mais hiperglicêmicos. Os camundongos tratados com ambos os extratos de *B. holophylla*, produziram menos glicose a partir do piruvato do que os animais diabéticos que não receberam tratamento, corroborando assim com os resultados demonstrados no ITT e mostrando que os extratos foram capazes de alterar o fígado dos

camundongos tornando-os mais sensíveis à insulina.

O teste de tolerância à glicose (GTT) possibilita verificar a capacidade do organismo de manter a homeostase glicêmica após receber uma sobrecarga de glicose, sendo considerado uma ferramenta para o diagnóstico ou confirmação do DM, já que a glicemia pode ser a única variável a ser detectada no início do DM, proveniente da perda na capacidade de secreção da insulina (SBD, 2017; SBPC, 2014). Nos resultados obtidos pelo tratamento com o extrato hidroalcoólico de *B. holophylla*, os camundongos se mostraram com maior tolerância à glicose quando comparados com os animais diabéticos sem tratamento. Nos grupos do diabético controle e diabético tratado com o extrato aquoso de *B. holophylla*, a glicemia manteve-se acima de 600 mg/dL ou muito perto disso e não diminuiu até o fim do experimento. Com isso, o cálculo da área sob a curva fica prejudicado. Assim, esses grupos foram excluídos da análise da área sob a curva. Isso ocorreu provavelmente porque o grupo diabético controle se encontra em um estado de intolerância à glicose devido seu DMT1 não controlado e seus níveis de glicemia em jejum já serem muito elevados. Já nos camundongos diabéticos tratados com o extrato aquoso de *B. holophylla*, como dito anteriormente, a presença de açúcares no extrato fez com que esses camundongos sofressem uma dupla sobrecarga de glicose, e assim, muito provavelmente não tiveram tempo hábil para realizar a metabolização.

Alterações em determinados parâmetros bioquímicos como colesterol, triglicerídeos, glicose, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), entre outros, podem estar relacionadas ao desenvolvimento ou agravamento de diversas doenças (Watanabe et al., 2022). O AST é quantificado porque, quando ocorrem lesões hepáticas, essa enzima que se encontra dentro dos hepatócitos dirige-se para o meio extracelular entrando na corrente sanguínea. Entretanto, a dosagem de AST não é um método muito específico, tendo em vista que ela pode ser encontrada em outros órgãos, sendo assim, seu aumento pode ser relacionado a danos localizados em outras regiões. Já a ALT, que também pode ser encontrada nos hepatócitos, porém é considerada específica para danos hepáticos, mesmo podendo ser encontrada em outros órgãos. Isso ocorre devido à quantidade de ALT, que é produzido mais abundantemente no fígado do que em outros órgãos (Varaldo, 2001; Liu et al., 2009). Os camundongos tratados com o extrato hidroalcoólico apresentaram níveis de AST

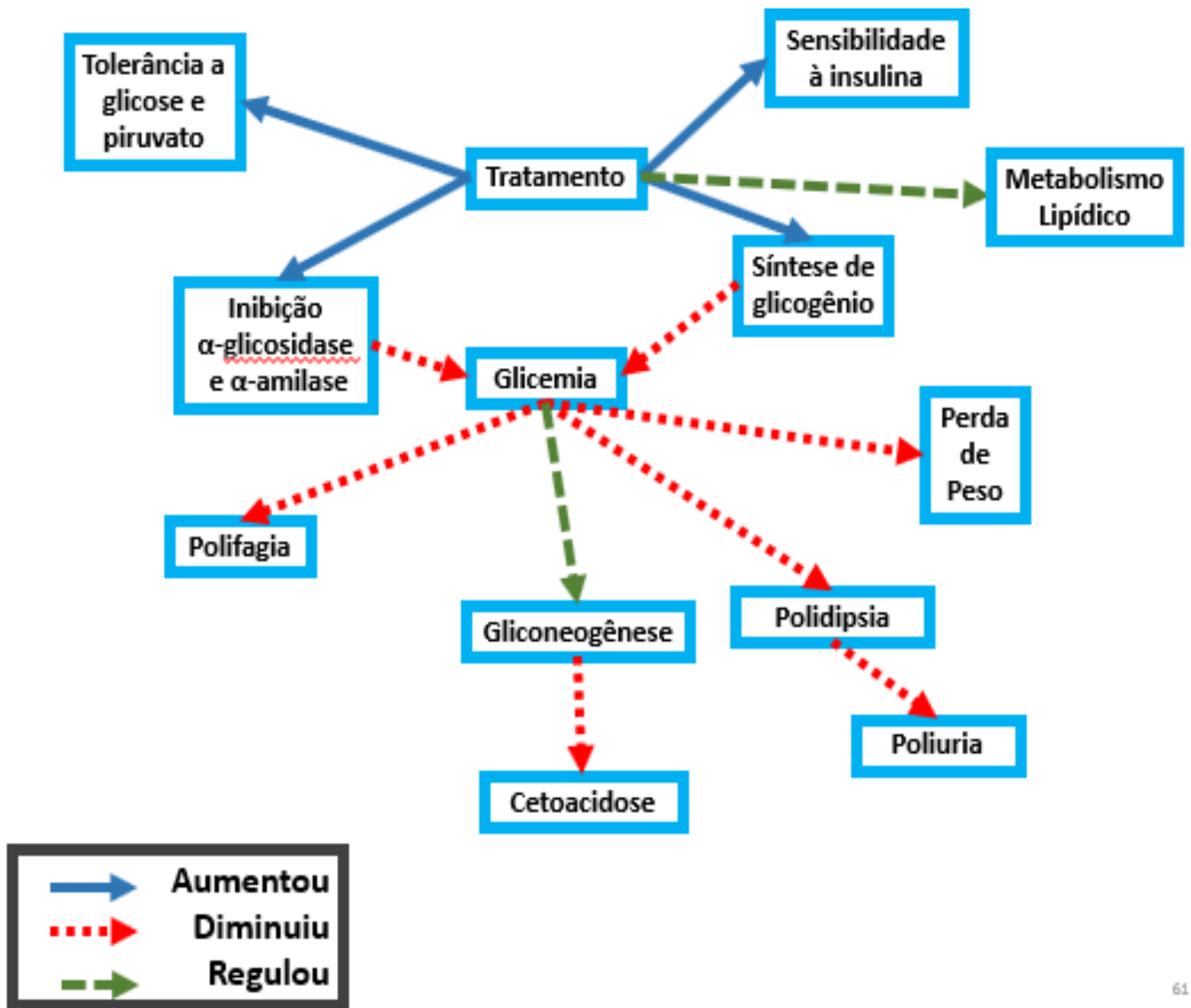
semelhantes ao grupo diabético tratado com insulina e menor que o grupo diabético não tratado. Já os níveis de ALT foram menores que no grupo diabético sem tratamento, mas maiores que no grupo tratado com insulina e controle. Os animais tratados com o extrato aquoso tiveram um aumento nos níveis tanto de AST quanto de ALT em relação aos demais grupos. A diminuição dos níveis séricos dessas enzimas só ocorreu quando comparado esse grupo ao diabético sem tratamento. O diabetes, assim como o câncer de fígado, hepatite, cirrose hepática e uso de toxinas, ocasiona o aumento dessas enzimas. Isso ocorre devido aos níveis elevados de glicose, de ácidos graxos livres e espécies reativas de oxigênio no sangue, que podem gerar danos hepáticos e assim levar à apoptose dos hepatócitos, elevando a concentração dessas enzimas. (Baynes & Thorpe, 1999; Palma et al., 2014; Falode et al., 2022). A elevação das enzimas AST e ALT nos camundongos tratados, então, é ocasionada pelas complicações que o diabetes causa no organismo diabético e não decorrentes de toxicidade dos extratos.

O diabetes ocasiona graves complicações, incluindo a nefropatia diabética (ND). ND pode ser considerado uma doença multifatorial, que pode evoluir para a completa insuficiência renal em caso do não tratamento. Os altos níveis de glicose no sangue ocasionam lesões renais. Além disso, os altos níveis de glicose obrigam o rim a aumentar sua capacidade de filtração, gerando uma sobrecarga no sistema renal. Essa hiperfiltração gera um aumento no volume total do rim, onde os glomérulos aumentam sua membrana basal para permitir uma maior superfície de filtração. O aumento da filtração e as lesões renais ocasionadas pelo diabetes resulta em proteinúria, iniciando-se por microalbuminúria e evoluindo para microalbuminúrica. Nos diabéticos o bom controle glicêmico é o responsável pela prevenção da ND. Também indicado para o tratamento da mesma, mesmo naqueles que já começaram a apresentar taxas de microalbuminúrica, o controle glicêmico evita a piora e agravamento do quadro (Zhao et al., 2020; SDB, 2019; Forbes & Cooper, 2013; Gross., et al, 2009). O aumento da excreção renal com níveis elevados de proteína, expõe o porquê os animais diabéticos tratados com salina (DS) apresentam uma menor taxa de albumina sérica. Já os tratamentos com ambos os extratos, provavelmente pela queda na glicemia, ocasionaram menor lesão renal e assim impediram a instalação da ND ou desaceleraram sua instalação, mantendo assim os

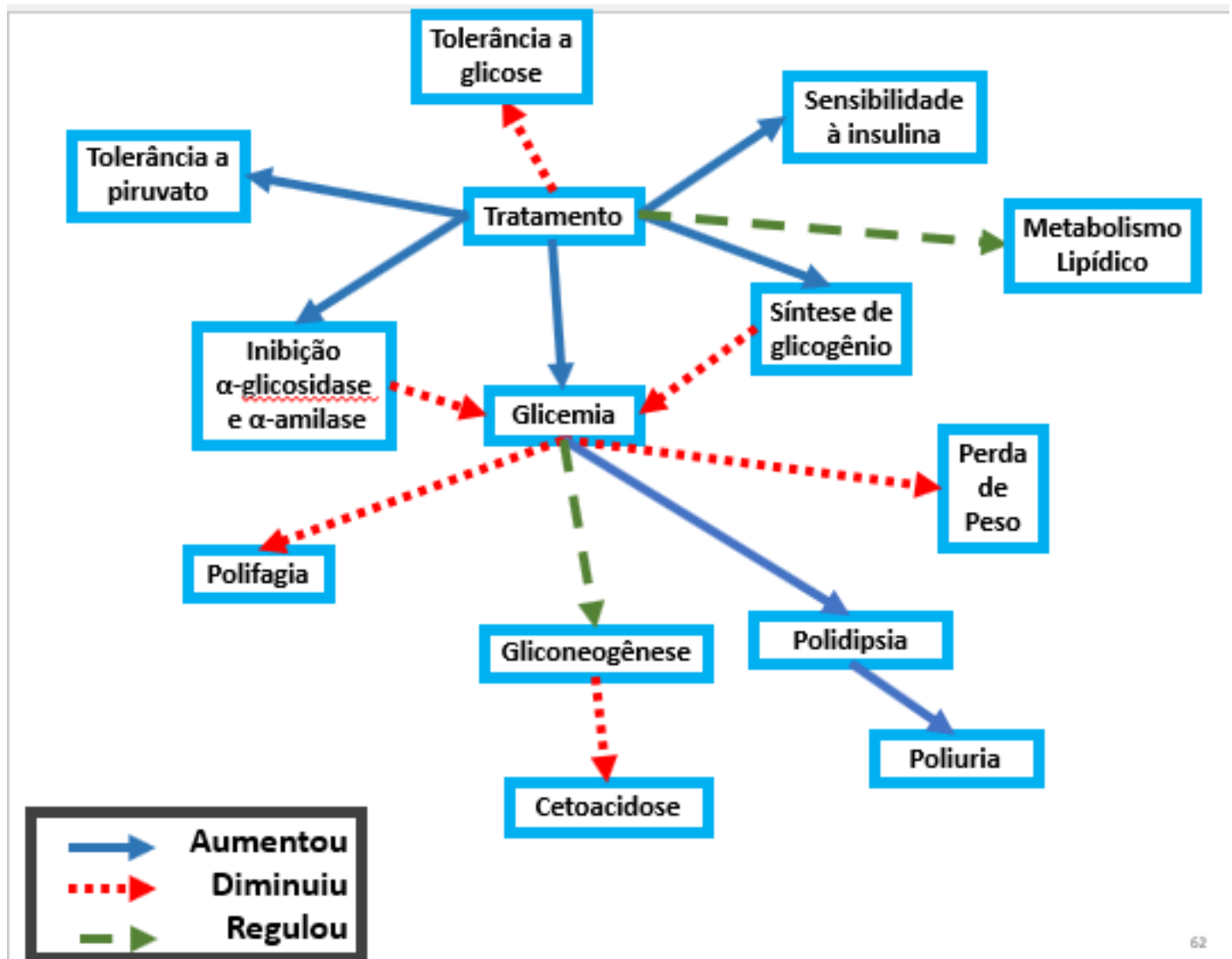
níveis de albumina estatisticamente iguais aos do grupo controle.

O organismo diabético sofre alterações em vários processos metabólicos, incluindo o metabolismo lipídico, já que sem insulina não ocorre a mobilização/metabolização dos lipídicos, levando a níveis elevados de colesterol, triglicerídeos, LDL, VLDL e diminuição do HDL. Esses aumentos ocorrem devido ao aumento na lipólise, acarretando em ácidos graxos livres que são utilizados pelo fígado na síntese de triglicerídeos. (Carvalho et al., 2012; Reddy et al., 2009; Sefi, 2011; Merzouk et al., 2000; Marslin et al., 2014; Arvind et al., 2002). Corroborando com o que foi dito anteriormente, a falta de tratamento dos animais diabéticos controle (DS) elevaram os níveis de colesterol total, triglicerídeos, LDL e VLDL. Os animais do grupo DHB apresentaram redução nos níveis de colesterol total, triglicérides, LDL, VLDL e um aumento no colesterol HDL igualando-os estatisticamente aos animais do CS. Já os animais do grupo DAQ também apresentaram uma diminuição dos níveis de colesterol total, triglicerídeos, LDL e VLDL. Entretanto, esses animais (DAQ) não tiveram um aumento nos níveis de HDL, deixando os valores estatisticamente iguais aos dos animais do grupo diabético controle (DS).

6.1 SUMARIZAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *B. HOLOPHYLLA*



6.2 SUMARIZAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM O EXTRATO AQUOSO DE *B. HOLOPHYLLA*



7. CONCLUSÃO

Os tratamentos de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina com os extratos hidroalcoólico ou aquoso de *B. holophylla* foi capaz de aumentar a sensibilidade à glicose, piruvato e à insulina. Também foram capazes de melhorar e aproximar dos níveis normais, as ingestões hídrica e alimentar, no caso do hidroalcoólico, e apenas alimentar no extrato aquoso. Diminuíram, também, a perda de peso, que é relativamente alta, e uma das principais características do diabetes. Os tratamentos foram responsáveis pelo aumento do nível de glicogênio hepático e reduções na glicemia e dos corpos cetônicos presentes no sangue. Os tratamentos também diminuíram os níveis de triglicérides, colesterol total, LDL, VLDL, e no caso do hidroalcoólico, aumentou o colesterol HDL. Os extratos também podem ter diminuído os danos renais ocasionados pelo diabetes, resultando assim, em normalização na albumina sérica.

Com os resultados obtidos, é possível que o extrato hidroalcoólico possa ser considerado uma opção terapêutica para uma melhora no quadro diabetogênico, assim como o extrato aquoso. Entretanto, o extrato hidroalcoólico apresenta-se mais potente na melhora do quadro diabético, quando comparado com o extrato aquoso.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA – American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus*. **Diabetes Care**. v.34, n.1, p. 565-569, 2011.

ADEGHATE, E., et al. Streptozotocin causes pancreatic beta cell failure via early and sustained biochemical and cellular alterations. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 118, n.10, p. 699–707, 2010.

AITKEN, M. *et al.* Global outlook for medicines through 2018. **IMS Institute for Healthcare Informatics**.p. 1-42, 2014.

AMARAL, A. C. F, et al. Coletânea científica de plantas de uso medicinal. **Cenargen, Rio De Janeiro: FIOCRUZ**, 2005.

ANVISA. Produtos Tradicionais Fitoterápicos passíveis de notificação de acordo com as formulações publicadas no 1º suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 2014.

ANVISA. Resolução da diretoria colegiada - RDC N° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf

ARVIND, K. et al. Diabetes and coronary artery diseases . **Indian J Med Res**. v.116, p.163-176, 2002.

AZAB, A. D-pinitol- active natural product from carob with notable insulin regulation. **Nutrients**. v. 14, p. 1-17, 2022

BARATA, J. **Terapêuticas alternativas de origem botânica - efeitos adversos e interações medicamentosas**. Lisboa: Lidel edições, 2008.

BAYNES, J.W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**. v.48, n.1, p. 1-9, 1999.

BHARGAVA, S., & Shah, M. B. Evaluation of efficacy of Bombax ceiba extract and its major constituent, mangiferin in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v.18 n.2, p. 311–318, 2021.

BENT, S., M.D., KO, R. e PHARM, D. Commonly Used Herbal Medicines in the United States: A Review. **Am. J. Med**.p.478-485, 2003.

BENNETT, R.A.; PEGG, A.E.; Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. **Cancer Res**. v.41.p.2786-2790, 1981.

BOLZÁN, A.D.; BIANCHI, M.S. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutat. Res**. v.512.p.121-134, 2002.

BROWN, D.G.; WOBST, H.J.; KAPOOR, A; KENNA, L.A.; NOEL, S. Clinical

development times for innovative drugs. **Nat Rev Drug Discov.** 2021.

CAMAFORTE, N.A. **Avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato bruto de baubinia holophylla(steud.) em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina.** Dissertação de mestrado Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

CAMAFORTE, N. A. D. P., et al . Hypoglycaemic activity of Bauhinia holophylla through GSK3- β inhibition and glycogenesis activation. **Pharmaceutical Biology**, 57(1),p. 269–279, 2019.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina.**Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v.46.nº4,p.419-425, 2002.

CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos anti-inflamatórios. **Tecmedd**, p.14-20, 2004.

CASELLINI, C. M., et al. Sudoscan, a noninvasive tool for detecting diabetic small fiber neuropathy and autonomic dysfunction. **Diabetes Technology and Therapeutics**, v.15, n.11, p. 948–953, 2013.

CHANDRASEKARAN, S.;NISHANTHI, R.; PUGALENDI, P. Ameliorating effect of berbamine on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in hig-fat diet and streptozotocin induced type 2 diabetic rats. **Biomed. Pharmacother.** v.103, p. 539-545, 2018.

COLEMAN, S.K. *et al.* Myostatin inhibition therapy for insulin-deficient type1 diabetes. **Sci Rep.** p.1-9, 2016

COSTA, B. B.; MOREIRA, T. A. Main pathophysiological and clinical aspects presentin type I *Diabetes mellitus* (autoimmune). **Res., Soc. Dev.** v.10, n. 14, p. 1-7, 2021.

DA FONSECA, S. T. D., et al. Flavonoid-Rich Fractions of Bauhinia holophylla Leaves Inhibit Candida albicans Biofilm Formation and Hyphae Growth. **Plants**, v.11, n.14, 2022

DA SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero Bauhinia: Composição química e potencial farmacológico. **Quim. Nova.** v.25.nº3, p.449-454, 2002.

DA SILVA, M.A.B. et al. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Rev. bras. farmacogn.**v.20.nº4.p.549-562, 2010.

DA SILVA, M. et al. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia.** v.43.p.1528-1533, 2000

DINIZ, T.G.; et al. Morfometria das fibras colágeno cardíaco em ratos sadios e diabéticos suplementados com vitamina C. **Pesq. Vet. Bras.** v.31, 2011.

DKA (Ketoacidosis) & Ketones. American Diabetes Association. Disponível em: <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/complications/ketoacidosis-dka.html>., 2022.

FALODE, J. A. *Justicia carnea extracts* ameliorated hepatocellular damage in streptozotocin-induced type 1 diabetic male rats via decrease in oxidative stress, inflammation and increasing other risk markers. **Biomarkers**.v, 28, p. 177-189, 2022.

FARESE, R. V. Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport. Update II. **Exp Biol Med**. v. 226, n. 4, p. 283-295, 2001.

FRANCO, A, S; Krieger J, E. Manual de farmacologia. Barueri, SP: **manole**; 2016

FORBES, J.M.; COOPER, M.E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiol Rev**. v.93, p. 137-188, 2013.

GEBEL, E. How to Avoid DKA. **Diabetes Forecast**. Disponível em: <http://www.diabetesforecast.org/2013/mar/how-to-avoid-dka.html?loc=morefrom>, 2022.

HARREITER, J., & RODEN, M. Diabetes mellitus—Definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2019). **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 131, p. 6–15, 2019.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 9 th. ed. Geneve:IDF, 2019

JENNINGS, R, et al. *Veterinary histology*. **Ohio State University Libraries**, 2017.

JÚNIOR, J. A. D. S, et al. D-pinitol increases insulin secretion and regulates hepatic lipid metabolism in Msg-obese mice. **An. Acad. Bras. Cienc**. v.94, n.4, 2020.

KARABATAS, L. M., et al. *Early Manifestations in Multiple-low-dose Streptozotocin-induced Diabetes in Mice*.

KÖNING, H. E; LIEBICH, H. G. *Anatomia dos animais domésticos texto e atlas colorido*.**Artmed**. 2016.

LANE, K., & FREEBY, M. Adjunctive therapies in type 1 diabetes mellitus. **Endocrinology, Diabetes and Obesity** v.28, n. 1, p. 8–13, 2021.

LI, W. L.; ZHENG, H. C.; BUKURU, J.; De KIMPE, N. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **J. Ethnopharmacol**. v. 92, p. 1-21, 2004.

MARSLIN, G. et al. Barringtonia acutangula improves the biochemical parameters in diabetic rats. **Chines Journal of Natural Medicines**, v. 12, n.2, p. 126-130, 2014.

MERZOUK, H.; et al. Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes.

Clinical Science. v. 98, p. 21–30, 2000.

MOREIRA, T. A; GUNDIM, L. F; MEDEIROS, A. A. Patologias pancreáticas em cães: revisão de literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia Da UNIPAR**, v. 20 n. 2, p. 109–115, 2017.

MUTHEE, J.K. et al. Ethnobotanical study of anthelmintic and other medicinal plants traditionally used in Loitoktok district of Kenya. **J. Ethnopharmacol.** v.135,p.15-21, 2011.

ORAM, R. A., Sims, E. K., & Evans-Molina, C. Beta cells in type 1 diabetes: mass and function; sleeping or dead? **Diabetologia** v.62, n.4, p. 567–577, 2019.

ORDONEZ, P., et al. Insulin sensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats treated with different doses of 17B-oestradiol or progesterone. **Experimental physiology.** v.92. p. 241-249, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part 1: diagnosis and classification of *diabetes mellitus*, 2018.

PALMA, H. E.; et al. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. **Mol. Cell. Biochem.** v. 386, p. 199-210, 2014.

PESSOA, D. L. R. et al. Farmácia na atenção e assistência à saúde. **Atena.** 2020.

PATEL, D.; KUMAR, R.; LALOO, D.; Hemalatha, S. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. **Asian. Pac. J. Trop. Dis.**p.239-250, 2012.

PETERSEN, M. C., et al. Regulation of Hepatic Glucose Metabolism in Health and Disease. **Nature Publishing Group**, 2017.

POPOVIĆ, Z., Matić, R., Bojović, S., Stefanović, M., & Vidaković, V. (2016). Ethnobotany and herbal medicine in modern complementary and alternative medicine: An overview of publications in the field of I&C medicine 2001-2013. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 181-192, 2016.

RAJAEI, Ziba et al. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of hydroalcoholic extract of *Securigera securidaca* seeds in streptozotocin-induced diabetic rats. **Advanced biomedical research**, v. 4, p. 33, 2015.

REDDY, K. P.; et al. Synthesis of novel triterpenoid (lupeol) derivatives and their in vivo antihyperglycemic and antidyslipidemic activity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.19, p. 4463- 4466, 2009.

REDONDO, M. J., Fain, P. R., & Eisenejarth, G. S. (n.d.). *Genetics of Type 1A Diabetes*.

REFARDT, J. Diagnosis and differential diagnosis of diabetes insipidus: Update. **Clinical**

Endocrinology and Metabolism. v.34, n. 5, 2020.

RERUP, C.C. Drugs producing diabetes through damage of de insulin secreting cells. **Pharmacol.** v.22.nº4.p.485-518,1970.

Ribeiro, D. L., et al. Phytochemical study and evaluation of cytotoxicity, mutagenicity, cell cycle kinetics and gene expression of Bauhinia holophylla (Bong.) Steud. in HepG2 cells in vitro. **Cytotechnology.** n.70, v.2, p. 713-728, 2017.

ROZZA, A. L., et al. Antiulcerogenic activity and toxicity of Bauhinia holophylla hydroalcoholic extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

SAID, O. et al. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **J. Ethnopharmacol.** v. 83, p. 251-265, 2002.

SALDANHA, L. L., et al. Hypoglycemic active principles from the leaves of Bauhinia holophylla: Comprehensive phytochemical characterization and in vivo activity profile. **PLoS ONE**, 2021.

SAVAGE, D. B.; Semple, R. K. Recent insights into fatty liver, metabolic dyslipidaemia and their links to insulin resistance. **Curr Opin in Lipidol**, v. 21, n. 4, p. 329–336, 2010.

SEFI, M. et al. Centaurium erythraea (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocininduced oxidative stress and β -cell damage in rat pâncreas. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 135, p. 243–250, 2011.

SELVARAJAH, D., et al. SUDOSCAN: A simple, rapid, and objective method with potential for screening for diabetic peripheral neuropathy. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.

SIMONIENE D, et al. Insulin Resistance in Type 1 Diabetes Mellitus and Its Association with Patient's Micro- and Macrovascular Complications, Sex Hormones, and Other Clinical Data. **Diabetes.** v. 11, p.161-74, 2020.

SOARES FILHO, P. J.; et al. Avaliação do glicogênio hepático correlacionado com glicose sérica em ratas castradas sob tratamento com tibolona. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v, 47. n,5. p. 561-568, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015. São Paulo: AC Farmacêutica, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. In: Egídio OJ, Oliveira P, SV Junior RMM, editors. São Paulo: Clannad; 2017

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL. Coleta e preparo da amostra biológica. Barueri, SP: Manole. p. 263, 2014.

SPITERI, M.; ATTARD, E.; SERRACINO-INGLOTT, A; Azzopardi, L.M. Compilation of

a herbal medicine formulary for herbal substances in Malta and its usefulness amongst healthcare professionals. **J. Young. Pharm.** v.5, p. 22-25, 2013.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.** v.50,p.536-546, 2001.

TATE, M. et al. Insulin replacement limits progression of diabetic cardiomyopathy in the low-dose streptozotocin-induced diabetic rat. **Diabetes And Vascular Disease Research**, v. 14, n. 5, p.423-433,2017.

TAYE, G. M., et al. In vivo antidiabetic activity evaluation of aqueous and 80% methanolic extracts of leaves of thymus schimperi (Lamiaceae) in alloxan-induced diabetic mice. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 13, p.3205–3212, 2020.

VALLE, I. F. A. Análise do efeito dos flavonóides na resposta glicêmica e insulinêmica: uma revisão de literatura. Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde. Departamento de Nutrição, 2016.

VARALDO, C. As Transaminases AST ou TGO e ALT ou TGP. [S. l.], 2001.

VAREDA, P.M.P. et al. *Myrcia bella* leaf extract presents hypoglycemic activity via PI3k/Akt insulin signaling pathway. **ECAM**. p. 1-10, 2014.

VASCONCELOS, F. et al. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **J.Ethnopharmacol**, v. 95, p. 385-392, 2004.

VILHENA, R. O.; et al. Antidiabetic activity of *Musa x paradisiaca* extracts in streptozotocin-induced diabetic rats and chemical characterization by HPLC-DAD-MS. **J. Ethnopharmacol**. v. 254, p. 1-6, 2020.

VINIK, A. I., et al. The new age of sudomotor function testing: A sensitive and specific biomarker for diagnosis, estimation of severity, monitoring progression and regression in response to intervention. **Frontiers in Endocrinology**. v. 6, 2015.

VOLPATO, G. T. et al. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 4, p.35-45, 2002.

WATANABE B, T. et al. Avaliação do perfil bioquímico, hematológico e imunológico em pacientes com diagnóstico recente para-HIV de um Centro de Referência em Santarém, Pará, Brasil. **Rev Med.** V. 101, p. 1-9, 2022.

WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance. **Clin Biochem Rev.** v. 26, n.2, p.19-39, 2005.

WILLIAMSON, G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 13, p. 48–57, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. world Heal Organ [Internet]. 2016;1–88. Available from:

http://www.who.int/about/licensing/%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf

YAN, F. et al. Mulberry anthocyanin extract regulates glucose metabolism by promotion of glycogen synthesis and reduction of gluconeogenesis in human HepG cells. **Food Funct.** p. 1-9, 2015.

ZHAO, C. et al. Serum and urine metabolomics reveal potential biomarkers of T2DM patients with nephropathy. *Rev. Annals of Translational Medicine*. vol. 8, n. 5, 2020.

ZHANG, J. et al. Quality of herbal medicines: Challenges and solutions. **Complement.Ther.Med.**v.20.p.100-106, 2012.

9. ANEXOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Bauru



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Comparação dos extratos aquoso e hidroalcóolico das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. quanto ao efeito hipoglicemiante, com vistas à produção de medicamento fitoterápico**", registrada com o nº 959/2022 Vol. 1, sob a responsabilidade do Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO BOSQUEIRO - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS, CAMPUS DE BAURU, em reunião de 05/08/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	De 15/08/2022 a 30/12/2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico/Swiss
Nº de animais	200
Peso/Idade	35g/45
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Unesp – Botucatu/SP

Profª Associada Sandra Lia do Amaral Cardoso
Coordenadora da CEUA