



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Nágilla Orleanne Lima do Carmo

**Avaliação do metabolismo energético e estresse
oxidativo em miocárdio de ratos com diabetes
mellitus tipo 1, tratados com geraniol**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Angélica Henriques Fernandes

**Botucatu
2019**

Nágilla Orleanne Lima do Carmo

Avaliação do metabolismo energético e estresse
oxidativo em miocárdio de ratos com diabetes
mellitus tipo 1, tratados com geraniol

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título
de Doutora em Fisiopatologia em
Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Carmo, Nágilla Orleanne Lima do.

Avaliação do geraniol sobre o metabolismo energético e estresse oxidativo em miocárdio de ratos com diabetes mellitus tipo 1 / Nágilla Orleanne Lima do Carmo. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ana Angélica Henrique Fernandes

Capes: 40101002

1. Diabetes mellitus. 2. Antioxidantes. 3. Essências e óleos essenciais. 4. Metabolismo energético. 5. Estresse oxidativo.

Palavras-chave: Antioxidante; Diabetes mellitus; Geraniol.

Dedicatória

Dedico esta tese às pessoas mais importantes da minha vida, aos meus pais, **Sebastião e Isabel**, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. À minha irmã **Francielly**, pelo cuidado e por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência. Essa conquista não é só minha, mas nossa. Amo vocês!

Agradecimentos

A **Deus**, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar. Por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, que não mediram esforços em me ajudar durante a realização deste trabalho e no decorrer da minha vida. A estas pessoas, aqui, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus pais, **Sebastião e Isabel**, serei eternamente grata. Vocês, que tudo me deram e que de muito se privaram para que eu pudesse chegar onde cheguei, por nunca terem desistido de mim e dos meus sonhos. Agradeço pela segurança de poder contar com vocês, por caminharem comigo todos os dias da minha vida e pela certeza de que sempre vou ter para onde voltar. Que em muitos momentos acreditaram mais em mim do que eu mesma, que sustentaram comigo cada minuto de dificuldade e alegria. Pelo amor que sempre me dedicaram e por todo apoio que me proporcionaram. Esta conquista também é de vocês!

À minha irmã **Francielly**, por todo cuidado, amor e companheirismo.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Ana Angélica Henrique Fernandes**, pela confiança, oportunidade, paciência, incentivo, amizade e excelente orientação. Agradeço o cuidado, carinho e o respeito que sempre teve por mim. Saiba que admiro muito e sou profundamente agradecida pelo que me ensinou e pela forma como me acolheu.

Ao **Prof. Dr. Kleber Eduardo de Campos**, que me acolheu e me introduziu na pesquisa e na área acadêmica, agradeço pela grande colaboração na graduação e mestrado, por mais que não esteve diretamente ligado a este momento, contribuiu de forma satisfatória e prazerosa para que eu chegasse até aqui.

Aos amigos do laboratório, **Anderson Kaga, Pedro Barbanera, Mariana Gazoli, Bárbara Mitsuyasy e Priscila Manfio**, por toda colaboração, conhecimento, amizade, pelos momentos alegres e pela agradável convivência. Vocês foram imprescindíveis para a execução deste trabalho.

Às minhas amigas, **Loyane Almeida, Thaigra Soares e Rafaianne Queiroz** pela grande amizade que nos une, pelos momentos de descontração, pelo convívio de quase 10 anos. Vocês fazem parte da minha história!

Ao **Jairo**, obrigada pela compreensão, pelo apoio e principalmente pela

paciência nesses últimos meses que significaram tanto na minha vida.

A **Aiara Cristina e sua família**, palavras não expressam meu eterno agradecimento a vocês. Obrigada pela convivência harmoniosa e pelo acolhimento, que Deus retribua tudo em dobro o que fizeram por mim.

Aos amigos que ganhei em Botucatu durante esta jornada, **Adriana Junqueira, Kaoana Almeida, Michely Alves**, pelo incentivo, amizade e companheirismo.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus de Botucatu-SP. Aos professores e funcionários do **Programa de Pós-graduação de Fisiopatologia em Clínica Médica**, pelo ensinamento e dedicação, cada um de forma especial contribuiu para a conclusão desse trabalho e, conseqüentemente, para minha formação profissional.

Ao **Departamento de Química e Bioquímica-IBB**, Unesp-Botucatu, em especial ao Fábio Fava, Danielle Fernandes e Gabriela Athanázio, pelo apoio técnico e administrativo. Pela generosidade, profissionalismo e boa vontade em me auxiliar em todo e qualquer momento.

Aos professores **Dr. Silvio Assis de Oliveira Junior, Dra. Bruna Paola Murino Rafacho, Dra. Fernanda Mani e Dra. Luiza Cristina Godim Domingues Dias** por integrarem a banca examinadora e por contribuírem com seus conhecimentos e experiências.

Às minhas eternas amigas, **Bryzza Cavalcante e Suelen Mendes**, pelo apoio e pela amizade de quase trinta anos.

À **Capes** pela bolsa concedida durante o período do doutorado.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos e familiares, pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado, meu eterno AGRADECIMENTO!

*“Você ganha força, coragem e
confiança através de cada experiência
em que você realmente pára e encara
o medo de frente. ”*

(Eleanor Roosevelt)

Resumo

Diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica caracterizada pela hiperglicemia persistente, com distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, resultante de defeitos na secreção de insulina, ação da insulina ou ambos. A utilização de antioxidantes tem contribuído para melhorar a hiperglicemia e também minimizar as complicações diabéticas. Geraniol, um monoterpene, presente na composição de óleos essenciais de várias plantas medicinais, apresenta ação antioxidante e antihiperglicemiante, sendo capaz de contribuir na terapêutica desta patologia. Este estudo tem como objetivo avaliar o metabolismo energético e estresse oxidativo no miocárdio de ratos com DM tipo 1, tratados com geraniol. Foram utilizados 32 ratos machos, *Wistar* ($\pm$ 250g de peso corporal), distribuídos em 4 grupos experimentais (n=8): C (normais, controle); GE (normais, tratados com geraniol); DM (diabéticos, não-tratados); DM-GE (diabéticos, tratados com geraniol). A DM tipo 1 experimental foi induzido através da administração de estreptozotocina (STZ – 60 mg/Kg de peso corporal, i.p., dose única). Os animais dos grupos GE e DM-GE receberam geraniol (200 mg/Kg/dia) via gavagem durante 30 dias e os animais dos grupos C e DM receberam água pelo mesmo procedimento. Durante o período experimental, foram avaliados consumo de água e ração. Após este período, os animais em jejum de 12 horas, foram anestesiados (xilazina e cetamina) e eutanasiados. Foram coletadas amostras séricas para análise da concentração de glicemia e do perfil lipídico e porções de tecido cardíaco para dosagem de glicogênio, triacilgliceróis, proteínas totais, enzimas do metabolismo energético e do estresse oxidativo. Os resultados foram analisados por ANOVA One-way seguido do teste de Tukey para comparação das médias. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. Houve redução no consumo alimentar, hídrico e energia ingerida ($p < 0,05$), além de maior peso corporal e ganho de peso em animais diabéticos tratados com geraniol (DM-GE), quando comparados aos animais diabéticos não tratados (DM). A administração de geraniol em DM-GE também promoveu diminuição da glicemia, coleserol, triacilgliceróis, VLDL-colesterol e LDL-colesterol, assim como aumento da concentração sérica de HDL-colesterol (DM-GE), quando comparado ao grupo DM. O grupo DM apresentou menores concentrações cardíacas de glicogênio em relação aos demais grupos, sendo que o tratamento com geraniol aumentou este parâmetro ($p < 0,05$). A concentração cardíaca de triacilgliceróis foi maior ($p < 0,05$) nos grupos DM e DM-GE,

diferindo estatisticamente dos demais grupos. A atividade cardíaca tanto da fosfofrutoquinase (PFK) como da piruvato desidrogenase (PiDH) foi menor no grupo DM, tendo aumento na presença de geraniol. Os animais do grupo DM apresentaram maior atividade cardíaca para citrato sintase (CS) e β -hidroxil CoA-desidrogenase (OHADH), e com o uso de geraniol, a atividade destas enzimas diminuiu. A atividade da NADH-desidrogenase (NADH-DH), succinato-desidrogenase (SUC-DH) e ATP-sintase apresentou-se diminuída nos animais do grupo DM e o uso do geraniol restabeleceu a atividade da NADH-DH e ATP-sintase; animais do grupo GE tiveram a atividade da ATP-sintase aumentada, diferindo dos demais grupos. Quanto aos parâmetros do estresse oxidativo, não foram observadas diferenças significativas na atividade das enzimas glutatona reduzida (GSH) e glutatona total (GS total). A administração de geraniol em ratos diabéticos promoveu diminuição da concentração de hidroperóxido de lipídios (HP) e de proteína carbonila (PC) e aumento da atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD), quando comparado a animais do grupo DM. Conclui-se que a administração de geraniol reduziu os efeitos prejudiciais observados na condição diabética, através do seu efeito antidiabetogênico e antioxidante.

Palavras-chave: Geraniol, miocárdio, diabetes mellitus

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by persistent hyperglycemia, with disorders in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both. The use of antioxidants has contributed to improve hyperglycemia and also minimize diabetic complications. Geraniol, a monoterpene, present in the composition of essential oil of various medicinal plants, has oxidant and antihyperglycemic action, being able to contribute in the therapy of this pathology. This study aimed to evaluate the energetic metabolism and oxidative stress in the myocardium of rats with type 1 DM treated with geraniol. 32 male *Wistar* rats (± 250 g body weight), distributed in four experimental groups (n=8): C (normal, control); GE (normal, treated with geraniol); DM (diabetic, untreated); DM-GE (diabetic, treated with geraniol). Experimental type 1 DM was induced by streptozotocin (STZ - 60mg/Kg body weight, i.p., single dose). Animals of the group GE and DM-GE received geraniol (200mg/K/day) by gavage for 30 days and animals of the group C and DM received water by the same procedure. Animals of the group GE and DM-GE received geraniol (200mg/K/day) by gavage for 30 days and animals of the group C and DM received water by the same procedure. During the experimental period, food and water intake were evaluated. After this period the animals, in a 12h fast, were anesthetized and euthanized. Serum samples were collected for glycemia concentration and lipid profile and portions of cardiac tissue for glycogen dosage, triacylglycerols, total proteins, enzymes of energy metabolism and oxidative stress. Results were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey test for comparison of means. The results were considered significant when $p < 0.05$. Decreased in food consumption, water consumption and energy intake ($p < 0.05$), however greater body weight and weight gain in diabetic animals treated with geraniol (DM-GE) compared to untreated diabetic animals (DM). The administration of geraniol in DM-GE also caused a decrease in serum glycemia, cholesterol, triacylglycerols, VLDL-cholesterol and LDL-cholesterol, an increase in serum HDL-cholesterol concentration (DM-GE) when compared to DM group. DM group showed lower cardiac glycogen concentrations in relation to the other groups and the treatment with geraniol increased this parameter ($p < 0.05$). The cardiac concentration of

triglycerides was higher ($p < 0.05$) in the DM and DM-GE groups, differing statistically from the other groups. The cardiac activity of both fosfofrutoquinase (PFK) and pyruvate dehydrogenase (PiDH) was lower in the DM group, with an increase in the presence of geraniol. Animals of the DM group showed increased cardiac activity for citrate synthase (CS) and β -hydroxyl CoA dehydrogenase (OHADH) and with the use of geraniol the activity of these enzymes decreased. The activity of NADH-dehydrogenase (NADH-DH), succinate dehydrogenase (SUC-DH) and ATP-synthase were decreased in the animals of the DM group and the use of geraniol reestablished the activity of NADH-DH and ATP-synthase; animals from the GE group had the ATP-synthase activity increased, differing from the other groups. As for the parameters of oxidative stress, no significant differences were observed in the activity of glutathione reduced (GSH) and total glutathione enzymes. The administration of geraniol in diabetic rats promoted a decrease in the concentration of lipid hydroperoxide (HP) and protein carbonyl (PC) and increased the activity of the glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) antioxidant enzymes, when compared to animals in the DM group. In conclusion, the administration of geraniol reduced the harmful effects observed in the diabetic condition, through its antidiabetogenic and antioxidant effect.

Keywords: Geraniol, heart, diabetes mellitus

Lista de figuras

Figura 1. Número estimado de adultos (20-79 anos de idade) com diabetes em todo o mundo e por área mundial em 2015 e 2040 -----	26
Figura 2. Fatores genéticos e ambientais podem levar a inflamação, reação de autoimunidade e ao estresse metabólico -----	27
Figura 3. Via do poliol em condições de hiperglicemia -----	31
Figura 4. Produção de EROs pela cadeia transportadora de elétrons -----	32
Figura 5. Estrutura química geraniol -----	36
Figura 6. Consumo alimentar, consumo de água, energia ingerida, peso e variação de peso corporal para os diferentes grupos experimentais -----	53
Figura 7. Concentração sérica de glicose, colesterol total, triacilgliceróis (TG), VLDL-colesterol LDL-colesterol e HDL-colesterol para os diferentes grupos experimentais -----	55
Figura 8. Concentração cardíaca de proteínas totais, glicogênio e triacilgliceróis, nos diferentes grupos experimentais -----	57
Figura 9. Atividade cardíaca de fosfofrutoquinase (PFK), piruvato desidrogenase (PiDH), lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS) e B-Hidrociacil CoA desidrogenase (OHADH), para os diferentes grupos experimentais -----	59
Figura 10. Atividade cardíaca da NADH-desidrogenase (NADH-DH), succinato desidrogenase (SUC-DH) e ATP-sintase (ATP-sint), para os diferentes grupos experimentais -----	61
Figura 11. Concentração cardíaca de glutatona total (GS total), glutatona reduzida (GSH), hidroperóxido de lipídios (HP), proteína carbonila (PC), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GSH-Px) nos diferentes grupos experimentais -----	63

Lista de tabelas

Tabela 1. Consumo alimentar, consumo de água, energia ingerida, peso e ganho de peso corporal para os diferentes grupos experimentais ----- 52

Tabela 2. Concentração sérica de glicose, colesterol total, triacilgliceróis (TG), VLDL-colesterol e HDL-colesterol para os diferentes grupos experimentais ----- 54

Tabela 3. Concentração cardíaca de proteínas totais, glicogênio e triacilgliceróis, nos diferentes grupos experimentais ----- 56

Tabela 4. Atividade cardíaca de fosfofrutoquinase (PFK), piruvato desidrogenase (PiDH), lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS) e B-Hidrociacil CoA desidrogenase (OHADH), para os diferentes grupos experimentais ----- 58

Tabela 5. Atividade cardíaca da NADH-desidrogenase (NADH-DH), succinato desidrogenase (SUC-DH) e ATP-sintase (ATP-sint), para os diferentes grupos experimentais ----- 60

Tabela 6. Concentração cardíaca de glutathiona total (GS total), glutathiona reduzida (GSH), hidroperóxido de lipídios (HP), proteína carbonila (PC), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) nos diferentes grupos experimentais ----- 62

Lista de abreviaturas e siglas

AG – Ácidos graxos

AGEs – Produtos de glicação avançada

AMPK – Proteína quinase ativada

AR – Aldose redutase

ATP – Adenosina trifosfato

CAT – Catalase

CS – Citrato sintase

DM – Diabetes mellitus

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GLUT – transportador de glicose

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione reduzida

GSH-Px – Glutathione peroxidase

GSSG – Glutathione oxidada

GS total – Glutathione total

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HDL-colesterol – Lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA reductase – Hidroximetilglutaril CoA reductase

HNO₂ – Óxido nítrico

HP – Hidroperóxido de lipídio

HRO₂ – Hidroperóxido

LCAT – Lecitina colesterol aciltransferase

LDL-colesterol – Lipoproteína de baixa densidade

LPL – Lipase lipoproteica

MDA – Malondialdeído

NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenine

NADH-DH – NADH-desidrogenase

NO – Óxido nítrico

NO₂ – Dióxido de nitrogênio

O₂⁻ - Ânion superóxido

OH – Hidroxil

OHADH – β hidroxil CoA desidrogenase

ONOO⁻ - Peroxinitrito

PC – Proteína carbonila

PFK – Fosfofrutoquinase

PiDH – Piruvato desidrogenase

PKC – Proteína quinase C

PPAR – Receptor ativador peroxisoma proliferador

RL – Radicais livres

RO₂ – Peroxil

SDH – Sorbitol desidrogenase

SOD – Superóxido dismutase

STZ – Estreptozotocina

SUC-DH – Succinase desidrogenase

VLDL-colesterol – Lipoproteína de muita baixa densidade

Sumário

INTRODUÇÃO	26
HIPÓTESE	39
OBJETIVOS	41
Objetivos geral	41
Objetivos específicos	41
METODOLOGIA	43
1. Instalação do experimento e animais experimentais	43
2. Grupos experimentais	43
3. Determinação da energia ingerida	44
4. Obtenção das amostras séricas	44
5. Determinações bioquímicas séricas	44
5.1. Determinação da glicemia	44
5.2. Determinação da concentração de triacilgliceróis	44
5.3. Determinação da concentração de colesterol total	45
5.4. Determinação da concentração de HDL-colesterol	45
5.5. Determinação da concentração de VLDL-colesterol	45
5.6. Determinação da concentração de LDL-colesterol	45
6. Análises do tecido cardíaco	45
6.1. Análises do metabolismo energético	45
6.1.1. Atividade da fosfofrutoquinase (PFK)	46
6.1.2. Atividade da lactato desidrogenase (LDH)	46
6.1.3. Atividade da piruvato desidrogenase (PiDH)	46
6.1.4. Atividade da citrato sintase (CS)	46
6.1.5. Atividade da β -hidroxiacil coenzima-A desidrogenase (OHADH)	47
6.2. Análises do estresse oxidativo: marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes	47
6.2.1. Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídio (HP)-	47
6.2.2. Determinação da concentração da glutathiona total (GS total) e glutathiona reduzida (GHS)	47

6.2.3. Determinação da atividade da proteína carbonila (PC) -----	47
6.2.4. Determinação da atividade de glutathiona peroxidase (GSH-Px) -- -----	48
6.2.5. Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD) ---	48
6.3. Análise da função mitocondrial através da atividade dos complexos respiratórios -----	48
6.3.1. Determinação da atividade da NADH-desidrogenase (complexo I) -----	48
6.3.2. Determinação da atividade da succinato desidrogenase (complexo II) -----	49
6.3.3. Determinação da atividade da ATP-sintase -----	49
6.4. Determinação da concentração de proteínas totais -----	49
6.5. Determinação da concentração de glicogênio -----	49
6.6. Determinação da concentração de triacilgliceróis -----	49
7. Forma de análise dos resultados – procedimentos estatísticos -----	50
RESULTADOS -----	52
DISCUSSÃO -----	65
CONCLUSÃO -----	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	88

Introdução

Diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada pela hiperglicemia persistente, com distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, resultados da deficiência na secreção de insulina, da sua ação ou ambos. A disfunção metabólica pode estar associada a alterações funcionais e estruturais permanentes e irreversíveis em células e órgãos, especialmente, rins, fígado, coração e vasos sanguíneos (PRAVEENA; SUJATHA; SAMEERA, 2013; ADA, 2018).

A prevalência global de indivíduos com DM aumentou rapidamente nas últimas quatro décadas (NCD-RisC, 2016), e em 2015, diabetes foi a 15ª causa de mortes (GBD, 2016). Estimativas recentes sugerem que o número de pessoas com diabetes entre as idades de 20 e 79 anos vai aumentar de 415 milhões em 2015 (1 em 11 adultos) para 642 milhões em 2040 (1 em 10 adultos) (IDF, 2015, 2017). Portanto, este cenário torna-o um dos principais problemas de saúde pública da atualidade, emergindo como uma epidemia que já configura um desafio para o planejamento em saúde, a curto e longo prazo (Figura 1) (NARAYAN et al., 2006; IDF, 2017).

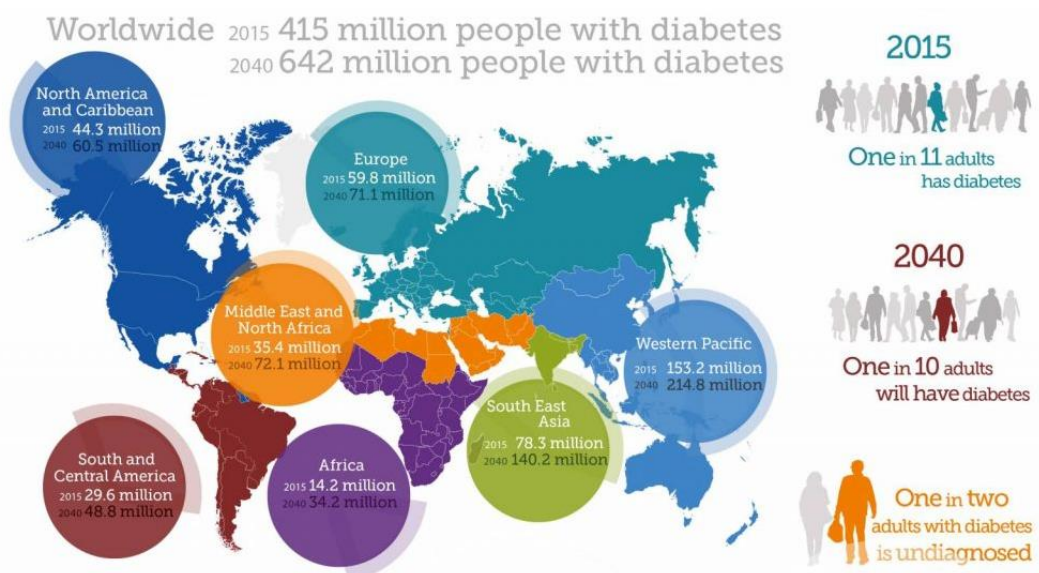


Figura 1: Número estimado de adultos (20 - 79 anos de idade) com diabetes em todo o mundo e por área mundial em 2015 e 2040. (Fonte: IDF, 2017).

A DM pode ser classificada em dois tipos principais, DM tipo 1 e DM tipo 2. A classificação passa a ser importante para determinar a estratégia de terapia, embora em alguns casos os dois tipos se confundem, uma vez que o DM 2, tardiamente, pode apresentar algum grau que caracterize o DM 1 (ADA, 2018).

Em ambos os tipos, vários fatores genéticos e ambientais podem resultar na perda e/ou disfunção progressiva de massa de células β do pâncreas que se manifesta clinicamente como hiperglicemia. Uma vez que ocorre o estabelecimento da hiperglicemia, esta passa a ser o principal fator de risco para o desenvolvimento das complicações diabéticas, com taxas de progressões diversas (Figura 2) (SKYLER et al., 2017).

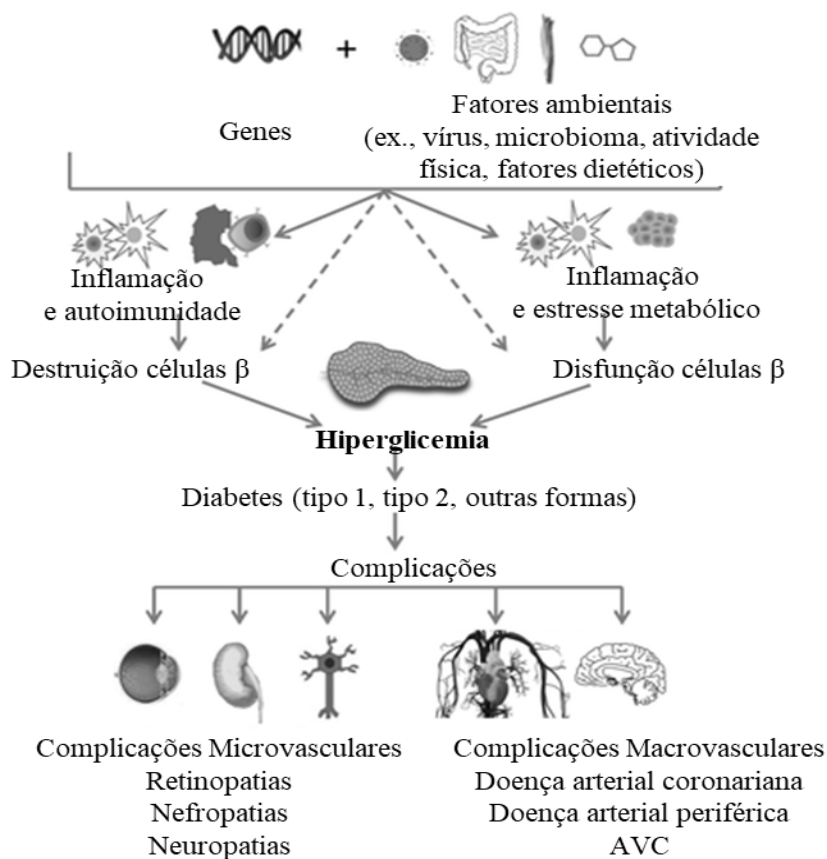


Figura 2: Fatores genéticos e ambientais podem levar a inflamação, reação de autoimunidade e ao estresse metabólico. Esses estados afetam a massa e/ou a função das células β , de modo que os níveis de insulina são eventualmente incapazes de responder suficientemente às demandas hormonais, levando a níveis de hiperglicemia suficientes para diagnosticar diabetes. Independentemente da fisiopatologia do diabetes, os níveis crônicos de glicemia são associados a complicações micro/macrovaskulares que aumentam a morbidade/mortalidade. Este modelo mostra a destruição e/ou a disfunção de células β como fator comum para o desenvolvimento de diabetes. (Adaptação: SKYLER et al., 2017).

DM tipo 1 é resultante da destruição crônica das células β -pancreáticas, produtoras de insulina, por mecanismos autoimunes mediados por células, como linfócitos T e macrófagos, susceptibilidade genética e fatores ambientais, sendo assim dependentes da administração de insulina. Este tipo de diabetes representa cerca de 10% de todos os casos no mundo (REDONDO; EISENBARTH, 2002; SKYLER et al., 2017). O processo de autodestruição se inicia meses a anos antes do diagnóstico clínico; neste momento, cerca de 70% a 90% da massa de células β já foram destruídas, é quando surgem os primeiros sintomas decorrentes da hiperglicemia (ZIMMET et al., 1999).

DM tipo 2, representa quase 90% dos casos de diabetes (HAMEED et al., 2015). É resultado da resistência à insulina e da disfunção das células β pancreáticas como consequência da hiperglicemia crônica e persistente (BUTLER et al., 2003; ASHCROFT; RORSMAN, 2012). Fatores ambientais desempenham papel significativo para desencadear a doença, como por exemplo, inatividade física, síndrome metabólica, estresse físico/emocional e estilo de vida inadequado (NADEEM et al., 2015). Porém, indivíduos portadores deste tipo de diabetes podem não mais produzir insulina por perda de massa pancreática pela produção exacerbada de insulina e assim desenvolverem o DM1 (SAH et al., 2016).

A deficiência de produção de insulina promove a diminuição na razão insulina/glucagon, o que torna possível o entendimento pelo qual o metabolismo em indivíduos diabéticos torna-se catabólico com degradação oxidativa, desta forma a lipólise, degradação de proteínas, gliconeogênese e glicogenólise estão acentuadas (HERBERT; NAIR, 2010; RAINS; JAIN, 2011).

A hiperglicemia é a causa primária das complicações diabéticas, levando a sintomas clássicos, como polidipsia (sede excessiva), poliúria (urinar em excesso), polifagia (fome excessiva), perda de peso, cetoacidose; e entre as complicações crônicas, nefropatias, neuropatias, retinopatias, insuficiência renal e disfunção e/ou insuficiência cardíaca ou cardiomiopatia (LONG; DAGOGO-JACK, 2011; TAO; SHI; ZHAO, 2015; ADA, 2018).

As complicações cardiovasculares na DM representam a principal causa de morbidade/mortalidade em pacientes diabéticos (HOLSCHER; BODE; BUGGER,

2016). Dentre os diversos problemas cardíacos que podem ser causados pela DM, o comprometimento miocárdico não relacionado a aterosclerose, denominada cardiomiopatia diabética, é observada como forma única de doença cardíaca em aproximadamente 30% dos pacientes com DM tipo 1 (TESFAMARIAM, 1994). A cardiomiopatia diabética é caracterizada pela remodelação ventricular esquerda e insuficiência cardíaca, na ausência de doença arterial coronariana (KUBLI; GUSTAFSSON, 2015; SEFEROVIC; PAULUS, 2015).

Além disso, a DM pode levar a fibrose intersticial, hipertrofia miocárdica, doença microvascular e disfunção autonômica, sendo que todas essas alterações contribuem para os distúrbios no miocárdio (CODINACH; FREIXA, 2002). Nesse aspecto, a disfunção ventricular tem sido descrita em pacientes diabéticos, jovens, assintomáticos, sem outras doenças que poderiam afetar o músculo cardíaco, sendo nesse caso a diabetes considerada a única causa da doença miocárdica (WEYTJENS et al., 2005).

O miocárdio é caracterizado por elevada capacidade oxidativa com grande quantidade de mitocôndrias e possui elevada taxa de consumo de oxigênio, uma vez que utiliza os ácidos graxos como principal substrato para produção de energia e apenas uma pequena proporção de glicose circulante. Esta preferência para ácidos graxos, como substrato oxidável, é relevante no tecido cardíaco em condições diabéticas (STANLEY; SABBAH, 2005; LOPASCHUK et al., 2010; RAPHAEL et al., 2018). E assim, consequentemente, há produção excessiva de equivalentes redutores (NADH e FADH₂), os quais contribuem para aumentar a fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Disfunção mitocondrial e aumento na produção de EROs desempenham papel chave no desenvolvimento da cardiomiopatia diabética (KUBLI; GUSTAFSSON, 2015). Estudos experimentais e clínicos revelam que a hiperglicemia estabelecida na DM está associada à produção aumentada de radicais livres (RL) derivados do oxigênio molecular, como resultado da auto-oxidação da glicose e glicosilação da proteína (ROSEN et al., 2001; BONNEFONT-ROUSSELOT, 2004; JOHANSEN et al., 2005).

As EROs podem ser formadas nas células durante os processos oxidativos, principalmente na cadeia respiratória através do transporte mitocondrial de elétrons. Dentre as EROs, destacam-se ânions superóxidos ($\bullet\text{O}_2^-$), hidroxil ($\bullet\text{OH}$), peroxil ($\bullet\text{RO}_2$), hidroperoxil ($\bullet\text{HRO}_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FORBES; COUGHLAN; COOPER, 2008; SEIVA et al., 2008). Espécies reativas de nitrogênio (ERN) são o óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2^-$), peroxinitrito (ONOO^-) e óxido nitroso (HNO_2). Destas moléculas reativas, $\bullet\text{O}_2$, $\bullet\text{NO}$ e ONOO são as espécies mais amplamente estudadas e desempenham um papel importante nas complicações cardiovasculares diabéticas (JOHANSEN et al., 2005).

Durante o transporte de elétrons transferidos por substratos oxidáveis à cadeia respiratória, a mitocôndria é capaz de gerar um gradiente eletroquímico de prótons na membrana interna que conduz à síntese de ATP (MITCHELL, 1961). Além de fornecer mais de 95% da energia utilizada pela célula por meio da fosforilação oxidativa, a mitocôndria desempenha diferentes funções na regulação de vários processos celulares, participando da modulação do estado redox celular, da regulação osmótica, do controle de pH e da sinalização celular. Devido a essa diversidade de funções, a mitocôndria é uma organela alvo de várias situações lesivas e agentes tóxicos, estando envolvida nos mecanismos de dano e morte celular (ORRENIUS et al., 1989; GUNTER et al., 1994; WALLACE et al., 1997).

Elevados níveis de RL provocam danos aos componentes celulares como proteínas, lipídios de membrana e ácidos nucleicos, resultando em disfunções e eventualmente morte celular, devido ao desequilíbrio entre a produção e a neutralização das EROs, o que leva ao estresse oxidativo (GILLESPIE, 2006; SMALL et al., 2012; RAJENDRAN et al., 2014). Isto implica na etiologia de grande número de doenças crônicas degenerativas, incluindo aterosclerose, câncer, diabetes e envelhecimento, que apresentam as estruturas celulares danificadas (BRAY, 2000; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; SMALL et al., 2012; RAJENDRAN et al., 2014).

Na patogênese da DM, o estresse oxidativo não ocorre somente pelo aumento das EROs produzidas pelas cadeias transportadoras de elétrons na

mitocôndria, mas também por outros mecanismos induzidos pela hiperglicemia, dentre os quais incluem: via do polioli, produção intracelular dos precursores dos produtos finais da glicação avançada (AGEs), ativação da proteína quinase C (PKC), ativação da hexosamina e pelas vias relacionadas com ativação da NADPH oxidase (BROWNLEE, 2001; 2005). Apesar da tentativa dessas vias em diminuir a glicemia, ocorrem prejuízos por aumentar a produção de EROs (BENNETT; SEEFELDT, 2010).

Elevadas concentrações de glicose podem ser metabolizadas através da via do polioli (Figura 3), onde a glicose é reduzida pela aldose redutase (AR) em sorbitol, o qual é convertido em frutose pela sorbitol desidrogenase (SDH). Nesta via o NADPH é oxidado, ocasionando baixa concentração da glutatona na forma reduzida (GR), que atua como agente importante na proteção dos danos provocados pelos RL (BROWNLEE, 2001; EL-KABBANI et al., 2004; FORBES; COUGHLAN; COOPER, 2008).

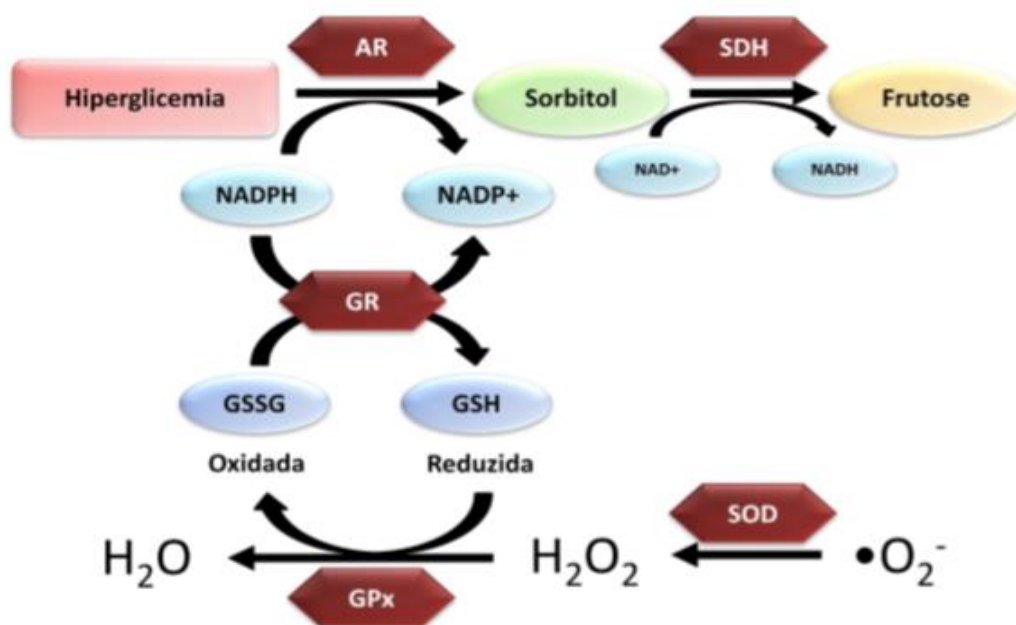


Figura 3: Via do polioli em condições de hiperglicemia. Aldose redutase (AR) reduz glicose a sorbitol, utilizando NADPH como cofator. A baixa concentração de NADPH compromete a oxidação da glutatona reduzida (GSH), estabelecendo o estresse oxidativo. Sorbitol desidrogenase (SDH) oxida sorbitol a frutose utilizando NAD⁺ como co-fator. (Adaptação Reis et al., 2008).

Com relação aos distúrbios glicêmicos, a hiperglicemia observada na DM, está estreitamente relacionada com o aumento das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) e de triacilgliceróis e redução da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), elevando o risco de doenças isquêmicas cardiovasculares (JOHANSEN et al., 2005).

Durante a lipólise os ácidos graxos livres são lançados na corrente sanguínea para diversos tipos celulares, onde são β -oxidados em acetil-CoA, que são oxidadas no ciclo do ácido cítrico com produção de equivalentes redutores FADH_2 e NADH , os quais serão re-oxidados na cadeia transportadora de elétrons com produção de energia. A elevação da concentração de equivalentes redutores aumenta o fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, o que promove a hiperpolarização da membrana mitocondrial interna durante a fosforilação oxidativa. Estes eventos favorecem a redução parcial do oxigênio molecular às principais formas de EROs, tais como, $\bullet\text{O}_2^-$ e H_2O_2 (ROLO; PALMEIRA, 2006; VALKO et al., 2007; SIVITZ; YOREK, 2010; RAINS; JAIN, 2011) (Figura 4).

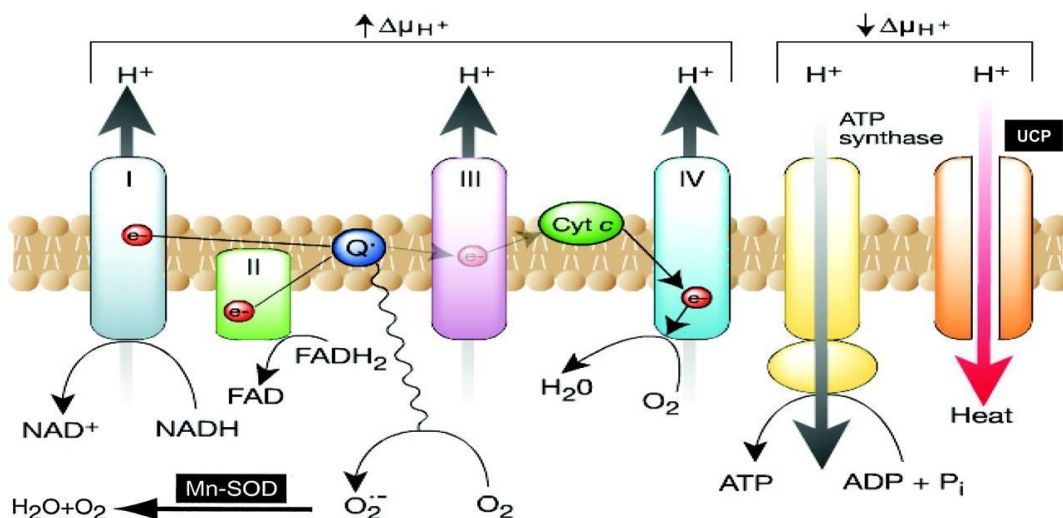


Figura 4: Produção de EROs pela cadeia transportadora de elétrons. (Adaptado de Brownlee, 2005).

Os lipídios são relatados como um dos principais alvos de EROs. Hidroperóxidos apresentam efeitos tóxicos diretamente sobre as células da degradação da radical hidroxila, ou também podem reagir com metais de transição como o ferro ou o cobre para formar aldeídos estáveis, tais como malondialdeído

(MDA), causando danos às membranas celulares (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Alterações significativas na estrutura e metabolismo de lipídios têm sido relatadas em pacientes com diabetes, particularmente, com aqueles associados às complicações vasculares (FOWLER, 2008). Yang et al (2009) observaram maior peroxidação lipídica com elevado nível de MDA em ratos hiperglicêmicos, e relacionaram aumento na peroxidação lipídica com infarto do miocárdio e pela ativação da NADPH-oxidase.

As proteínas também são alvo potencial das EROs, pois muitos de seus resíduos de aminoácidos como cisteína, metionina e tirosina são facilmente oxidados pelas EROs com concomitante liberação de carbonilas, consideradas biomarcadores potentes do estresse oxidativo (SUZUKI; MIYATA, 1999). Além disso, as AGEs são capazes de modificar a estrutura das proteínas sanguíneas, o que induz a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento em células endoteliais (BANDEIRA et al., 2013).

A neutralização das EROs e, portanto, o controle do estresse oxidativo é realizado por antioxidantes. Existem basicamente dois sistemas antioxidantes: enzimático e não-enzimático (NORDBERG; ARNÉR, 2001). O primeiro corresponde às enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px). Os agentes não-enzimáticos correspondem principalmente, aos compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: a glutathione, vitaminas C e E (α -tocoferol), minerais, compostos fenólicos e terpenos (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003; WIERNSPERGER, 2003). Essas defesas antioxidantes são extremamente importantes porque fornecem proteção máxima aos locais biológicos, removendo e/ou neutralizando as EROs (SARKAR; BHOWMICK; BANU, 2018).

A literatura descreve mecanismos bioquímicos a respeito das anormalidades relacionadas com a exposição prolongada dos tecidos à hiperglicemia, a qual favorece o estresse oxidativo, por afetar as defesas do sistema de antioxidantes endógenos em indivíduos diabéticos, dificultando, desta maneira, a remoção das EROs (REIS et al., 2008).

Deste modo, estudos com intervenção farmacológica baseados em compostos antioxidantes sobre a DM são de grande interesse. Os antioxidantes desempenham papel importante na defesa frente às enfermidades crônicas degenerativas como a DM. É notório que estas substâncias atuam neutralizando as EROs envolvidas no estresse oxidativo, desta forma, impedindo o desenvolvimento das complicações diabéticas. Desde que o sistema antioxidante torna-se ineficiente para compensar à produção excessiva de EROs e combater o estresse oxidativo, a administração de antioxidantes pode ser efetiva no controle da DM. Estudos epidemiológicos estabeleceram que a ingestão de antioxidantes encontra-se relacionada inversamente com a ocorrência de doenças promovidas pelo estresse oxidativo (SADE, 2012).

Antioxidantes, de origem vegetal, são moléculas importantes que podem ser exploradas como potencial terapêutico no possível combate aos problemas relacionados a danos oxidativos causados por EROs na DM (KOCHHAR, 2008).

Portanto, com a finalidade de estudar substâncias antioxidantes, a literatura relata algumas propriedades farmacológicas dos terpenos, os quais tem provocado grande interesse em sua utilização na prevenção e terapia de várias doenças, incluindo DM, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, também por apresentar propriedades antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária, antiviral, antialérgicos, antihiperglicêmicos, anti-inflamatória e imunomodulatória (GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2011; GONZÁLEZ-BURGOS; GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Os terpenos são amplamente produzidos por uma grande variedade de espécies vegetais. São produtos naturais encontrados em mais de 40.000 compostos diferentes, liberados como metabólicos secundários de plantas (DZUBAK et al., 2006). A classe química dos terpenos compartilha unidades de isopreno com fórmula molecular $(C_5H_8)_n$, onde n corresponde ao número de unidades de isopreno (DUDAREVA et al., 2005). Do ponto de vista químico, são substâncias hidrofóbicas, armazenadas em canais de resina, células de óleos essenciais ou mesmo tricomas glandulares, contendo ou não oxigênio que, devido à origem

biossintética são classificados em função do número de subunidades isoprenoides (WINK, 1999).

Os terpenos formam diferentes classes, de acordo com sua estrutura e funcionalidade. Os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20) são os compostos mais frequentes em óleos essenciais. Os monoterpenos são formados a partir de duas unidades de isopreno (C10) e estas moléculas podem constituir 90% dos óleos essenciais, possibilitando uma variedade de estruturas (FALEIRO, 2011).

São sintetizados pela via mevalonato que inicia com a condensação de 3 moléculas de acetil-CoA com subsequente redução pela hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) a mevalonato, o qual é convertido em unidades de isopreno (GONZÁLEZ-BURGOS; GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012). Nas células animais, a síntese de terpenos e de colesterol pode ser controlada alostericamente pela concentração do produto final sobre a atividade da HMG-CoA redutase.

Nos mamíferos, os terpenos estão envolvidos na estabilização das membranas celulares, vias metabólicas e como reguladores das reações enzimáticas (CARVALHO; FONSECA, 2006).

Estudos relatam que a atividade antioxidante dos terpenos está associada tanto à redução completa das EROs, como pelo restabelecimento do sistema antioxidante endógeno e, conseqüentemente, a preservação da função mitocondrial em condições de isquemia cerebral em ratos (DONG et al., 2009; PARK et al., 2011; RONG et al., 2011).

Desde que a DM está associada à elevada produção de EROS, pela oxidação da glicose e da glicação não-enzimática de proteína, e depleção de sistema antioxidante, os terpenos tem mostrado efeito antidiabetogênico através do controle do estresse oxidativo e, conseqüentemente, das complicações diabéticas (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003; CHO et al., 2006).

A ação antihiperlipidêmica dos terpenos esteve associada à indução de genes envolvidos na ativação da glicólise e da fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, inibição da gliconeogênese (JEPPESEN et al., 2000).

Estudos também têm demonstrado que terpenos são considerados agentes antidiabetogênicos por ativarem receptores PPAR (receptor ativador peroxisoma proliferador), os quais são os reguladores chave da expressão de genes envolvidos no metabolismo da glicose e no catabolismo de lipídios (TAKKAHASHI et al., 2002; BHARTI et al., 2013). Desta forma, ocorre controle da hiperglicemia, possivelmente por aumentar a liberação de insulina pelas células β pancreáticas e aumento da depuração de lipídios celulares e circulantes com controle da hiperlipidemia (TAKKAHASHI et al., 2002).

Geraniol (Figura 5) é um monoterpreno acíclico presente na composição de óleos essenciais de várias plantas, especialmente em capim-limão, gengibre, noz-moscada, coentro, limão. É amplamente utilizado como um agente aromatizante em alimentos e bebidas e também pela sua fragrância na indústria de cosméticos e produtos de limpeza (LAPCZYNSKI et al., 2008; CHEN; VILJOEN, 2010; SOLORZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012; TOMADONI et al., 2015; CASSANI et al., 2016).

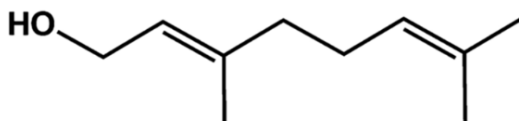


Figura 5: Estrutura química geraniol.

Estudos direcionados à investigação farmacológica do geraniol têm sido bastante desenvolvidos devido, principalmente, à baixa toxicidade à mamíferos e sua facilidade de biodegradação, sendo classificado como seguro para uso humano (CARNESECCHI et al., 2004; LAPCZYNSKI et al., 2008; CHEN; VILJOEN, 2010; DOBREVA et al., 2011).

Como agente terapêutico, o geraniol vem se destacando pela sua ação como antimicrobiano, anti-inflamatório, neuroprotetor e, especialmente, como antioxidante (CHEN; VILJOEN, 2010; THAPA et al., 2012; KHAN et al., 2013; REKHA et al., 2013; PRASAD; MURALIDHARA, 2014). Estudos verificaram que o geraniol diminuiu o nível de marcadores do estresse oxidativo e fosforilação oxidativa em cérebro de ratos diabéticos (PRASAD; MURALIDHARA, 2014).

Além de restaurar os níveis de glutathione reduzida no tecido renal em condições diabéticas, mantendo assim o balanço redox celular (AHMAD et al., 2011).

Óleos essenciais da planta capim limão (*Cymbopogon citratus*), que apresenta o geraniol como um dos principais terpenos encontrados na sua composição (>80%), aumentaram a massa de células β -pancreáticas e promoveram a liberação de insulina, permitindo a utilização periférica da glicose e consequentemente redução da hiperglicemia em condições diabéticas (HUYNH et al., 2008). Além disso, apresentou grande capacidade antioxidante e proteção contra a peroxidação lipídica ao aumentar o nível de reduzida, atividade da SOD e CAT no fígado, como relatado por Bharti et al., (2013).

Estudos tem demonstrado o efeito antiaterogênico do geraniol por inibição da atividade da HMG-CoA redutase e por reduzir o nível sérico de colesterol, além de aumentar a concentração sérica de HDL-colesterol (HEINIG; JOHNSON, 2006). Jayachandran; Chadrsekaran; Namasivayan (2015) verificaram que o geraniol reduziu colesterol total, triacilgliceróis e ácidos graxos livres séricos em roedores submetidos a dieta aterogênica. O efeito benéfico do geraniol sobre a dislipidemia foi atribuído a redução sérica de triacilgliceróis, através da atividade da lipase lipoproteica, e pelo aumento da concentração de HDL-colesterol através da lecitina colesterol acil-transferase, além de diminuir o nível de LDL-colesterol circulante (IBRAHIM; EL-DENSHARY; ABDALLAH, 2015).

O conhecimento científico sobre as plantas utilizadas pela população ainda é escasso; pesquisas realizadas nessa área objetivam fornecer informações adequadas para sua utilização. (SILVA; HAHN, 2011). Apesar de vários trabalhos sobre as ações protetoras do geraniol, pouco se sabe sobre o seu efeito na cardiomiopatia diabética.

Hipótese

O geraniol apresenta efeito antidiabetogênico, melhora o perfil lipídico, normaliza o metabolismo energético e controla o estresse oxidativo no tecido cardíaco de ratos com diabetes mellitus tipo1, induzido experimentalmente.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do geraniol sobre as alterações metabólicas e o estresse oxidativo no miocárdio de ratos com diabetes mellitus tipo 1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o peso, ganho de peso, glicemia e dislipidemia promovida pelo DM1;
- Evidenciar o efeito do DM1 sobre as atividades de enzimas marcadoras do metabolismo energético e de complexos enzimáticos respiratórios no tecido cardíaco;
- Analisar a concentração de proteínas totais e glicogênio no tecido cardíaco no DM 1;
- Determinar o estresse oxidativo por meio de biomarcadores e da atividade das enzimas antioxidantes sob condições diabéticas;
- Analisar o efeito antidiabetogênico do geraniol sobre os parâmetros nutricionais, glicemia e dislipidemia em ratos com DM1;
- Identificar o efeito da administração do geraniol sobre as atividades das enzimas marcadoras do metabolismo energético e dos complexos enzimáticos respiratórios no tecido cardíacos de animais com DM 1;
- Analisar a administração do geraniol sobre a concentração de proteínas totais e de glicogênio no tecido cardíaco no estado diabético;
- Determinar o efeito do geraniol sobre o estresse oxidativo através de biomarcadores e da atividade das enzimas antioxidantes no tecido cardíaco em condições diabéticas.

1. Instalação do experimento e animais experimentais

Foram utilizados 32 ratos (*Rattus norvegicus*), raça Wistar, machos, com peso inicial em média de 250g, com 60 dias de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, em ambiente com temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo (ciclos 12:12 horas - claro/escuro) e umidade ($\pm 55\%$) controlados. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP - Campus de Botucatu e foram transferidos para o Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Química e Bioquímica/IB-UNESP-Botucatu. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA), sob número 834.

2. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente e constituíram os seguintes grupos experimentais ($n=8$):

- Controle (C) = ratos normais que receberam apenas ração comercial e água;
- GE = ratos normais que receberam ração comercial, água e geraniol;
- DM = ratos diabéticos que receberam ração comercial e água;
- DM-GE = ratos diabéticos que receberam ração comercial, água e geraniol

O DM1 experimental foi induzido através da administração intraperitoneal de estreptozotocina (STZ - 60 mg/Kg de peso corporal; dose única) diluído em citrato de sódio (0,1M pH 4,5). Após 48 horas da administração da STZ, a glicemia foi determinada através de glicosímetro (Advantage) em amostras de sangue retiradas por punção da cauda. Animais com glicemia ≥ 250 mg/dL foram considerados diabéticos.

Com o estabelecimento do estado diabético, o geraniol foi administrado através da via intragástrica (gavage). Os animais pertencentes aos grupos GE e DM-GE receberam geraniol (Sigma- Aldrich, Saint Louis MO, USA) na concentração de 200 mg/Kg/dia (BABUKUMAR et al., 2017), durante 30 dias. Os animais dos grupos C e DM receberam água filtrada no mesmo procedimento, apenas para provocar o mesmo estresse fisiológico. Os animais receberam água e ração comercial (Purina Labina®, Campinas-SP) *ad libitum* durante o período experimental. O controle da ingestão de água e de ração foi realizado diariamente e

a pesagem dos animais efetuada semanalmente.

3. Determinação da energia ingerida

Considerando o consumo alimentar médio diário e a quantidade de energia metabolizável da ração, a energia ingerida foi calculada segundo Ebaid et al (2006): Energia Ingerida (EI; kcal/dia) = consumo médio de ração x energia metabolizável (3,81).

4. Obtenção das amostras séricas

No final do período experimental (30 dias), os animais foram anestesiados (xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10% e 0,1 mL/100g de peso corporal, i.p.) e a eutanásia foi realizada por decapitação. O sangue foi coletado e o soro separado por centrifugação (6000 rpm, por 15 minutos) e utilizado para determinação da glicemia, colesterol total, triacilgliceróis e HDL-colesterol. Após a retirada do sangue, o coração foi lavado em tampão fosfato de sódio (0,01M; pH 7,0).

5. Determinações bioquímicas séricas

5.1. Determinação da glicemia

A glicose sanguínea, por ação da glicose-oxidase, é oxidada a ácido glicônico e forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este peróxido de hidrogênio formado reage por ação da peroxidase com 4-aminoantepirina e com 1,4-diclorofenol. Por junção oxidativa forma-se antipirilquinonimina, de cor vermelha, cuja intensidade de coloração foi proporcional à concentração de glicose (MOURA, 1982).

5.2. Determinação da concentração de triacilgliceróis

Os triacilgliceróis foram determinados através de sua hidrólise enzimática produzindo glicerol e ácidos graxos. Segundo Soloni (1971), o glicerol oxida-se com ácido periódico a formaldeído, o qual foi quantificado colorimetricamente como 3,5 diacetil-1,4 diidrolutidina.

5.3. Determinação da concentração de colesterol total

O colesterol foi determinado enzimaticamente pelo colesterol oxidase com hidrólise prévia dos ésteres mediante lipase. O peróxido de hidrogênio liberado, na oxidação, produz fenol oxidado e 4-aminofenazona, o qual foi quantificado (MOURA, 1982).

5.4. Determinação da concentração de HDL-colesterol

A lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram precipitadas seletivamente pelo ácido fosfotungstíco. No sobrenadante, separado por centrifugação, estão as lipoproteínas de alta densidade (HDL), na qual foi determinado o colesterol incorporado às mesmas (LOPES-VIRELLA et al., 1977).

5.5. Determinação da concentração de VLDL-colesterol

O valor de VLDL-colesterol foi obtido pela equação de Friedewald (Triacilgliceróis/5) (COHN; ROTH, 1996).

5.6. Determinação da concentração de LDL-colesterol

O valor de LDL-colesterol foi obtido pela equação de Friedewald (LDL-colesterol = colesterol total – HDL-colesterol – triacilgliceróis/5) (COHN; ROTH, 1996).

6. Análises no tecido cardíaco

6.1. Análises do metabolismo energético

Amostras de aproximadamente 100 mg de tecido cardíaco foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,0), com auxílio de homogeneizador tipo *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 x g, durante 15 minutos, a -4°C (PEREIRA et al., 1998). O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade das enzimas do metabolismo energético, complexos enzimáticos respiratórios, estresse oxidativo e concentração das proteínas totais.

O metabolismo energético foi analisado por meio das enzimas reguladoras das vias metabólicas, tais como fosfofrutoquinase (PFK), marcadora da glicólise/gliconeogênese, lactato desidrogenase (LDH) associadas ao metabolismo anaeróbico, piruvato desidrogenase (PiDH) indicadora do metabolismo aeróbico e da glicose, citrato sintase (CS) importante reguladora do metabolismo do aeróbico e controladora do fluxo de metabólitos através do ciclo do ácido cítrico e a β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (OHADH) reguladora da β -oxidação de ácidos graxos.

6.1.1. Atividade da fosfofrutoquinase (PFK)

A atividade foi determinada na presença de aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, triose isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, sendo quantificada pela oxidação do NADH (BASS et al., 1969).

6.1.2. Atividade da lactato desidrogenase (LDH)

A atividade da lactato desidrogenase foi determinada segundo técnica de Wilkinson (1965) utilizando o método UV otimizado, onde foi medida a velocidade do consumo de NADH₂, o qual foi proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

6.1.3. Atividade da piruvato desidrogenase (PiDH)

A velocidade de conversão do piruvato em acetil-CoA, catalisada pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase, foi determinada pela redução do NAD⁺ na presença de tiamina pirofosfato, coenzima-A e piruvato, em tampão fosfato de potássio (BASS et al., 1969).

6.1.4. Atividade da citrato sintase (CS)

A citrato sintase foi determinada a 412nm em tampão tris-HCl 50mM, pH 8,0, contendo acetil-CoA, DTBN (dithiobis-2-nitrobenziato) e oxaloacetato (BASS et al., 1969).

6.1.5. Atividade da β -hidroxiacil coenzima-A desidrogenase (OHADH).

Atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase foi determinada em meio contendo acetoacetil coenzima-A e NADH, o qual teve sua oxidação medida (BASS et al., 1969).

6.2. Análise do estresse oxidativo: marcadores do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes

A análise do estresse oxidativo foi realizada através da concentração de hidroperóxido de lipídio (HP), proteína carbonila, glutathiona reduzida (GSH) e total (GS), e atividade das enzimas antioxidantes.

6.2.1. Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídio (HP)

Foi determinado através da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) na presença de alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol, à temperatura ambiente. O Fe^{3+} reage com alaranjado de xilenol e forma cromógeno, cuja intensidade de coloração foi medida espectrofotometricamente (JIANG; WOOLARD; WOLFF, 1991).

6.2.2. Determinação da concentração da glutathiona total (GS total), glutathiona reduzida (GSH)

A concentração de glutathiona total foi determinada através do método cinético, com a redução do 5,5'-Dithio (2 *nitrobenzoic acid*) (DTNB) pela glutathiona reduzida (GSH) na presença de NADPH (TIETZE, 1969). A concentração da glutathiona reduzida e da atividade da glutathiona redutase foram determinadas em tampão tris-HCl pH 8,9 e DTNB, após prévia precipitação com TCA 50%. O GSH foi utilizado como padrão (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

6.2.3. Determinação da concentração de proteína carbonila (PC)

O sobrenadante foi incubado com 2,4 dinitrophenylhydrazina (DNPH) e centrifugado novamente na presença de tricloroacético (TCA). Após lavagem com acetate de etila/etanol (1:1) foi adicionada guanidine e mantido a 37°C por 10

minutos e, posteriormente procedeu a leitura em absorbância a 360nm (REZNICK; PACKER, 1994).

6.2.4. Determinação da atividade de glutathiona peroxidase (GSH-Px)

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada segundo método de Nakamura; Hosoda; Hayashi (1974), na presença de peróxido de hidrogênio. A mistura reativa foi preparada em tampão fosfato de sódio, NADPH₂, azida sódica, EDTA, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona redutase. Através da oxidação do NADPH₂ na presença da glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG), determinou-se a atividade da GSH-Px.

6.2.5. Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de Ewing; Janero (1995), tendo como base a capacidade de a enzima inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O₂⁻ do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, de acordo com atividade da SOD na amostra.

6.3. Análise da função mitocondrial através da atividade dos complexos respiratórios

Os *pellets* da primeira centrifugação do tecido cardíaco foram suspensos em tampão fosfato de sódio 0,1M contendo 250 mM de sacarose, 2 mM de EDTA e 250 mM de manitol, centrifugado e ressuspensão, onde determinou-se a atividade da NADH-desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II) e ATP sintase.

6.3.1. Determinação da atividade da NADH-desidrogenase (complexo I)

Foi determinada segundo o método descrito por Singer (1984), através da velocidade do consumo de NADH, à 340nm, em tampão fosfato de sódio (80mM pH 7,4) e EDTA (50mM).

6.3.2. Determinação da atividade da succinato desidrogenase (complexo II)

O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,4 na presença de succinato de sódio (10mM), fenazina metassulfato (0,36 mM) e diclorofenolindofenol (12 mM) (FISCHER et al., 1985).

6.3.3. Determinação da atividade da ATP-sintase

Foi determinada em tampão TRIS-HCl na presença de cloreto de magnésio, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP e lactato desidrogenase e, em seguida procedeu as leituras à 340nm (DESAI et al., 1996).

6.4. Determinação da concentração de proteínas totais

Foram determinadas empregando-se o método de Biureto, onde as ligações peptídicas das proteínas reagiram com o íon cúprico, em meio alcalino, resultando em um complexo de cor violeta, cuja intensidade de coloração é proporcional à concentração de proteínas na amostra (MOURA, 1982).

6.5. Determinação da concentração do glicogênio

Na determinação do glicogênio, amostras de 100mg de tecido cardíaco foram homogeneizadas (3000 rpm, por 10 minutos) com ácido perclórico (0,6 mol/L). Do sobrenadante retirou-se uma alíquota (10 µl) para determinar a concentração inicial de glicose e, o restante recebeu amiloglicosidase em meio contendo tampão acetato de sódio (0,05 M, pH 4,5) a 50°C, nesta mistura reativa determinou a concentração final de glicose. A concentração de glicogênio foi calculada pela diferença entre as concentrações de glicose final e inicial, segundo Roehrig; Allred (1974). A concentração de glicose foi determinada de acordo com Moura (1982).

6.6. Determinação da concentração de triacilgliceróis

Para a determinação da concentração de triacilgliceróis, amostras de aproximadamente 100mg de tecido cardíaco foram homogeneizados em mistura de clorofórmio/metanol (2:1). O homogeneizado recebeu 4mL de clorofórmio e 4mL

de água e foi filtrado, em seguida as amostras ficaram em repouso durante 24 horas. Após, a fase aquosa foi recolhida com auxílio de uma micropipeta e desprezada (BLIGH; DYER, 1996). Na fração restante, determinou-se a concentração de triacilgliceróis através do método enzimático, colorimétrico, de acordo com Soloni (1971).

7. Forma de análise dos resultados - procedimento estatístico

Foram utilizados o delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 8 repetições para as variáveis bioquímicas estudadas, segundo esquema da análise de variância (ANOVA):

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	G.L.
TRATAMENTOS	3
RESÍDUO	29
TOTAL	32

O nível de significância adotado nas análises estatísticas foi de 5% de probabilidade e as estatísticas F foram significativas quando $p \leq 0.05$. Foi utilizado teste Tukey para a comparação entre as médias (ZAR, 1996).

Resultados

O consumo tanto alimentar como de água pelos animais diabéticos não tratados (DM) foi maior ($p<0,05$) em comparação aos demais grupos. A administração de geraniol diminuiu significativamente esses dois parâmetros em animais diabéticos (DM-GE) (Tabela 1; Figuras 6A; 6B). Nota-se que a energia ingerida também foi elevada no grupo DM e apresentou queda com a administração de geraniol (DM-GE) (Tabela 1; Figura 6C).

Quanto ao peso corporal e ganho de peso, não houve diferença significativa entre o grupo controle (C) e tratado com geraniol (GE). Porém, animais diabéticos não tratados (DM) demonstraram redução no peso corporal, e consequentemente no ganho de peso, no final do período experimental, comparativamente aos demais grupos. Os animais do grupo DM-GE apresentaram aumento no peso corporal final, diferindo significativamente quando comparado aos animais do grupo DM (Tabela 1; Figura 6D). Com relação à variação de peso corporal, a administração de geraniol em animais diabéticos (DM-GE) aumentou significativamente em relação ao grupo DM e diminuiu significativamente em relação ao grupo C (Tabela 1; Figura 6E).

TABELA 1. Consumo alimentar, consumo de água, energia ingerida, peso e ganho de peso corporal para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos			
	C	GE	DM	DM-GE
Consumo alimentar <i>g/d</i>	28,62±2,35a	26,36±2,30a	49,54±8,00b	23,67±6,04a
Consumo de água <i>mL/d</i>	39,78±3,92a	39,07±4,02a	236,30±33,23b	61,55±20,13a
Energia ingerida <i>kcal/d</i>	109,06±8,94a	100,43±8,76a	181,31±24,82b	109,20±11,80a
Peso corporal final <i>g</i>	382,65±40,99b	366,53±17,77b	235,29±51,01a	336,66±48,41b
Ganho de peso <i>g</i>	139,70±33,91c	115,28±10,24bc	-10,50±36,82a	93,03±37,50b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p<0,05$). C = controle; GE= geraniol; DM= diabéticos; DM-GE= diabéticos + geraniol.

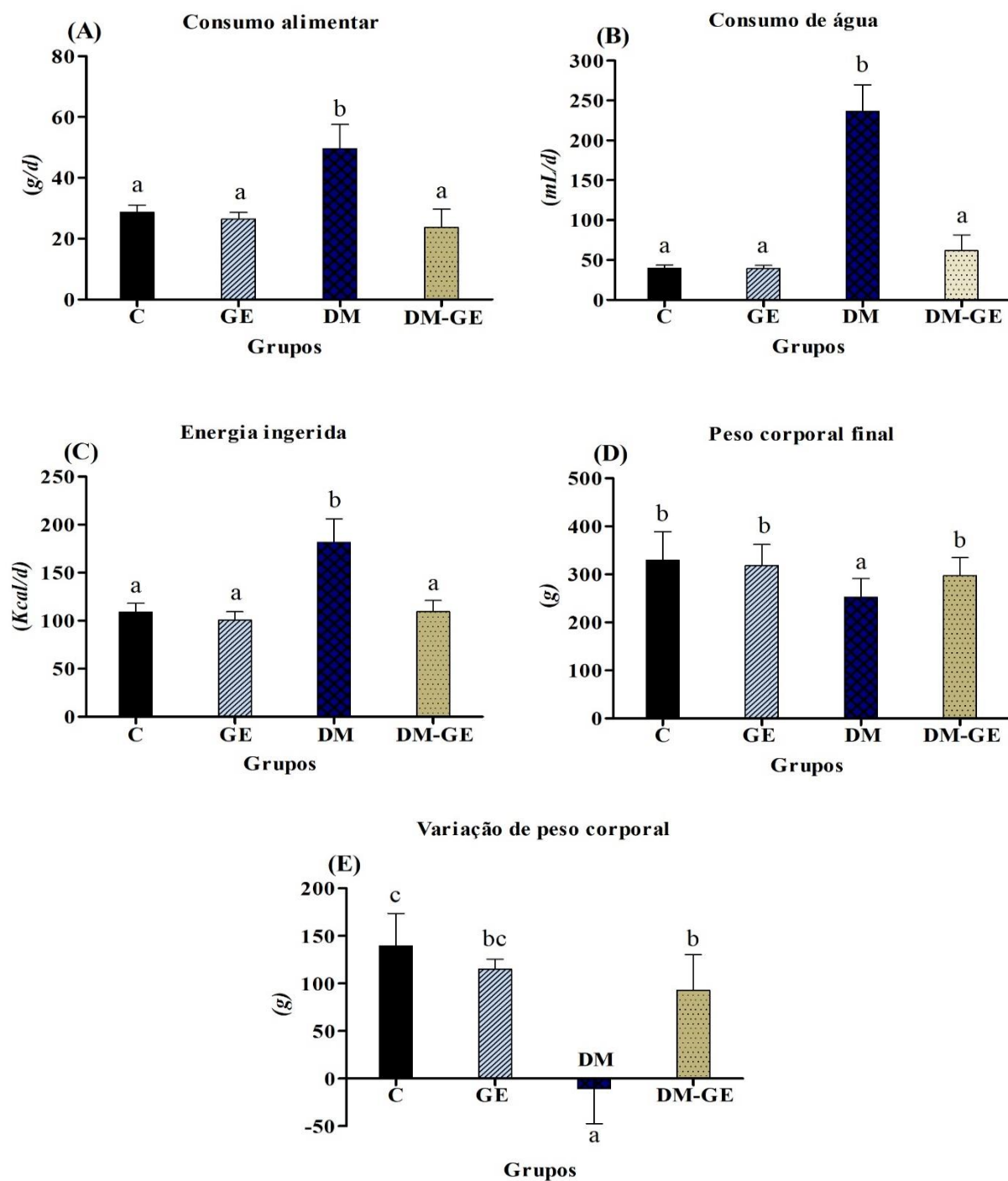


Figura 6: (A) Consumo alimentar; (B) Consumo de água; (C) Energia ingerida; (D) Peso corporal final e (E) Variação de peso corporal para os diferentes grupos experimentais. Médias $\pm$ Desvios padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0,05$). C (grupo controle), GE (ratos normais que receberam geraniol), DM (ratos diabéticos) e DM-GE (ratos diabéticos que receberam geraniol).

A Tabela 2 mostra a glicemia e o perfil lipídico no soro dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. Pode-se verificar que os animais diabéticos apresentaram aumento na concentração sérica de glicose, comparativamente aos demais grupos. A administração de geraniol em animais diabéticos demonstrou redução significativa neste parâmetro comparado ao DM, diferindo estatisticamente também dos grupos C e GE (Figura 7A). Animais diabéticos submetidos ao tratamento com geraniol (DM-GE) apresentaram redução do nível sérico de colesterol total, comparativamente àqueles diabéticos não tratados (DM). Não houve alterações significantes na concentração de colesterol total entre os grupos C, GE e DM-GE (Tabela 2; Figura 7B).

A concentração tanto de triacilgliceróis, VLDL-C e LDL-C nos animais que receberam geraniol (DM-GE) diminuíram significativamente em relação aos animais diabéticos não tratados (DM), não diferindo dos grupos C e GE (Tabela 2; Figuras 7C; 7D; 7E).

Como demonstrado na Tabela 2; Figura 7F, animais do grupo DM apresentaram diminuição significativa na concentração sérica de HDL-C, em relação aos demais grupos experimentais. Este parâmetro aumentou em animais diabéticos submetidos a administração de geraniol (DM-GE), atingindo valores próximos do grupo controle.

TABELA 2. Concentração sérica de glicose, colesterol, triacilgliceróis, VLDL-colesterol, LDL-colesterol e HDL-colesterol para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos			
	C	GE	DM	DM-GE
Glicose mg/dL	159,66±17,82a	158,98±9,65a	437,32±33,33b	227,59±28,06c
Colesterol mg/dL	110,71±6,95a	108,71±6,11a	137,50±8,27b	117,19±10,66a
Triacilgliceróis mg/dL	123,67±6,12a	121,74±9,08a	181,12±11,86b	131,18±11,66a
VLDL-C mg/dL	24,73±1,22a	24,35±1,82a	36,22±2,37b	26,24±2,33a
LDL-C mg/dL	54,33±7,42a	49,31±5,76a	77,15±6,28b	57,15±11,36a
HDL-C mg/dL	33,58±6,51b	35,06±6,35b	24,13±6,59a	34,40±4,12b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C = controle; GE= geraniol; DM= diabéticos; DM-GE= diabéticos + geraniol.

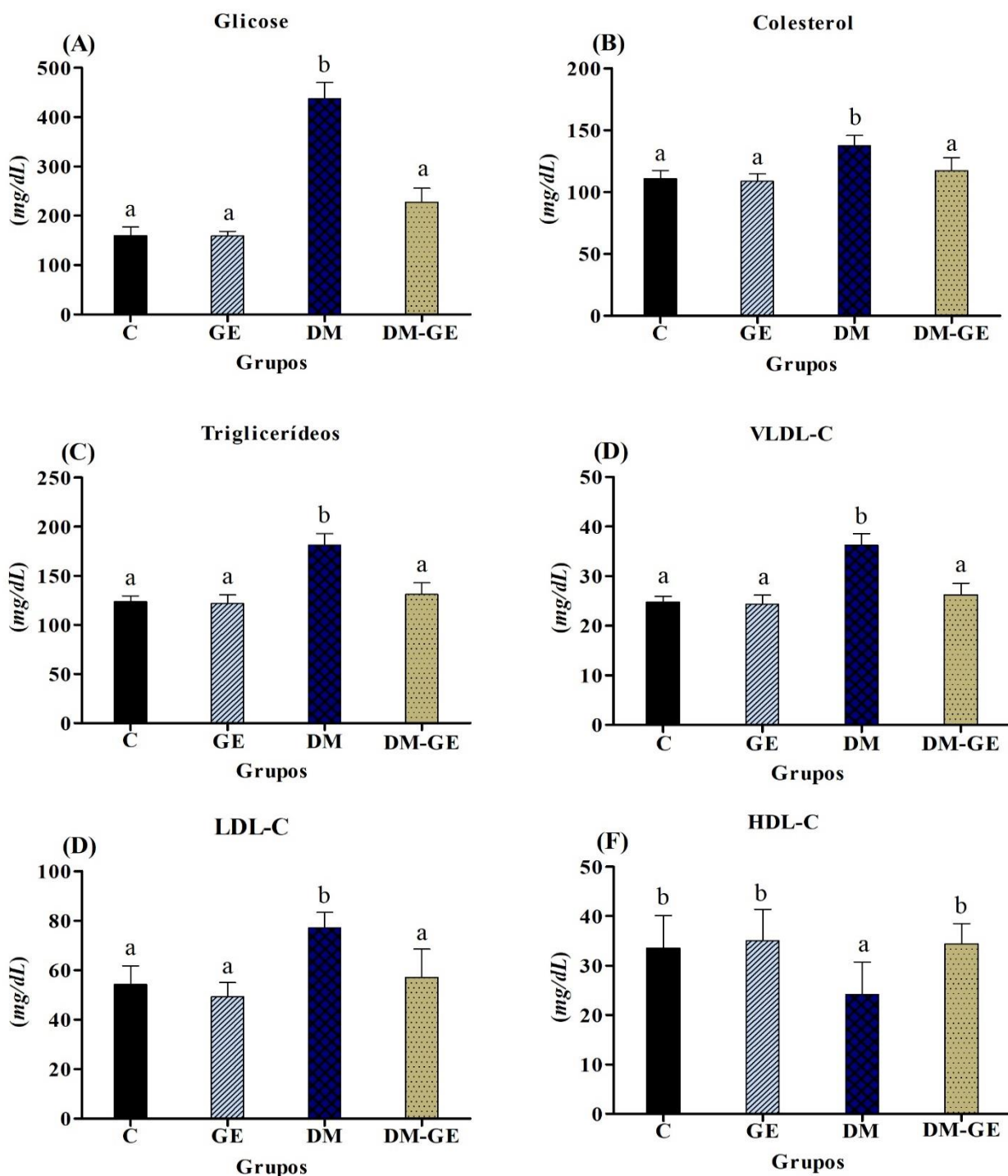


Figura 7: (A) Glicose; (B) Colesterol total; (C) Triacilgliceróis; (D) Lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL-C), (E) Lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e (F) Lipoproteína de alta densidade (HDL-C) séricas, para os diferentes grupos experimentais. Médias $\pm$ Desvios padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0,05$). C (grupo controle), GE (ratos normais que receberam geraniol), DM (ratos diabéticos) e DM-GE (ratos diabéticos que receberam geraniol).

Não houve diferenças significativas para a concentração de proteínas totais no tecido cardíaco dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais (Tabela 3, Figura 8A).

A concentração cardíaca de glicogênio apresentou-se diminuída sob estado diabético (DM), enquanto a administração de geraniol foi suficiente para elevá-la, de forma significativa, obtendo valores próximos aos obtidos pelos animais dos grupos C e GE (Tabela 3; Figura 8B). A concentração de triacilgliceróis no miocárdio em animais diabéticos apresentou-se elevada em relação aos demais grupos (Tabela 3; Figura 8C).

TABELA 3. Concentração cardíaca de proteínas totais, glicogênio e triacilgliceróis, nos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos			
	C	GE	DM	DM-GE
Proteínas totais <i>mg/100mg tec</i>	48,70±5,75	50,73±5,89	49,81±5,18	47,98±4,23
Glicogênio <i>mg/g tec</i>	21,99±2,34b	22,91±3,99b	14,69±1,99a	24,34±3,09b
Triacilgliceróis <i>mg/g tec</i>	22,06±1,50a	18,83±2,27a	30,78±3,03b	29,72±2,83b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos (p<0.05). C = controle; GE= geraniol; DM= diabéticos; DM-GE= diabéticos + geraniol.

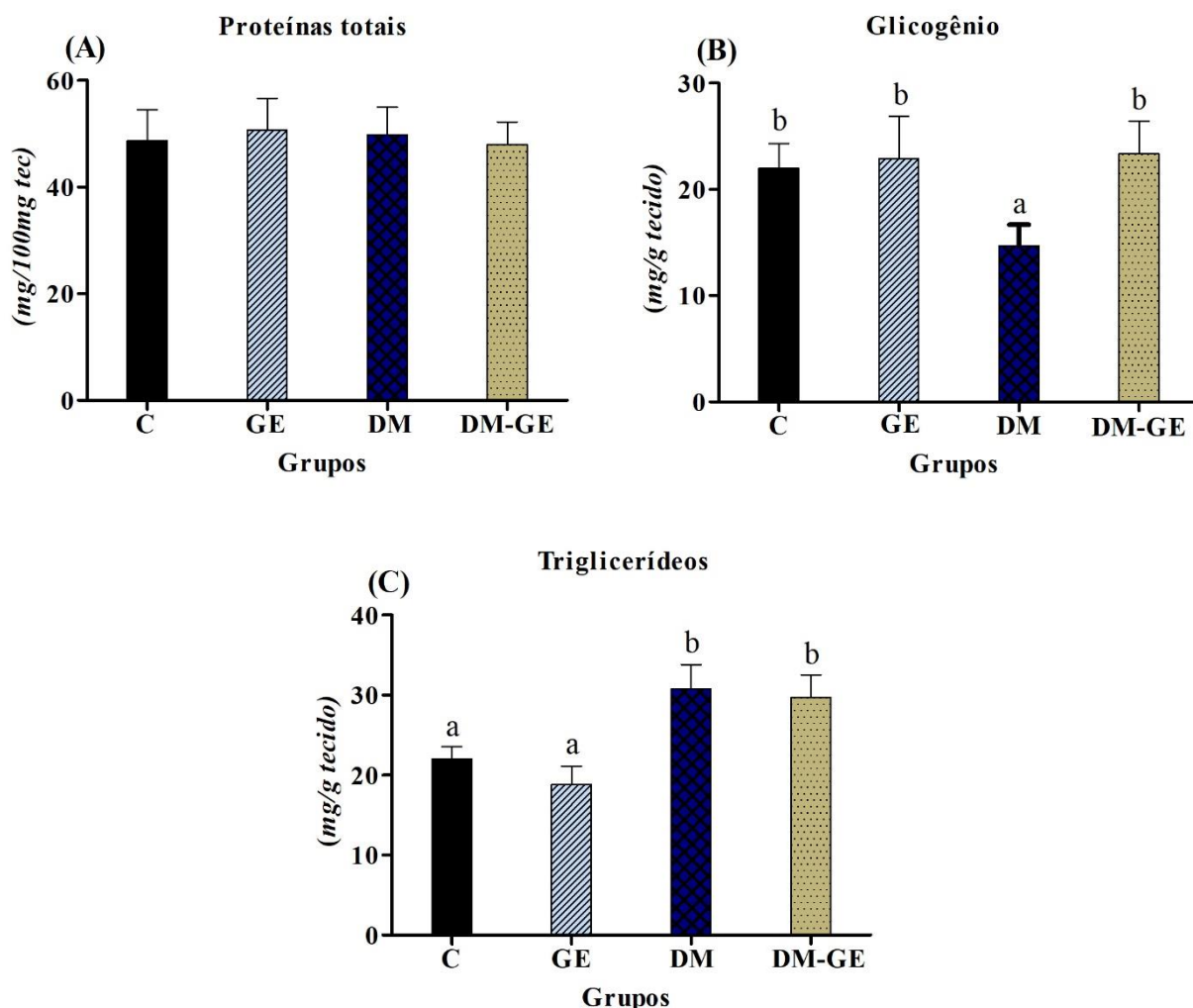


Figura 8: (A) Proteínas totais; (B) Glicogênio; (C) Triacilgliceróis no tecido cardíaco, para os diferentes grupos experimentais. Médias $\pm$ Desvios padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). C (grupo controle), GE (ratos normais que receberam geraniol), DM (ratos diabéticos) e DM-GE (ratos diabéticos que receberam geraniol).

A Tabela 4 apresenta a atividade das enzimas marcadoras do metabolismo energético cardíaco. A atividade da enzima fosfofrutoquinase (PFK) mostrou-se diminuída ($p < 0,05$) nos animais do grupo DM em relação aos demais grupos. A administração do geraniol em animais diabéticos levou o aumento da atividade desta enzima (DM-GE), porém com ausência de diferença significativa (Figura 9A).

A atividade da enzima piruvato desidrogenase (PiDH), esteve diminuída nos animais diabéticos (DM) e aumentada naqueles que receberam tratamento com geraniol (grupos GE e DM-GE) (Tabela 4; Figura 9B).

Não foram observadas diferenças significativas na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) entre os grupos experimentais (Tabela 4; Figura 9C).

A atividade da enzima citrato sintase (CS) aumentou de forma significativa nos animais do grupo DM, enquanto aqueles diabéticos que receberam geraniol (DM-GE) tiveram queda na atividade desta enzima, atingindo valores próximos dos grupos C e GE (Figura 9D).

A atividade da β -hidroxil CoA desidrogenase (OHADH) aumentou ($p < 0,05$) no tecido cardíaco dos animais submetidos ao diabetes experimental (DM), diferindo estatisticamente apenas do grupo GE. O tratamento com geraniol em ratos diabéticos (DM-GE) não foi suficiente em amenizar o aumento da atividade desta enzima (Tabela 4; Figura 9E).

TABELA 4. Atividade cardíaca de fosfofrutoquinase (PFK), piruvato desidrogenase (PiDH), lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS) e B-Hidroxil CoA desidrogenase (OHADH), para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos			
	C	GE	DM	DM-GE
PFK nmol/g tec	256,13 $\pm$ 41,68b	264,90 $\pm$ 47,87b	169,91 $\pm$ 44,06a	218,62 $\pm$ 37,87ab
PiDH nmol/g tec	66,65 $\pm$ 9,90b	87,29 $\pm$ 13,98c	48,46 $\pm$ 7,21a	75,29 $\pm$ 13,09bc
LDH nmol/g tec	117,61 $\pm$ 19,30a	112,14 $\pm$ 17,15a	111,54 $\pm$ 19,26a	102,40 $\pm$ 12,50a
CS nmol/g tec	86,02 $\pm$ 9,92a	79,04 $\pm$ 10,19a	103,72 $\pm$ 11,85b	86,62 $\pm$ 10,81a
OHADH nmol/mg tec	1,56 $\pm$ 0,13ab	1,50 $\pm$ 0,13a	2,25 $\pm$ 0,74b	2,02 $\pm$ 0,79ab

Médias $\pm$ Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0.05$). C = controle; GE= geraniol; DM= diabéticos; DM-GE= diabéticos + geraniol.

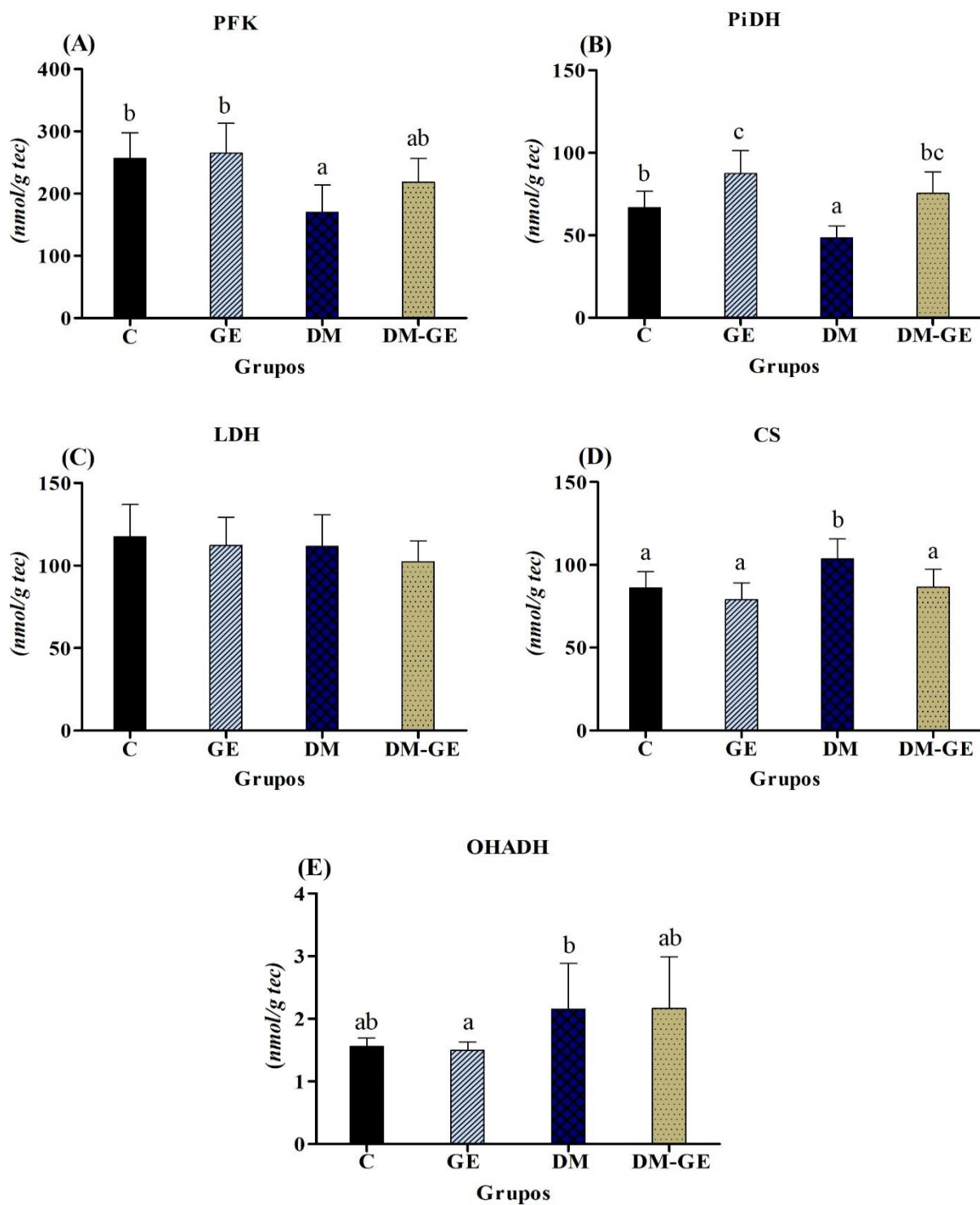


Figura 9: (A) Fosfofrutoquinase (PFK); (B) Piruvato desidrogenase (PiDH); (C) Lactato desidrogenase (LDH); (D) Citrato sintase (CS) e (E) B-Hidrociacil CoA desidrogenase (OHADH) no tecido cardíaco, para os diferentes grupos experimentais. Médias $\pm$ Desvios padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0,05$). C (grupo controle), GE (ratos normais que receberam geraniol), DM (ratos diabéticos) e DM-GE (ratos diabéticos que receberam geraniol).

Tabela 5 apresenta a atividade dos complexos enzimáticos mitocondriais. Nota-se que a atividade da NADH-desidrogenase apresentou-se diminuída ($p<0,05$) nos animais do grupo DM em comparação aos demais grupos. Com a administração do geraniol, a atividade dessa enzima aumentou significativamente no grupo DM-GE (Figura 10A). Animais diabéticos não tratados (DM) e diabéticos tratados com geraniol (DM-GE) demonstraram os menores ($p<0,05$) valores obtidos para a atividade da succinato desidrogenase, não diferindo entre si, mas com diferenças estatísticas em relação aos grupos C e GE (Figura 10B)

A atividade da ATP-sintase apresentada na Tabela 5; Figura 10C decresceu no tecido cardíaco dos animais diabéticos (DM), em relação aos demais grupos e os animais que receberam geraniol apresentaram aumento da atividade desta enzima (GE e DM-GE).

TABELA 5. Atividade cardíaca da NADH-desidrogenase (NADH-DH), succinato desidrogenase (SUC-DH) e ATP-sintase (ATP-sint), para os diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos			
	C	GE	DM	DM-GE
NADH-DH nmol/mg tec	4,51±0,84b	4,98±1,01b	2,62±0,82a	4,75±0,91b
SUC-DH nmol/mg tec	0,61±0,10b	0,51±0,08b	0,23±0,05a	0,24±0,07a
ATP-sint nmol/mg tec	25,74±3,64b	31,57±5,20c	18,89±2,74a	25,09±3,11b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p<0.05$). C = controle; GE= geraniol; DM= diabéticos; DM-GE= diabéticos + geraniol.

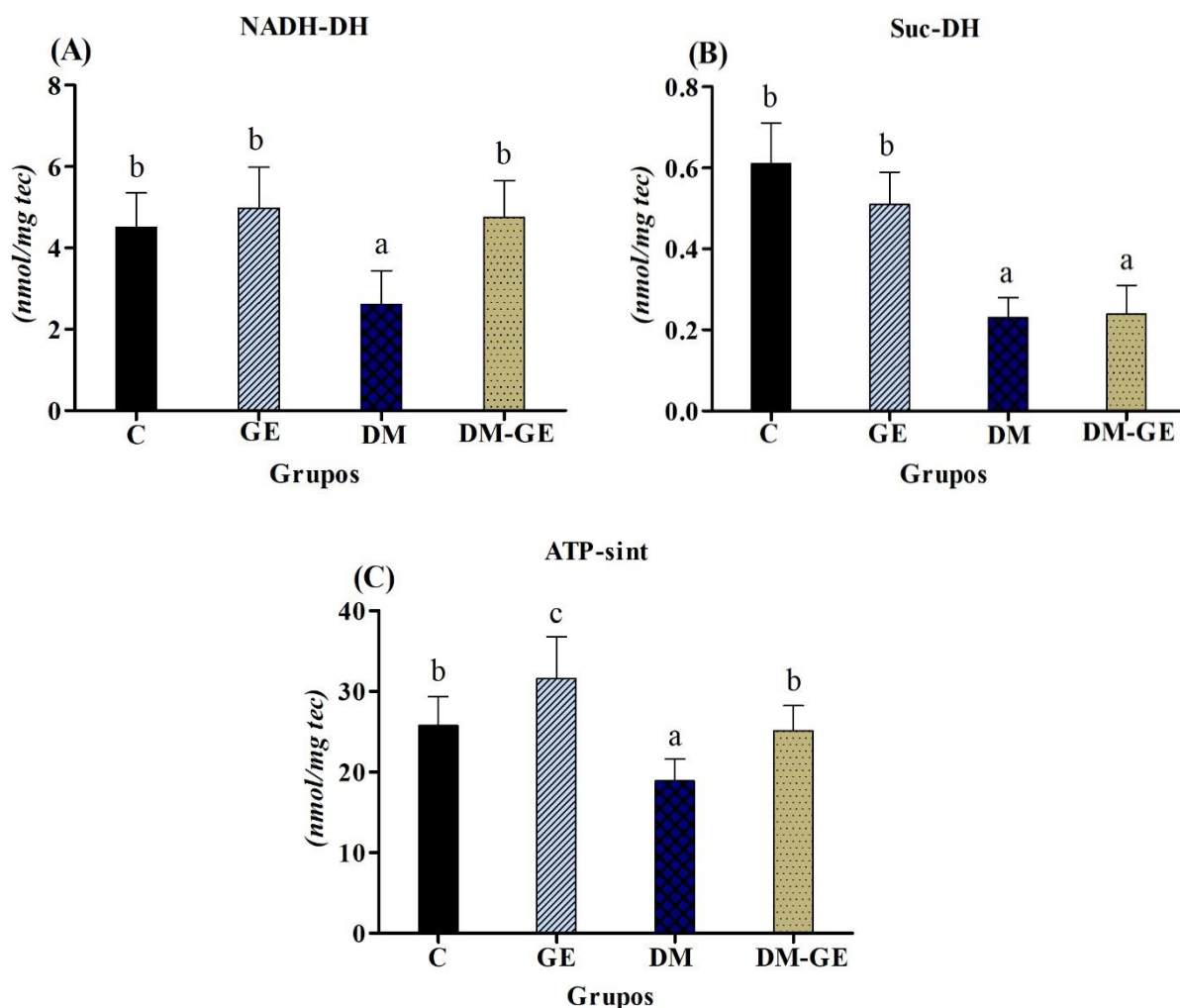


Figura 10: (A) NADH-desidrogenase (NADH-DH); (B) Succinato desidrogenase (SUC-DH) e (C) ATP-sintase (ATP-sint) no tecido cardíaco, para os diferentes grupos experimentais. Médias $\pm$ Desvios padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0,05$). C (grupo controle), GE (ratos normais que receberam geraniol), DM (ratos diabéticos) e DM-GE (ratos diabéticos que receberam geraniol).

Na Tabela 6, estão apresentados os valores obtidos para a avaliação do estresse oxidativo (biomarcadores e atividade das enzimas antioxidantes) no tecido cardíaco. Não foram observadas diferenças significativas na concentração tanto da glutatona total como na reduzida (Figuras 11A; 11B).

Nota-se que a administração de geraniol diminuiu a concentração de hidroperóxido de lipídio e de proteína carbonila no miocárdio dos animais do grupo (DM-GE), comparativamente ao grupo DM (Tabela 6; Figuras 11C; 11D).

A atividade da SOD foi menor ($p<0,05$) nos grupos DM e DM GE em relação aos demais grupos, os quais não diferiram significativamente (Tabela 6; Figura 11E).

Conforme a Tabela 6; Figura 11F pode-se verificar que a administração de geraniol foi eficiente em elevar a atividade da glutathione peroxidase no tecido cardíaco de animais diabéticos (GE-DM), o qual não diferiu ($p>0,05$) do grupo C e do grupo GE.

TABELA 6. Concentração cardíaca de glutathione total (GS total), glutathione reduzida (GSH), hidroperóxido de lipídios (HP), proteína carbonila (PC), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) nos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos			
	C	GE	DM	DM-GE
GS total nmol/mg tec	3,81±0,69	3,94±0,95	3,81±0,74	4,47±0,72
GSH nmol/mg tec	0,85±0,11	0,87±0,12	0,84±0,06	0,84±0,04
HP nmol/mg tec	121,86±23,98a	128,73±15,05a	213,08±29,07c	167,95±18,92b
PC nmol/mg tec	200,32±25,01a	171,81±30,07a	269,56±34,10b	196,31±36,34a
SOD nmol/mg tec	3,63±0,33bc	3,94±0,26b	2,97±0,28a	3,38±0,36ac
GSH-Px nmol/mg tec	26,35±3,10b	30,41±6,29b	18,91±2,72a	27,18±3,90b

Médias ± Desvios Padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p<0.05$). C = controle; GE= geraniol; DM= diabéticos; DM-GE= diabéticos + geraniol.

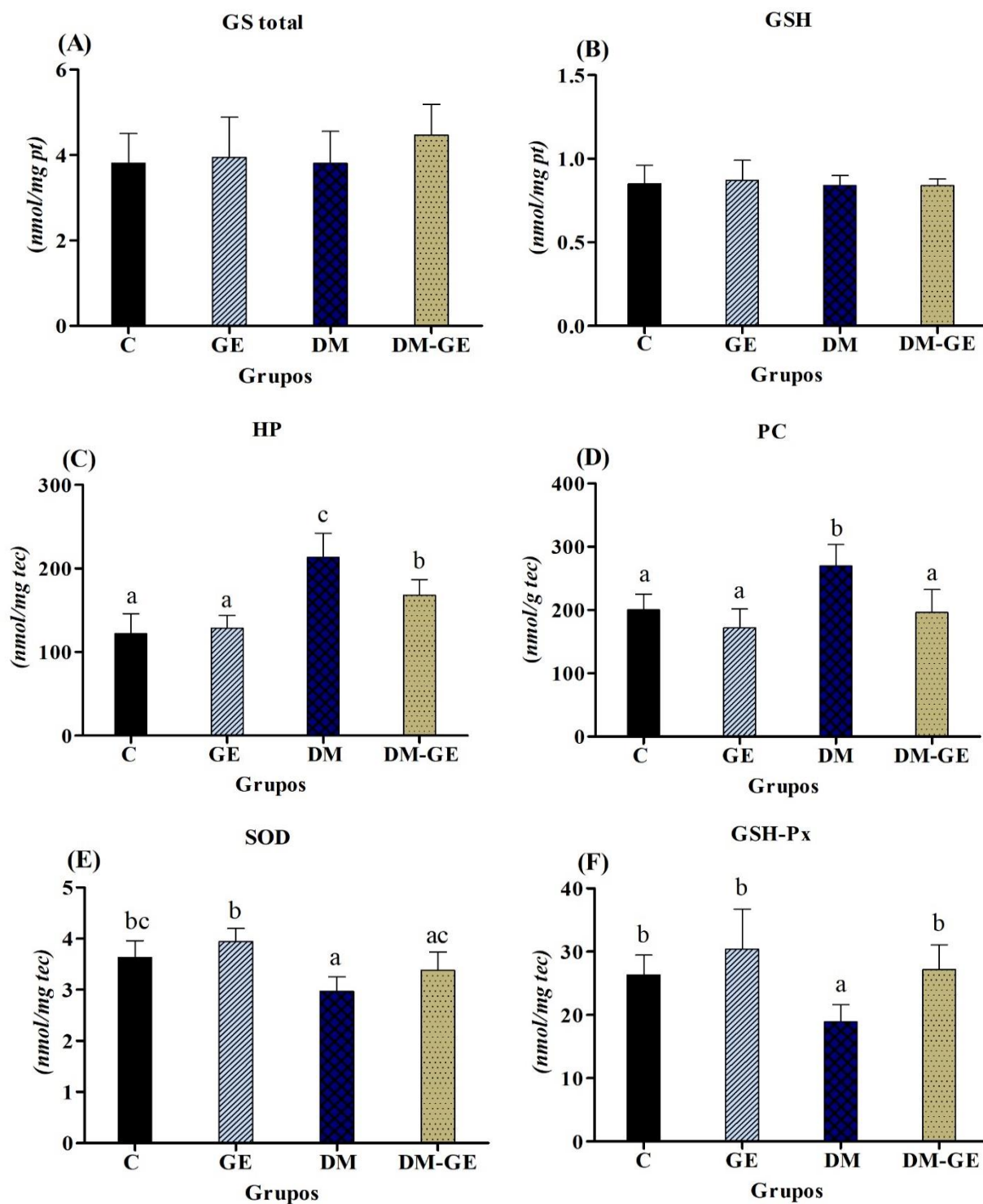


Figura 11: (A) Glutaciona total (GS total); (B) Glutaciona reduzida (GSH); (C) Hidroperóxido de lípidio (HP); (D) Proteína Carbonila (PC); (E) Superóxido dismutase (SOD) e (F) Glutaciona peroxidase (GSH-Px) no tecido cardíaco, para os diferentes grupos experimentais. Médias $\pm$ Desvios padrão. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significantes entre os grupos ($p < 0,05$). C (grupo controle), GE (ratos normais que receberam geraniol), DM (ratos diabéticos) e DM-GE (ratos diabéticos que receberam geraniol).

Discussão

A indução da DM por estreptozotocina (STZ) em animais é um método amplamente utilizado, pois apresenta similaridade com o estado patológico em humanos (LARSEN et al., 2002). Trata-se de um bom modelo para triagem preliminar de agentes terapêuticos ativos e estudo de mecanismos fisiopatológicos e atividade hipoglicemiante e antidiabetogênica de certos compostos sobre a patologia, em ensaios biológicos (FRANCO, 2013; BADIYAL; DESAI, 2014).

A STZ [2-desoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glicopirranose] é um composto natural produzido pela bactéria *Streptomyces achromogenes*, cuja fórmula molecular é $C_8H_{15}N_3O_7$ com peso molecular de 265 g/mol, a sua estrutura química é composta por nitrosoureia ligado a um grupo metilo e a uma molécula de glicose (DOLAN, 1997; SZKUDELSKI, 2001). (Figuras 12 A, B).

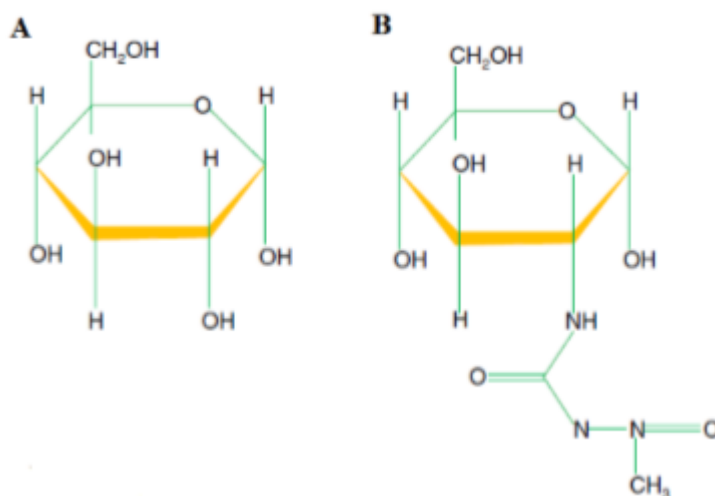


Figura 12: Estrutura de: A) Glicose; B) Estreptozotocina (modificado de ELEAZU et al., 2013).

O mecanismo de ação da STZ inclui a destruição seletiva das células β pancreáticas, com baixa produção da insulina e comprometimento na captação de glicose pelos tecidos periféricos, o que leva à hiperglicemia persistente e ao estabelecimento das complicações diabéticas (GROVER et al., 2002; KING, 2012).

A STZ internaliza as células β pancreáticas através dos transportadores de glicose GLUT-2, gerando EROs, os quais fragmentam a estrutura do DNA causando

o efeito β -citotóxico através de danos oxidativos (ELEAZU et al., 2013; GHOSH et al., 2015; BISWAS et al., 2017).

No presente estudo, a administração de STZ desencadeou sintomas clássicos de DM tipo 1, entre eles, baixo peso corporal, hiperglicemia, maior consumo alimentar (polifagia) e de água (polidipsia). Estes resultados são consistentes com relatos da literatura ao indicarem os efeitos diabetogênicos da STZ (PARI; RAJARAJESWARI, 2009; SUNDARAM; SHANTHI; SACHDANANDAM, 2014).

O maior consumo alimentar, em animais diabéticos (Tabela 1; Figura 6A), pode ser atribuído à indisponibilidade de moléculas de glicose no meio intracelular, interferindo na regulação da saciedade. Na ausência de insulina, o núcleo hipotalâmico ventro-medial, responsável pela regulação da fome, não capta glicose e não é inibido pelo mecanismo de *feedback* negativo. Assim, há sinalização da falta de glicose e, portanto, a sensação de fome, que estimula maior ingestão alimentar (JACOBSON, 1996; RIOS; WARD, 2008).

Consumo hídrico elevado foi observado no presente estudo, no grupo DM (Tabela 1; Figura 6B). O excesso de glicose não internalizada pela célula é excretada pela urina, desencadeando quadro de diurese osmótica (poliúria), levando à desidratação e, conseqüentemente, ativação do centro da sede e polipsia (GUYTON; HALL, 2006). A desidratação intracelular é reconhecida pelos osmorreceptores cerebrais que geram como resposta sede intensa, característica da DM tipo 1 (LERCO et al., 2003).

Os animais do grupo DM apresentaram tanto diminuição do peso corporal final como ganho de peso (Tabela 1; Figuras 6D; 6E), embora tenham apresentado maior ingestão alimentar e energética (Tabela 1; Figuras 6A; 6C). Isto pode ocorrer devido à indisponibilidade de glicose para a célula. De forma compensatória, a célula promove oxidação de ácidos graxos e aminoácidos para produção de energia em detrimento de glicose.

O remanejamento de combustíveis metabólicos caracteriza o metabolismo especial da DM 1, onde ocorre elevação da mobilização de triacilgliceróis

armazenados no tecido adiposo (lipólise) e catabolismo oxidativo de aminoácidos para fornecimento de esqueletos carbônicos para oxidação (ORSOLIC et al., 2011).

Animais diabéticos não tratados apresentaram redução da massa corporal (Tabela 1; Figura 6E). A baixa concentração de insulina degrada as maiores reservas metabólicas, provoca catabolismo intenso de proteínas estruturais (proteólise muscular) e lipólise (EISELEIN; SCHWARTZ; RUTLEDGE, 2004; FINN; DICE, 2006). Além disso, a poliúria instalada resulta em desidratação, sendo mais uma possível causa da perda de peso (OKON et al., 2012).

A hiperglicemia estabelecida no grupo DM foi apresentada na Tabela 2; Figura 7A. A alteração desse parâmetro pode ser em consequência da baixa captação da glicose pelos tecidos periféricos, assim como, pela alta glicogenólise hepática e a gliconeogênese (OLIVEIRA; BRAGA; FERNANDES, 2013).

Perseghin et al (2005) observaram aumento na produção endógena de glicose em indivíduos com DM tipo 1, devido à baixa supressão da insulina sobre a gliconeogênese. Os autores também relataram que a taxa de remoção metabólica da glicose pelos tecidos insulino-dependentes esteve diminuída nestes pacientes. Além disso, o fígado libera grande quantidade de glicose para a corrente sanguínea, contribuindo para o estabelecimento e manutenção da hiperglicemia em indivíduos diabéticos.

A alta ingestão alimentar também pode ter contribuído para elevar a glicemia nos animais diabéticos (Tabela 1, Figura 6A; Tabela 2; Figura 7A).

A administração de geraniol em ratos diabéticos, diminuiu significativamente a concentração plasmática de glicose (Tabela 2; Figura 7A), bem como normalizou o consumo alimentar, energético, hídrico e peso corporal (Tabela 1; Figura 6). Sundaram; Shanthi; Sachdanandam (2014); Babukumar et al (2017) relataram os efeitos benéficos do geraniol frente às complicações diabéticas, como, perda de peso corporal e ingestão alimentar excessiva, causada por distúrbios no metabolismo da glicose e, opondo-se aos efeitos diabetogênicos causados pela STZ.

Os possíveis mecanismos de ação do geraniol sobre o efeito hipoglicemiante pode ser atribuído ao aumento da liberação de insulina pelas células β -pancreáticas, por eliminar as EROs e impedir a peroxidação lipídica, preservando a massa

pancreática e de glicogênio hepático e muscular. Tal liberação ainda aumenta o número e sensibilidade do sítio receptor de insulina, resultando em maior captação celular de glicose e correção da desordem no metabolismo tanto de lipídios como de proteínas (SAID et al., 2002; VOLPATO et al., 2002; LI et al., 2004).

Babukumar et al (2017), observaram que ratos diabéticos tratados com geraniol apresentaram níveis aumentados de insulina plasmática, indicando que o tratamento melhorou a função das células β pancreáticas, o que pode estar relacionado ao fechamento de canais de K^+ /ATP e à estimulação do influxo de Ca^{2+} , etapa essencial e inicial para a secreção de insulina pelas células β pancreáticas. Estes resultados estão em concordância com Lone; Yun (2016) que observaram aumento da secreção de insulina e redução da glicemia em ratos diabéticos tratados com limoneno, um monoterpeneo.

Adicionalmente, estudos histopatológicos demonstraram aumento percentual de células β por ilhota pancreática em ratos diabéticos tratados com geraniol (BABUKUMAR et al., 2017) e com o monoterpeneo mirtrenal (RATHINAM et al., 2014).

A hiperlipidemia, complicação conhecida da DM, é caracterizada pelos níveis plasmáticos aumentados de triacilgliceróis, colesterol total e suas frações lipoproteicas LDL-colesterol e VLDL-colesterol e redução de HDL-colesterol (SHEW et al., 2001; HAIDARA et al., 2004; VERGES, 2009).

O interesse no estudo do perfil lipídico na DM surge da incidência amplamente reconhecida de doença aterosclerótica, uma das principais causas de morte prematura em pacientes diabéticos (LEON; MADDOX, 2015; CHAWLA, CHAWLA, JAGGI, 2016). A hipercolesterolemia, provocada tanto pela biossíntese elevada como pela baixa internalização celular das LDLs-colesterol, é o principal fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose na cardiomiopatia diabética (OKOSHI et al., 2007).

Neste estudo, o aumento dos níveis séricos de colesterol, triacilgliceróis, VLDL-colesterol, LDL-colesterol e diminuição do HDL-colesterol (Tabela 2; Figura 7) identificam disfunções do metabolismo de lipídios em ratos diabéticos não tratados (grupo DM), o que confirma a dislipidemia, respaldada por estudos

anteriores (ALMEIDA et al., 2012; AYYASAMY; LEELAVINOTHAN, 2016). A elevação dos lipídios séricos pode ser resultado de uma depuração ineficiente e/ou superprodução, que pode levar a alteração da função cardíaca por modificações na estrutura tecidual e remodelação cardíaca (AKULA et al., 2003).

A deficiência de insulina resulta em alterações de componentes importantes no metabolismo lipídico, como aumento na concentração de acetil-CoA e na atividade da β -hidroxi-metil glutaril- CoA redutase (HMG-CoA redutase), fatores importantes que elevam a biossíntese do colesterol e, conseqüentemente, resultam na incidência da aterosclerose (KEENOY; VERTOMMEN, LEEUW, 2005; SHAMIR et al., 2008; AYYASAMY; LEELAVINOTHAN, 2016).

Por outro lado, os ácidos graxos não oxidados são esterificados em triacilgliceróis, incorporados em VLDL-colesterol no fígado e exportados para a corrente sanguínea (KIM; WANG; RODRIGUES, 2012). Ainda assim, as VLDLs-colesterol circulantes em pacientes com DM tipo 1 são frequentemente enriquecidas com colesterol, o que eleva a razão colesterol/triacilgliceróis. A alteração desse parâmetro pode ser associada ao aumento de doenças cardiovasculares, diante da redução da fluidez e da estabilidade da lipoproteína (UPADHYAY, 2015).

A LDL-colesterol é facilmente glicosilada de forma que adere às camadas endoteliais e interage com agentes oxidantes (EROs), transformando-se em LDL oxidada; essa, por sua vez, é identificada como agente invasor, promove o recrutamento de macrófagos, o que resulta em células de espuma e consequente formação de placa de ateroma (DOKKEN, 2008; KIM; WANG; RODRIGUES, 2012; SCHWARTZ; REAVEN, 2012; SCHILLING, 2015).

As concentrações aumentadas de VLDL-colesterol do plasma favorecem o transporte de triacilgliceróis, desta lipoproteína, para HDL-colesterol, diminuindo a sua densidade, durante o catabolismo de VLDL-colesterol e de quilimícrons. Esta depuração acelerada aumenta o teor de lipídios nas HDLs-colesterol, o que promove queda no nível sérico de HDL-colesterol (GOLDBERG, 2001; TASKINEN, 2003).

Além de seu papel na via reversa do colesterol, a HDL-colesterol apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitrombóticas, vasorrelaxantes e

antiaterogênico, as quais estão reduzidas na DM tipo 1 (LINK; ROHATGI; LEMOS, 2007; VERGES, 2009).

A baixa concentração de HDL-colesterol em ratos diabéticos modula negativamente a função endotelial por não inibição da oxidação e da hiperexpressão concomitante de moléculas adesivas, o que facilita a adesão de monócitos às células endoteliais, desencadeando aterosclerose em condições diabéticas (LUPATTELLI et al., 2003; NATARAJAN; NADLER, 2003).

O tratamento com geraniol restabeleceu o metabolismo lipídico em animais diabéticos, como apresentado na Tabela 2; Figura 7. O geraniol demonstra efeito antiaterogênico, por meio da inibição da atividade da HMG-CoA redutase, diminuição do nível sérico de colesterol e aumento da concentração sérica de HDL-colesterol (HEINIG; JOHNSON, 2006). Além disso, o controle glicêmico parece ser um fator determinante para atenuar a dislipidemia.

Jayachandran; Chandrasekaran; Namasivayam (2015) verificaram que o geraniol reduziu a concentração de colesterol total, triacilgliceróis e ácidos graxos livres séricos em roedores submetidos à dieta aterogênica. Tal efeito sobre a dislipidemia foi atribuído à atividade aumentada da lipase lipoproteica e pelo aumento da concentração de HDL-colesterol através da atividade da lecitina colesterol acil-transferase (LCAT), além de diminuir o nível de LDL-colesterol circulante (IBRAHIM; EL-DENSHARY; ABDALLAH, 2015).

O aumento da secreção de insulina na presença desse antioxidante diminui os níveis plasmáticos de glicose e o processo de lipólise no tecido adiposo de ratos diabéticos. Por outro lado, a presença de insulina aumenta a atividade da lipase lipoproteica, que catalisa a quebra das ligações éster de triacilglicerol, aumentando a depuração do VLDL-colesterol e quilomícrons (AYYASAMY; LEELAVINOTHAN, 2016).

O nível aumentado de insulina eleva a atividade da LCAT, enzima responsável pela esterificação do colesterol extracelular, aumentando assim a eficiência do transporte reverso do colesterol pela HDL-colesterol, indicando correlação negativa com os acidentes cardiovasculares (DOKKEN, 2008; AYYASAMY; LEELAVINOTHAN, 2016).

El-Bassossy et al (2017) mostraram que o geraniol preveniu o quadro de hipercolesterolemia observado em animais diabéticos. Estudos relataram que a via de biossíntese do colesterol parece ser o principal processo inibido pelo geraniol em vários tipos celulares (POLO; CRESPO; BRAVO, 2011; CRESPO et al., 2012). Além disso, Galle et al (2015) consideraram o geraniol como agente capaz de controlar a hipercolesterolemia, característica que pode contribuir para a prevenção de doenças cardiovasculares, como cardiomiopatias diabéticas.

Neste sentido, no tecido cardíaco, há troca de combustível metabólico de glicose para exclusiva oxidação de ácidos graxos afim de gerar energia, resultando na perda de flexibilidade metabólica, bem como alterações morfológicas nos cardiomiócitos, levando ao comprometimento da estrutura e função mitocondrial, bem como da função cardíaca (LI et al., 2018; VARMA et al., 2018). O aumento de ácidos graxos, e subsequente síntese de triacilgliceróis no tecido cardíaco, causam lipotoxicidade celular e o início da disfunção cardíaca (VAN DE WEIJER; SCHRAUWEN-HINDERLING; SCHRAUWEN, 2011).

Uma das principais características da cardiomiopatia diabética é o remodelamento cardíaco, que envolve aumento da destruição de proteínas do músculo cardíaco, podendo afetar a função contrátil e diminuir o conteúdo da proteína miofibrilar (SEVERSON, 2004; HU et al., 2008).

HU et al (2008) sugeriram que a diminuição da atividade contrátil cardíaca, em condições diabéticas, é devido à degradação de proteína muscular cardíaca, associada ao menor peso do coração de ratos diabéticos. Liu et al (2000); Singh et al (2006) relataram diminuição em torno de 25% no peso do coração em camundongos diabéticos induzidos por STZ, em comparação aos valores de camundongos normais.

Os processos fisiopatológicos no coração diabético são complexos e envolvem diversos mecanismos, incluindo inflamação mediada por hiperglicemia crônica, estresse oxidativo, desacoplamento mitocondrial, superprodução de EROs e de ERN, desencadeado por alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (FUENTES-ANTRAIS et al., 2015; GHOSH et al., 2015).

Sabe-se que a DM não controlada está associada ao catabolismo oxidativo de proteínas, com aumento de leucina, isoleucina, valina e aminoácidos aromáticos no plasma sanguíneo (BAIN et al., 2009). A insulina é um importante regulador do metabolismo de proteínas no músculo esquelético e cardíaco e a sua deficiência desencadeia a degradação proteica. Além disso, a insulina estimula a síntese protéica, exerce efeito antiapoptótico sobre os cardiomiócitos e também pode aumentar a contratilidade cardíaca (AIKAWA et al., 2000).

Em ratos diabéticos observou-se redução na concentração de glicogênio no tecido cardíaco em relação aos demais grupos (Tabela 3; Figura 8B). O glicogênio é a forma de armazenamento da glicose, e a insulina promove sua síntese por estimular a glicogênio sintase e inibir a glicogênio fosforilase (MURALI; SARAVANAN, 2012). A regulação da síntese hepática de glicogênio e a quebra do mesmo são essenciais para a homeostase glicêmica (PEDERSON et al., 2005).

O conteúdo de glicogênio em cardiomiócitos pode ser regulado por fatores diferentes da insulina. O GLUT 4, abundante transportador de glicose no coração, apresenta a proteína quinase ativada (AMPK) e aumento da transcrição de GLUT4 em resposta ao trabalho de contração o qual auxilia o transporte de glicose (ZHENG et al., 2001). O aumento no conteúdo de glicogênio cardíaco e diminuição da glicemia dos ratos diabéticos tratados com geraniol (Tabela 3; Figura 8B), podem estar associados à melhora no processo de glicogênese promovido pelo tratamento e consequentemente diminuição da glicemia, parâmetro já reportado anteriormente (Tabela 2; Figura 7A).

Os ratos diabéticos (grupo DM) apresentaram aumento de triacilgliceróis no tecido cardíaco (Tabela 3; Figura 8C). Estudos mostraram que a concentração de triacilgliceróis em miocárdio foi significativamente aumentada no estado diabético (SHARMA et al., 2004; DEWALD et al., 2005; NIU; EVANS, 2009). Em geral, o coração não armazena quantidade significativa de lipídios, mas ocorre acúmulo ectópico de triacilgliceróis sempre que há o suprimento excessivo de ácidos graxos.

A atividade de enzimas chaves pode prever quais vias metabólicas estão sendo utilizadas para produção de energia (DINIZ et al., 2004). Nossos resultados indicam a utilização de substrato alterado no tecido cardíaco do grupo DM. A

preferência pela oxidação de ácidos graxos, em detrimento à oxidação da glicose, pode ser confirmada pela menor atividade da fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato desidrogenase (PiDH) e maior atividade da citrato sintase (CS) e β -hidroxiacil CoA desidrogenase (OHADH) (Tabela 4; Figura 9).

A PFK apresentou menor atividade no grupo DM (Tabela 4; Figura 9A). Essa alteração indica diminuição da glicólise no estado diabético, mesmo com menos glicogênio nesses animais, provavelmente, devido à reduzida síntese deste polissacarídeo pelo tecido cardíaco (NISHIZAWA; BORNFELDT, 2012; BRAGA et al., 2016).

A PFK catalisa a conversão irreversível da frutose-6-fosfato em frutose-1-6-bisfosfato durante a glicólise, sendo assim uma enzima importante para avaliar a velocidade desta via metabólica (AL-HASAWI; ALKANDARI; LUQMANI, 2014). A sua diminuição também sugere o aumento da peroxidação lipídica, contribuindo para aumento da produção de EROs, danificando macromoléculas e comprometendo o sistema de defesa antioxidante.

A menor atividade da PiDH em animais diabéticos (grupo DM) observada em nossos resultados (Tabela 4; Figura 9B), sugere que a oxidação excessiva de ácidos graxos exerce impacto negativo sobre a oxidação da glicose no tecido cardíaco destes animais, pois a PiDH catalisa a descarboxilação oxidativa do piruvato, e a menor atividade da enzima suprime a oxidação da glicose. Além disso, a alta concentração de lipídios no plasma, consequentemente alta oxidação de ácidos graxos, levam ao aumento de acetil-CoA, o que provoca a fosforilação e a inibição da atividade da PiDH no miocárdio (WU; PETERS; HARRIS, 2001). Tais anormalidades metabólicas no tecido cardíaco, sob condições diabéticas, contribuem para a patogênese da cardiomiopatia diabética (OKOSHI et al., 2007).

A LDH, enzima amplamente encontrada no citosol, catalisa a redução do piruvato para lactato e é de importância fundamental em processos envolvendo o metabolismo da glicose em condições anaeróbicas (OLIVEIRA et al., 2013; BRAGA et al., 2016).

A atividade elevada da LDH é refletida quando a razão $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ se encontra diminuída, condição que favorece a conversão de piruvato a lactato no

tecido cardíaco sempre que há déficit de oxigênio molecular (KAVANAGH et al., 2004). Estudos indicam associação entre LDH aumentada em tecidos essencialmente aeróbicos com DM1, o que pode indicar prejuízos e comprometimento na β -oxidação, ciclo do al (SEKAR et al., 2005; PUNITHA et al., 2005; FERNANDES et al., 2010; ADEVA-ANDANY et al., 2014). Todavia, a atividade cardíaca da LDH não apresentou qualquer alteração entre os grupos analisados neste estudo (Tabela 4; Figura 9C), e estão de acordo com Santos et al (2014), que observaram ausência de glicólise anaeróbica em animais diabéticos.

O aumento da atividade da CS e OHADH, enzimas biomarcadoras das vias do ciclo do ácido cítrico e da β -oxidação, respectivamente, referem-se ao aumento da lipólise, proporcionando maior fluxo de ácidos graxos para o tecido cardíaco, onde são β -oxidados a acetil-CoA, que é oxidada no ciclo do ácido cítrico.

Estudos realizados por Lopaschuk et al (2010) mostraram que a alta taxa da β -oxidação observada na DM1, eleva a produção de acetil-CoA, a qual causa *feedback* negativo sobre a atividade da PiDH que representa o ponto de entrada do piruvato para ser oxidado aerobicamente, e isto acarreta baixa oxidação da glicose. Além disso, o conteúdo elevado de citrato, ainda, faz com que a PFK também seja inibida, reduzindo ainda mais a entrada da glicose na célula muscular.

A melhora no metabolismo energético cardíaco em condições diabéticas pode ser um meio de prevenir, controlar ou atenuar a disfunção cardíaca (LOPASCHUK; FOLMES; STANLEY, 2007). No presente estudo, a administração de geraniol em animais diabéticos, demonstrou efeitos positivos ao normalizar a atividade da PFK, PiDH, CS e β -OHADH, sugerindo que geraniol promoveu maior captação e utilização da glicose e restabeleceu o metabolismo de lipídios, provavelmente por controlar a lipólise (Tabela 4; Figura 9).

Babukumar et al (2017) demonstraram aumento de outras enzimas glicolíticas, como a hexoquinase hepática e glicose-6-fosfato desidrogenase no fígado e rins, decorrentes da DM. Após tratamento com geraniol, enzimas gliconeogênicas, a glicose-6-fosfatase no fígado e rins, apresentaram diminuição, o que resultou numa reversão significativa na atividade destas enzimas, aumentando assim a utilização/oxidação da glicose e, conseqüentemente, o controle glicêmico.

Sabe-se que o coração é essencialmente aeróbico, então todas as moléculas de acetil-CoA são oxidadas no ciclo do ácido cítrico e os equivalentes redutores NADH e FADH, os quais se reoxidam liberando elétrons no complexo enzimático I (NADH-desidrogenase) e no complexo enzimático II (succinato desidrogenase), respectivamente, inseridos na membrana mitocondrial interna, aumentando o fluxo de elétrons na cadeia respiratória (VOET; VOET; PRATT, 2008; SMITH et al., 2012).

O estudo da atividade dos complexos enzimáticos respiratórios tais como, NADH-desidrogenase (NADH-DH), succinato desidrogenase (SUC-DH) e ATP sintase, inseridos na membrana mitocondrial interna, complementa o conhecimento sobre o metabolismo energético no tecido cardíaco. Ratos diabéticos no presente trabalho, apresentaram diminuição na atividade da NADH-DH, SUC-DH e ATP sintase, indicando comprometimento no fluxo de elétrons e consequentemente prejuízos na geração de ATP no tecido cardíaco (Tabela 5; Figura 10).

Em modelos experimentais, a β -oxidação excessiva aumenta o metabolismo energético e amplia a possibilidade de ocorrer estresse oxidativo (SATAPATI et al., 2015). Estudos confirmaram que excesso de elétrons na cadeia respiratória eleva o escape de elétrons, os quais são reduzidos parcialmente pelo oxigênio molecular, provocando desacoplamento da fosforilação oxidativa e desequilíbrio no sistema *redox* celular com aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (FORBES; COUGHLAN; COOPER, 2008; ROMESTAING et al., 2008; MORRIS et al., 2011).

Em adição, a quantidade excessiva de O_2 intramitocondrial é capaz de iniciar uma série de reações prejudiciais através da produção de H_2O_2 , OH e ONOO, que podem danificar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Várias enzimas funcionais como as mitocôndrias, são particularmente suscetíveis a danos mediados por ROS, levando à alteração da síntese de ATP, desregulação celular de cálcio e indução da transição da permeabilidade mitocondrial, que predispõem às células à necrose ou apoptose (FORBES; COUGHLAN; COOPER, 2008).

A diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, NADH-DH e da SUC-DH no tecido cardíaco de animais do grupo

DM, provavelmente ocorreram por dano oxidativo direto sobre os complexos mitocondriais (Tabela 5; Figuras 10A; 10B). As mitocôndrias podem ser o alvo primário dos danos oxidativos quando a produção de EROs excede a capacidade do sistema endógeno de eliminá-las (DOUGHAN; HARRISON; DIKALOV, 2008). O ânion superóxido (O_2^-) pode facilmente prejudicar esses complexos porque incluem o centro ferro-enxofre (IDE et al., 1999). Além disso, o dano oxidativo ao DNA mitocondrial também pode resultar na diminuição das atividades dos complexos da cadeia respiratória e afetar a biogênese mitocondrial (IDE et al., 2001; TSUTSUI et al., 2011).

A síntese do ATP desempenha papel fundamental não apenas na manutenção do estado de energia celular, mas também na determinação da função respiratória mitocondrial. A contração e o relaxamento cardíaco são processos que exigem energia e dependem da função mitocondrial, da produção e reserva eficiente de ATP (SINATRA, 2009). A baixa atividade da ATP-sintase nos animais diabéticos sugere que a produção de ATP foi prejudicada no DM tipo 1 (Tabela 5; Figura 10C).

Além das alterações metabólicas, o estresse oxidativo e a via *redox* são importantes contribuintes para a remodelação cardíaca (JEMAI; SAYADI, 2015; YAN et al., 2017). Vários estudos têm relatado aumento do estresse oxidativo no coração de ratos diabéticos (ARAGNO et al., 2008; WANG et al., 2011). O estado de hiperglicemia, induz ao aumento na produção de radicais livres e à glicação não enzimática de proteínas, aumentando os níveis de marcadores de estresse oxidativo (HAMDEN et al., 2009).

As características da doença cardíaca diabética têm sido bem identificadas, embora a patogênese e, em particular, os mecanismos subjacentes ao remodelamento miocárdico não foram completamente elucidados. A produção excessiva de EROs, resultando em estresse oxidativo, é amplamente considerada uma causa de dano a órgãos-alvo, como o coração (NISHIKAWA, 2000). De forma que, o estresse oxidativo pode contribuir para o desenvolvimento de disfunção cardíaca e do músculo esquelético no diabetes (TSUTSUI et al., 2011).

O estresse oxidativo está envolvido na hipertrofia e apoptose dos miócitos cardíacos. O aumento de EROs causado pela inibição parcial da SOD resulta em hipertrofia e apoptose em miócitos cardíacos isolados os quais são pensados para contribuir para o dano miocárdico diabético (SIWIK et al., 1999). Especificamente, a incidência de apoptose está aumentada no coração diabético, o que pode causar perda de miócitos, hipertrofia compensatória dos miócitos residuais e infibroses intersticiais (CAI et al., 2002; FIORDALISO et al., 2004). A necrose miocitária também pode estar envolvida no aumento da fibrose do coração diabético (TSUTSUI et al., 2011).

Estudos realizados El-Bassossy et al (2017) demonstraram que ratos diabéticos induzidos por STZ e tratados com geraniol, tiveram a disfunção cardíaca sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo neutralizadas, promoveu alívio do prolongamento da repolarização cardíaca, diminuição do estresse oxidativo, controle da hiperglicemia e hipercolesterolemia.

Embora o geraniol não tenha alterado a atividade da SUC-DH, normalizou a atividade tanto da NADH-DH como da ATP sintase em animais do grupo (DM-GE) (Tabela5; Figura 10). Assim, pode-se inferir que o geraniol controlou o transporte de elétrons na cadeia respiratória, garantindo a produção de ATP pelos cardiomiócitos. O complexo respiratório NADH-DH apresenta alto grau de controle do fluxo de elétrons, sendo assim considerado componente limitante da fosforilação oxidativa, assegurando a produção de ATP pela atividade da ATP sintase (THOMASZ et al., 2018).

O estresse oxidativo pode ser avaliado por meio de atividade de enzimas envolvidas no balanço *redox* da célula, que incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GSH-Px) e glutatona redutase (GR), as quais convertem radicais superóxido em peróxidos ou peróxidos em água e oxigênio. A conversão de peróxido de hidrogênio pela GSH-Px ocorre concomitante com a oxidação da glutatona reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG). A condição diabética pode alterar a atividade dessas enzimas em vários tecidos (RAUSCHER; SANDERS; WATKINS, 2000).

Compostos que podem ser modificados pela ação de radicais livres, como lipídios, proteínas e grupos sulfidrilas, são também usados como medidas indiretas e biomarcadores do estresse oxidativo (SILVA et al., 2011). Sob condições diabéticas, sabe-se que nível elevado de EROs/ERN e defesa antioxidante comprometida resulta em aumento da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos no DNA (OBROSOVA, 2009; NEGI et al., 2011).

Os lipídios celulares são alguns dos vários alvos dos radicais livres formados durante o estresse oxidativo (CONKLIN, 2004). Os lipídios desempenham importante papel nos vários componentes celulares, o que justifica a necessidade da compreensão dos mecanismos e consequências da peroxidação lipídica nos sistemas biológicos (KELLY et al., 1998).

A peroxidação lipídica é um evento citotóxico importante porque envolve a remoção de hidrogênio de cadeias de ácidos graxos mediadas por EROs, desta forma pode levar a morte de células e danos teciduais (ABUJA; ALBERTINI, 2001; FAINE et al, 2006). O hidroperóxido de lipídios (HP) é formado na fase de propagação da lipoperoxidação, quando ocorre oxidação dos lipídios. Os ácidos graxos insaturados são vulneráveis a ação das EROs, devido a maior exposição dos átomos de hidrogênio (AHMED, 2005; JENEY et al., 2005).

Sabe-se que a peroxidação lipídica fornece um suprimento contínuo de radicais livres que desempenham um papel importante na etiopatogenia da DM e suas complicações (GRIESMACHER et al., 1995). Johansen et al (2005) descreveram, em paciente diabéticos susceptíveis ao estresse oxidativo, a associação entre o controle inadequado da glicemia, peroxidação lipídica mediada pelas EROs e elevados níveis de hidroperóxido de lipídio. Ozcelik et al (2011) também observaram peroxidação lipídica na diabetes clínico e experimental.

Likidilid et al (2007) relataram que pacientes diabéticos susceptíveis ao estresse oxidativo apresentaram associação entre hiperglicemia e peroxidação mediada pelas EROs. O aumento na geração de EROs pode provocar remodelação cardíaca por dano celular, o qual contribui com alterações morfológicas e funcionais que estiveram associadas à cardiomiopatia diabética (PATEL; GOYAL, 2011).

O aumento da peroxidação lipídica apresenta relação estreita com os altos níveis glicêmicos e estresse oxidativo na DM (BANDEIRA et al., 2013; SALGUEIRO et al., 2013). Estudo clínico realizado por Bandeira et al (2012) a fim de caracterizar o estresse oxidativo sanguíneo em pacientes diabéticos relatou peroxidação lipídica significativamente maior, quantificados pelos níveis de glicemia de jejum e HbA1c.

Os animais diabéticos demonstraram aumento na concentração de HP (Tabela 6; Figura 11C), estes resultados podem estar relacionados com o estabelecimento do estresse oxidativo na diabetes experimental. O estresse oxidativo e lipoperoxidação com elevação no HP pode afetar a função miocárdica de maneira similar ao dano induzido pela isquemia e subsequente reperfusão, incluindo perda celular de K^+ , depleção de ATP e diminuição da função metabólica (MALLET et al., 2005).

As proteínas também são alvo potencial de EROs, cuja estrutura e função podem ser afetadas pela oxidação da cadeia lateral, principalmente de cisteína, metionina e tirosina. As carbonilas são o produto de oxidação das proteínas e relatadas como potente biomarcador do estresse oxidativo (CHEVION; BERENSHTEIN; STADTMAN, 2000; BEAL, 2002).

A carbonilação da proteína ocorre nos estágios iniciais e permanece na circulação por um período mais longo, quando comparado com outros parâmetros do estresse oxidativo, tais como a, glutathiona oxidada e malondialdeído (SAGARE et al., 2012). A formação da proteína carbonila (PC) é o resultado da oxidação provocada pelas EROs sobre especificamente a região carboximetil e carboxietil dos resíduos de lisina. A carboxilação é um processo irreversível que leva à modificação estrutural das proteínas, mediada pelo estresse oxidativo, e consequentemente, a perda da função e da atividade biológica da proteína, ocasionando uma série de efeitos deletérios sobre a função celular e de órgãos (BARAIBAR et al., 2011).

Animais diabéticos não tratados mostraram os maiores valores para proteína carbonila (Tabela 6; Figura 11D). O acúmulo de PC também foi observado por Dennis et al (2013) em mitocôndrias do tecido cardíaco após infarto do miocárdio

associado ao DM tipo 1. A presença de proteínas modificadas indica danos estruturais provocados pelas EROs e estresse oxidativo. Neste sentido, o ataque das proteínas pelas EROs pode ser um dos primeiros eventos que configurem as complicações diabéticas (HERNÁNDEZ-MARCO et al., 2009).

Nossos resultados mostraram a diminuição tanto da concentração de HP como de PC no tecido cardíaco dos animais diabéticos tratados com geraniol (DM-GE) (Tabela 6; Figuras 11C; 11D). Uma vez que a fosforilação oxidativa associada ao transporte de elétrons constitui importante fonte de EROs, os quais podem induzir a lipoperoxidação, a melhora na produção de HP pode ser devido ao maior controle na oxidação de ácidos graxos e, portanto, menor probabilidade de produzir EROs na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons (NITA; GRZYBOWSKI, 2016).

Estudo revelou que ratos diabéticos suplementados com geraniol exibiram baixos níveis de marcadores oxidativos com atividades aumentadas concomitantes na atividade dos complexos respiratórios I, II e III; esses dados destacam a propensão do geraniol em modular os marcadores de estresse oxidativo, função mitocondrial e neurotransmissão sob condições de DM (PRASAD; MURALIDHARA, 2014).

Para a remoção das EROs, as células dependem de sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos, representados pela SOD, CAT, GSH-Px e GSH (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004; FORBES; COOPER, 2013). Segundo Sarkhail et al (2007), a atividade das enzimas antioxidantes tem mostrado importante papel na manutenção dos níveis fisiológicos das EROs.

A capacidade do sistema antioxidante endógeno é a principal medida e marcador para avaliar o estado e o potencial do estresse oxidativo. A prevalência de estresse oxidativo é relatada em todos os processos onde o potencial antioxidante é falho e/ou esgotado, acarretando envelhecimento, hipertensão e diabetes mellitus (RIZVI; MAURYA, 2007; SCHIFFRIN, 2010).

Estudos realizado por Korkmaz et al (2013) em pacientes diabéticos, ao investigarem os níveis de marcadores de estresse oxidativo, relataram diminuição do potencial antioxidante. E acrescentaram que o aumento nas concentrações de

glicose pode levar a danos oxidativos nos tecidos com o aumento do estresse oxidativo.

A concentração de glutathiona total (GS total) e reduzida (GSH) não apresentou qualquer alteração no tecido cardíaco (Tabela 6 e Figuras 11A; 11B); os dados apontam para diminuição no nível deste antioxidante na DM.

Sob o estado diabético, a GSH se encontra diminuída, o que leva à baixa atividade de GSH-Px, prejudicando a capacidade antioxidante da célula em neutralizar as EROs e, assim, estabelecendo o estresse oxidativo (JURKOVIC; OSREDKAR; MARC, 2008). Esta depleção ocorre durante a estimulação da via do poliol, que é um dos mecanismos pelos quais a hiperglicemia pode levar ao estresse oxidativo - a glicose excessiva ativa aldose redutase, que converte a glicose em sorbitol e oxida o NADPH (ANTONY; VIJAYAN, 2015). Uma vez que a GR requer NADPH como coenzima para reduzir a forma oxidada de glutathiona, a concentração de GSH, substrato da atividade da GSH-Px, ficará com a atividade comprometida com alterações na homeostase redox celular (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; SUZUKI, 2009; ROSA et al., 2018).

GSH, antioxidante natural eficiente, presente em quase todos os tipos celulares é considerado um bom biomarcador do desequilíbrio *redox* (CHAKRAVARTY; RIZVI, 2011). Existem vários estudos que relatam a associação baixa concentração de GSH e danos oxidativos a estrutura do DNA em condições diabéticas (DINÇER et al., 2002; RAHIGUDE et al., 2012; CALABRESE et al., 2012).

Ahmad et al (2011), observaram a eficácia do geraniol em restaurar os níveis de GSH e aumentar as atividades de enzimas antioxidantes no tecido renal de ratos diabéticos. Prasad; Muralidhara (2014) relataram que o aumento dos níveis de GSH induzido por GE pode ser amplamente responsável pela manutenção do equilíbrio *redox* no tecido nervoso central e periférico, em modelo diabético.

No presente estudo, a atividade da SOD e GSH-Px diminuíram significativamente nos animais diabéticos (DM) (Tabela 6; Figuras 11E; 11F).

A SOD é uma enzima ubíqua, contida em todos tecidos aeróbicos, necessitando do íon ferro para sua atividade na matriz extracelular, do cobre e zinco

no citoplasma, e do manganês nas mitocôndrias (IGNATOWICZ; RYBCZYNSKA, 1994). Esta enzima é considerada a primeira linha de defesa contra a ação das EROS, catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual é reduzido a água pela catalase e GSH-Px (TSUTSUI et al, 2011).

Em mamíferos, existe em três isoformas principais, caracterizadas pelos metais e pela sua função na dismutação do ânion superóxido. As três isoformas incluem SOD1 (Cu-Zn-SOD citosólico), SOD2 (Mn-SOD mitocondrial) e SOD3 extracelular (EC-SOD), as quais catalisam a mesma reação, mas em localização subcelular distinta (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011; TIWARI et al., 2013).

A diminuição da concentração de SOD nos tecidos de indivíduos diabéticos tem sido relatada em vários estudos (HE et al., 2011; SHUKLA et al., 2012). Kim (2013) concluiu que a SOD extracelular está relacionada ao estado metabólico alterado na DM, aumentando a produção de EROs. Lucchesi et al (2013) ao observarem o balanço oxidativo de ratos diabéticos relatou diminuição da atividade de SOD e outras enzimas antioxidantes no tecido hepático.

A atividade da SOD diminuiu no tecido cardíaco dos animais do grupo DM (Tabela 6; Figura 11E). A sua diminuição associada à hiperglicemia, pode ser referente ao processo de glicação da enzima, podendo alterar a estrutura e a catálise enzimática, exacerbando deste modo o estresse oxidativo (MAJITHIYA; BALARAMAN, 2005).

A administração de geraniol em animais diabéticos (DM-GE) aumentou a atividade da SOD (Tabela 6; Figura 11 E). Este resultado é respaldado na literatura, uma vez que a diminuição do estresse oxidativo evitou a apoptose em neurônios, como relatado por Craven et al (2001); Sugawara et al (2002), que salientaram a importância da SOD na regulação da apoptose.

Pavan et al (2018) ao administrarem geraniol em camundongos observaram o aumento nas atividades enzimáticas hepáticas tanto da CAT como da SOD, mostrando sua capacidade antioxidante, sem sinais de hepatotoxicidade.

Diabetes mellitus induz alterações na atividade das enzimas GSH-Px, a qual se encontra em células que metabolizam o peróxido de água e convertem o dissulfeto de glutathione em glutathione (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003).

A diminuição na sua atividade tornar as células propensas ao estresse oxidativo e, consequentemente, à lesão celular (ASMAT; ABAD, ISMAIL, 2016).

GSH-Px, que possui grande afinidade pelo H_2O_2 , está presente em quantidades relativamente elevadas nos miócitos, especialmente nos compartimentos citosólico e mitocondrial, evidenciando a sua importância no sistema antioxidante do coração (LE et al., 1993). Toussaint; Houbion; Remacle (1993), concluíram que a GSH-Px exerça maiores efeitos protetores contra os danos oxidativos em relação a SOD, pois maior dismutação do O_2^- pela SOD pode resultar em aumento de H_2O_2 . Portanto, comparado com SOD ou CAT, acredita-se que GSH-Px seja mais efetiva na proteção celular contra o estresse oxidativo.

GSH-Px apresentou-se diminuída no grupo DM (Tabela 6; Figura 11F). Estes resultados são respaldados por Klepac; Rudes; Klepac (2006) ao observarem diminuição na atividade da GSH-Px e possível falha no sistema endógeno, tornando assim insuficiente para compensar a produção excessiva de EROs. El-Far et al (2005) estudando a GSH-Px em pacientes diabéticos verificaram que a sua atividade é relativamente estável e pode ser inativada somente sob condições de estresse oxidativo severo.

Desde que o estresse oxidativo esteja presente na patogênese da DM e na cardiomiopatia diabética, há um interesse crescente no uso de antioxidantes como uma abordagem terapêutica complementar para prevenir e/ou tratar essas condições. Numerosos estudos demonstraram que a melhora do estresse oxidativo através do tratamento com antioxidantes pode ser uma estratégia eficaz para reduzir a cardiomiopatia diabética (HAIDARA et al., 2006; KAIN; KUMAR; SITASAWAD, 2011).

Atualmente, apesar dos grandes avanços no tratamento da diabetes mellitus, estudos com produtos naturais com efeitos antioxidantes devem ser intensificados por serem favoráveis no controle de efeitos colaterais. Entre as plantas que contêm antioxidantes naturais, o gengibre, rico em geraniol exibiu propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (NILE; PARK, 2015). O 6-gingerol, também presente no gengibre, possui efeitos antiangiogênico, anti-inflamatório e

antihiperглиcêmico (KIM et al., 2005; DUGASANI et al., 2010; CHAKRABORTY et al., 2012).

Prasad; Muralidhara (2014) também revelaram que o geraniol pode ter um potencial promissor terapêutico, pois atua diminuindo os níveis dos biomarcadores oxidativos na neuropatia diabética em humanos. Wang et al (2016), demonstrou o efeito antioxidante e, portanto, neuroprotetor do geraniol contra lesão traumática da medula espinhal.

Muthukumaran et al (2014) demonstram que o geraniol atenua o estresse oxidativo e mantém o *status* antioxidante enzimático. Neste contexto, Farhath et al (2013) também relataram que o geraniol é um forte antioxidante que pode eliminar/neutralizar as EROs.

Conclusão

Conclui-se que a Diabetes mellitus tipo 1 induzida por estreptozotocina promoveu hiperglicemia, alterações nos parâmetros nutricionais, alterações no metabolismo energético do coração, favorecendo a oxidação de ácidos graxos em detrimento a oxidação da glicose, dislipidemia e aumento do estresse oxidativo no tecido cardíaco. A suplementação de geraniol reduziu os efeitos prejudiciais observados na condição diabética, através do seu efeito antidiabetogênico e antioxidante. O uso de geraniol aumentou as atividades de SOD e GSH-Px sob condições diabéticas (grupo DM-GE), sugerindo o seu efeito protetor no tecido cardíaco. A diminuição das concentrações de HP e PC acompanhou o aumento concomitante das atividades dessas enzimas, que modula o estresse oxidativo. Com isso, o tratamento com geraniol atenuou o estresse oxidativo no coração mediado por lipoperoxidação nos ratos diabéticos e aumento a atividade das enzimas antioxidantes.

Referências Bibliográficas

ABUJA, P.M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clin Chim Acta**, v. 306, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

ADEVA-ANDANY, M.; LÓPEZ-OJÉN, M.; FUNCASTA-CALDERÓN, R.; AMENEIROS-RODRÍGUEZ, E.; DONAPETRY-GARCÍA, C.; VILA-ALTESOR, M.; RODRÍGUEZ-SEIJAS, J. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. **Mitochondrion**, v. 17, p. 76-100, 2014.

AHMAD, S.T.; ARJUMAND, W.; SETH, A.; NAFEEES, S.; RASHID, S.; ALI, N.; SULTANA, S. Preclinical renal cancer chemopreventive efficacy of geraniol by modulation of multiple molecular pathway. **Toxicology**, v. 290, n. 1, p. 69-81, 2011.

AHMED, N. Advanced glycation end products-role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.

AIKAWA, R.; NAWANO, M.; GU, Y.; KATAGIRI, H.; ASANO, T.; ZHU, W.; NAGAI, R.; KOMURO, I. Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. **Circulation**, v. 102, n. 23, p. 2873-2879, 2000.

AKULA, A.; KOTA, M.K.; GOPISETTY, S.G.; CHITRAPU, R.V.; KALAGARA, M.; KALAGARA, S.; VEERAVALLI, K.K.; GOMEDHIKAM, J.P. Biochemical histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. **Pharmacol Res**, v. 48, p. 429-435, 2003.

AL-HASAWI, N.; ALKANDARI, M.F.; LUQMANI, Y.A. Phosphofructokinase: a mediator of glycolytic flux in cancer progression. **Crit Ver Oncol Hematol**, v. 92, n. 3, p. 312-321, 2014.

ALMEIDA, D.A.R.; BRAGA, C.P.; NOVELLI, E.L.B.; FERNADES, A.A.H. Evaluation of lipid profile and oxidative stress in STZ-induced rats treated with antioxidant vitamin. **Braz Arch Biol Technol**, v. 55, n. 4, p. 527-536, 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2018. **Diabetes Care**, v. 41, Suppl 1, p. 13-27, 2018.

ANTONY, P.; VIJAYAN, R. Identification of novel aldose reductase inhibitors from spices: a molecular docking and simulations study. **Plos One**, v. 10, n. 9, p. 138186-138205, 2015.

ARAGNO, M.; MASTROCOLA, R.; ALLOATTI, G.; VERCELLINATO, I.; BARDINI, P.; GEUNA, S.; CATALANO, M.G.; DANNI, O.; BOCCUZZI, G. Oxidative stress triggers cardiac fibrosis in the heart of diabetic rats. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 380–388, 2008.

ASHCROFT, F.M.; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the β Cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160-1171, 2012.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. **Saudi Pharm J**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.

AYYASAMY, R.; LEELAVINOTHAN, P. Myrtenal alleviates hyperglycaemia, hyperlipidaemia and improves pancreatic insulin level in STZ-induced diabetic rats. **Pharm Biol**, v. 54, n. 11, p. 2521-2527, 2016.

BABUKUMAR, S.; VINOTHKUMAR, V.; SANKARANARAYANAN, C.; SRINIVASAN, S. Geraniol, a natural monoterpene, ameliorates hyperglycemia by attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharm Biol**, v. 55, n. 1, p. 1442-1449, 2017.

BADYAL, D.K.; DESAI, C. Animal use in pharmacology education and research: the changing scenario. **Indian J Pharmacol**, v. 46, n. 3, p. 257-265, 2014.

BANDEIRA, S.M.; GUEDES, G.S.; FONSECA, L.J.; PIRES, A.S.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C.; RABELO, L.A.; VASCONCELOS, S.M.; GOULART, M.O. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. **Oxid Med Cell Longev**, v, 2012, p. 819310, 2012.

BANDEIRA, S.M.; FONSECA, L.J.S.; GUEDES, G.S.; RABELO, L.A.; GOULART, M.O.F.; VASCONCELOS, S.M.L. Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 2, p. 3265–3284, 2013.

BARAIBAR, M.A.; HYZEWICZ, J.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; LADOUCE, R.; ROEPSTORFF, P.; MOULY, V.; FRIGUET, B. Oxidative stress-induced proteome alterations target different cellular pathways in human myoblasts. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 8, p. 1522-1532, 2011.

BASS, A.; BRDICZKA, D.; EYER, P.; HOFER, S.; PETTE, D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. **Eur J Biochem**, v. 10, n. 2, p. 198-206, 1969.

BEAL, M.F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radic Biol Med**, v. 32, n. 9, p. 979-803, 2002.

BENNETT, L.L.; SEEFELDT, T. The role of antioxidants on oxidative stress in diabetes mellitus. **J Pharm Technol**, v. 26, n. 5, p. 293-299, 2010.

BHARTI, S.K.; KRISHNAN, S.; KUMAR, A.; RAJAK, K.K; MURARI, K.; BHARTI, B.K.; GUPTA, A.K. Antidiabetic activity and molecular docking PF fructooligosaccharides produced by *Aureobasidium pullulans* in poloxamer-407 – induced T2DM rats. **Food Chem**, v. 136, n. 2, p. 813-821, 2013.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, v. 26, p. 267-276, 1996.

BISWAS, B.; DAS, B.; JANA, K.; GHOSH, D. Evaluation of antidiabetic and antioxidative efficacy of ethyl acetate fraction of methanolic extract of *Camellia sinensis* (green tea) leaves in streptozotocin induced diabetic albino rat. **Int J Phytomedicine**, v. 9, n. 2, p. 305-314, 2017.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. **Treat Endocrinol**, v. 3, n. 1, p. 41-52, 2004.

BRAGA, C.P.; BOONE, C.H.T.; GROVE, R.A.; ADAMCOVA, D.; FERNANDES, A.A.H.; ADAMEC, J.; PADILHA, P.M. Liver proteome in diabetes type 1 rat model: insulin-dependent and independent changes. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 20, n. 12, p. 711-726, 2016.

BRAY, T.M. Dietary antioxidants and assessment of oxidative stress. **Nutrition**, v. 16, n. 7-8, p. 578-581, 2000.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813–820, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–1625, 2005.

BUTLER, A.E.; JANSON, J.; BONNER-WEIR, S.; RITZEL, R.; RIZZA, R.A.; BUTLER, P.C. β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 102-110, 2003.

CALABRESE, V.; CORNELIUS, C.; LESO, V.; TROVATO-SALINARO, A.; VENTIMIGLIA, B.; CAVALLARO, M.; SCUTO, M.; RIZZA, S.; ZANOLI, L.; NERI, S.; CASTELLINO, P. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 5, p. 729-736, 2012.

CARNESECCHI, S.; BRAS-GONÇALVES, R.; BRADAIA, A.; ZEISEL, M.; GOSSÉ, F.; POUPON, M.F.; RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. **Cancer Lett**, v. 215, n. 1, p. 53-59, 2004.

CARVALHO, C.C.C.R.; FONSECA, M.M.R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnol Adv**, v. 24, n. 2, p. 134-142, 2006.

CASSANI, L.; TOMADONI, B.; VIACAVA, G.; PONCE, A.; MOREIRA, M.R. Enhancing quality attributes of fiber-enriched strawberry juice by application of vanillin or geraniol. **LWT - Food Sci Technol**, v. 72, p.90-98, 2016.

CHAKRAVARTY, S.; RIZVI, S.I. Day and night GSH and MDA levels in healthy adults and effects of different doses of melatonin on these parameters. **Int J Cell Biol**, v. 2011, p. 404591-404596, 2011.

CHAWLA. A.; CHAWLA, R.; JAGGI, S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: distinct or continuum? **Indian J Endocrinol Metab**, v. 20, n. 4, p. 546-551, 2016.

CHEN, W.; VILJOEN, A.M. Geraniol – A review of a commercially important fragrance material. **S Afr J Bot**, v. 76, n. 4, p. 643-651, 2010.

CHEVION, M.; BERENSHETEIN, E.; STADTMAN, E.R. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. **Free Radic Res**, v. 33, p. 99-108, 2000.

CHO, W.C.; CHUNG, W.S.; LEE, S.K.; LEUNG, A.W.; CHENG, C.H.; YUE, K.K. Ginenoside Re of Panax ginseng possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur J Pharmacol**, v. 550, n. 1-3, p. 173-179, 2006.

CODINACH, H.P.; FREIXA, P.R. Diabetic cardiomyopathy: concept, heart function, and pathogenesis. **An Med Interna**, v. 19, n. 6, p. 313-320, 2002.

COHN, R.M.; ROTH, K.S. **Lipid and lipoprotein metabolism**. Biochemistry and disease. Baltimore: Williams and Wilkins Publishers, p.280, 1996.

CONKLIN, K.A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integr Cancer Ther**, v. 3, n. 4, p. 294-300, 2004.

CRAVEN, P.A.; PHILLIPS, S.L.; MELHEM, M.F.; LIACHENKO, J.; DeRUBERTIS, F.R. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses increases in collagen accumulation induced by culture of mesangial cells in high-media glucose. **Metabolism**, v. 50, n. 9, p. 1043-1048, 2001.

CRESPO, R.; VILLEGAS, S.M.; ABBA, M.C.; BRAVO, M.G.; POLO, M.P. Transcriptional and posttranscriptional inhibition of HMGCR and PC biosynthesis by geraniol in 2 Hep-G2 cell proliferation linked pathways. **Biochem Cell Biol**, v. 91, n. 3, p. 131-139, 2012.

DENNIS, K.E.; HILL, S.; ROSE, K.L.; SAMPSON, U.K.; HILL, M.F. Augmented cardiac formation of oxidatively-induced carbonylated proteins accompanies the increased functional severity of post-myocardial infarction heart failure in the setting of type 1 diabetes mellitus. **Cardiovasc Pathol**, v. 22, n. 6, p. 473-480, 2013.

DESAI, V.G.; WEINDRUCH, R.; HART, R.W.; FEUERS, R.J. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. **Arch Biochem Biophys**, v. 333, n. 1, p. 145-151, 1996.

DEWALD, O.; SHARMA, S.; ADROGUE, J.; SALAZAR, R.; DUERR, G.D.; CRAPO, J.D.; ENTMAN, M.L.; TAEGTMEYER, H. Downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species and prevents lipotoxicity. **Circulation**, v. 112, n. 3, p. 407-415, 2005.

DİNÇER, Y.; AKÇAY, T.; ALADEMİR, Z.; ILKOVA, H. Assessment of DNA base oxidation and glutathione level in patients with type 2 diabetes. **Mutat Res**, v. 505, n. 1-2, p. 75-81, 2002.

DOBREVA, A.; KOVATCHEVA, N.; ASTATKIE, T.; VALTCHO, D.; ZHELJAZKOV, V.D. Improvement of essential oil yield of oil-bearing (*Rosa damascene* Mill.) due to surfactant and maceration. **Ind Crops Prod**, v. 34, n. 3, p. 257-264, 2011.

DOKKEN, B.B. The pathophysiology of cardiovascular disease and diabetes: beyond blood pressure and lipids. **Diabetes Spectrum**, v.21, n.3, p.160–165, 2008.

DOLAN, M.E. Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA reactive agents. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 26, n. 2-3, p. 105-118, 1997.

DONG, K.; XU, W.; YANG, J.; QIAO, H.; WU, L. Neuroprotective effects of tanshinone IIA on permanent focal cerebral ischemia in mice. **Phytother Res**, v. 23, n. 5, p. 608-613, 2009.

DOUGHAN, A.K.; HARRISON, D.G.; DIKALOV, S.I. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. **Circ Res**, v. 102, n. 4, p. 488-496, 2008.

DUDAREVA, N.; ANDERSSON, S.; ORLOVA, I.; GATTO, N.; REICHELT, M.; RHODES, N.; BOLAND, W.; GERSHENZON, J. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. **Proc Natl Acad Sci**, v. 102, n. 3, p. 933-938, 2005.

DUGASANI, S.; PICHKA, M.R.; NADARAJAH, V.D.; BALIJEPALLI, M.K.; TANDRA, S.; KORLAKUNTA, J.N. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. **J Ethnopharmacol**, v. 127, n. 2, p. 515-520, 2010.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Nat Prod Rep**, v. 23, n. 3, p. 394-411, 2006.

EBAID, G.M.; FAINE, L.A.; DINIZ, Y.S.; RODRIGUES, H.G.; GALHARDI, C.M.; RIBAS, B.O.; FERNANDES, A.A.; NOVELLI, E.L.B. Effects of digitonin on hyperglycaemia and dyslipidemia induced by high-sucrose intake. **Food Chem Toxicol**, v. 44, n. 2, p. 293-299, 2006.

EISELEIN, L.; SCHWARTZ, H.J.; RUTLEDGE, J.C. The challenge of type 1 diabetes mellitus. **ILAR J**, v. 45, n. 3, p. 231-236, 2004.

EL-BASSOSSY, H.M.; GHALEB, H.; ELBERRY, A.A.; BALAMASH, K.S.; GHAREIB, S.A.; AZHAR, A.; BANJAR, Z. Geraniol alleviates diabetic cardiac complications: effect on cardiac ischemia and oxidative stress. **Biomed Pharmacother**, v. 88, p. 1025-1030, 2017.

ELEAZU, C.O.; ELEAZU, K.C.; CHUKWUMA, S.; ESSIEN, U.N. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **J Diabetes Metab Disord**, v. 12, n. 60, p. 1-7, 2013.

EL-FAR, M.A.; BAKR, M.A.; FARAHAT, S.E.; ABD, E.E.A. Glutathione peroxidase activity in patients with renal disorders. **Clin Exp Nephrol**, v. 9, n. 2, p. 127-131, 2005.

EL-KABBANI, O.; RUIZ, F.; DARMANIN, C.; CHUNG, R.P. Aldose reductase structures: implications for mechanism and inhibition. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 7-8, p. 750-762, 2004.

EWING, J.F.; JANERO, D.R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generation. **Anal Biochem**, v. 232, n. 2, p. 243-248, 1995.

FAINE, L.A.; RODRIGUES, H.G.; GALHARDI, C.M.; EBAID, G.M.; DINIZ, Y.S.; PADOVANI, C.R.; NOVELLI, E.L. Effects of olive oil and its minor constituents on serum lipids, oxidative stress, and energy metabolism in cardiac muscle. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 84, n. 2, p. 239-345, 2006.

FALEIRO, M.L. **The mode of antibacterial action of essential oils**. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, v. 2, p. 1143-1156, 2011.

HATH, S.; VIJAYA, P.P.; VIMAL, M. Immunomodulatory activity of geranial, geranial acetate, gingerol, and eugenol essential oils: evidence for humoral and cell-mediated responses. **Avicenna J Phytomed**, v. 3, n. 3, p. 224-230, 2013.

FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B.; OKOSHI, K.; OKOSHI, M.P.; DI MUZIO, B.P.; GUIMARÃES, J.F.C.; JUNIOR, A.F. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. **Biomed Pharmacother**, v. 64, n. 3, p. 214-219, 2010.

FINN, P.F.; DICE, J.F. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. **Nutrition**, v. 22, n. 7-8, p. 830-844, 2006.

FIORDALISO, F.; BIANCHI, R.; STASZEWSKY, L.; CUCCOVILLO, I.; DONI, M.; LARAGIONE, T.; SALIO, M.; SAVINO, C.; MELUCCI, S.; SANTANGELO, F.; SCANZIANI, E.; MASSON, S.; GHEZZI, P.; LATINI, R. Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 5, p. 959-968, 2004.

FISCHER, J.C; RUITENBEEK, W.; BERDEN, J.A.; TRIJBELS, J.M.; VEERKAMP, J.H.; STADHOUDERS, A.M.; SENGERS, R.C.; JANSSEN, A.J. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin Chim Acta**, v. 153, n. 1, p. 23-36, 1985.

FORBES, J.M.; COUGHLAN, M.T.; COOPER, M.E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1446-1454, 2008.

FORBES, J.M.; COOPER, M.E. Mechanisms of diabetic complication. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 137-188, 2013.

FOWLER, M.J. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. **Clin Diabetes**, v. 26, n. 2, p. 77-82, 2008.

FRANCO, N.H. Animal experiments in biomedical research: a historical perspective. **Animals**, v. 3, n. 1, p. 238-273, 2013.

FUENTES-ANTRÁS, J.; PICATOSTE, B.; RAMÍREZ, E.; EGIDO, J.; TUÑÓN, J.; LORENZO, O. Targeting metabolic disturbance in the diabetic heart. **Cardiovasc Diabetol**, v. 14, n. 1, p. 17-28, 2015.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, 2011.

GALLE, M.; KLDNIEW, B.R.; CASTRO, M.A.; VILLEGAS, S.M.; LACUNZA, E.; POLO, M.; BRAVO, M.G.; CRESPO, R. Modulation by geraniol of gene expression involved in lipid metabolism leading to a reduction of serum-cholesterol and triglyceride levels. **Phytomedicine**, v. 22, n. 7, p. 696-704, 2015.

GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v. 388, p. 1459-544, 2016.

GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, S.; KAHKASHAN, R.; SIL, P.C. Curcumin protects rat liver from streptozotocin-induced diabetic pathophysiology by counteracting reactive oxygen species and inhibiting the activation of p53 and MAPKs mediated stress response pathways. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 365-376, 2015.

GILLESPIE, K.M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **CMAJ**, v. 175, n. 2, p.165-170, 2006.

GOLDBERG, I.J. Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 3, p. 965-971, 2001.

GONZÁLEZ-BURGOS, E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M.P. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 31, p. 5319-5341, 2012.

GONZÁLEZ-COLOMA, A.; LÓPEZ-BALBOA, C.L.; SANTANA, O.; REINA, M.; FRAGA, B.M. Triterpene-based plant defenses. **Phytochem Rev**, v. 10, n. 2, p. 245-260, 2011.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, Suppl 1, p. 110-118, 2004.

GRIESMACHER, A.; KINDHAUSER, M.; ANDERT, S.E.; SCHREINER, W.; TOMA, C.; KNOEBL, P.; PIETSCHMANN, P.; PRAGER, R.; SCHNACK, C.; SCHERNTHANER, G.; MUELLER, M.M. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. **Am J Med**, v. 98, p. 469-475, 1995.

GROVER, J.K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **J Ethnopharmacol**, v. 81, n. 1, p. 81-100, 2002.

GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; SHEU, S.S.; GAVIN, C.E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am J Physiol**, v. 267, p. 313-339, 1994.

GUYTON, A.C. HALL, J.E. **Textbook of Medical Physiology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2006.

HAIDARA, M.; DESOKY, A.; KHLOUSY, H.; SEBAEE, H. The mechanisms underlying the development of hypertension in STZ induced - diabetic rats. **Prog Med Res**, v. 2, p. 1-18, 2004.

HAIDARA, M.A.; YASSIN, H.Z.; RATEB, M.; AMMAR, H.; ZORKANI, M.A. Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 4, n. 3, p. 215-227, 2006.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **Am J Clin Nutr**, v. 57, n. 5, p. 715-725, 1993.

HAMDEN, K.; BOUJBIHA, M.A.; MASMOUDI, H.; AYADI, F.M.; JAMOUSSE, K.; ELFEKI, A. Combined vitamins (C and E) and insulin improve oxidative stress and pancreatic and hepatic injury in alloxan diabetic rats. **Biomed Pharmacother**, v. 63, n. 2, p. 95-99, 2009.

HAMEED, I.; MASOODI, S.R.; MIR, S.A.; NABI, M.; GHAZANFAR, K.; GANAI, B.A. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. **World J Diabetes**, v. 6, n. 4, p. 598-612, 2015.

HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 51-88, 2005.

HE, K.; LI, X.; CHEN, X.; YE, X.; HUANG, J.; JIN, Y.; PI, P.; DENG, Y.; JIN, Q.; SHI, Q.; SHU, H. Evaluation of antidiabetic potential of selected traditional Chinese medicines in STZ-induced diabetic mice. **J Ethnopharmacol**, v. 137, n. 3, p. 1135-1142, 2011.

HEINIG, M.; JOHNSON, R.J. Role of uric acid in hypertension, renal disease, and metabolic syndrome. **Cleve Clin J Med**, v. 73, n. 12, p. 1059-1064, 2006.

HERBERT, S.L.; NAIR, K.S. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. **Clin Nutr**, v. 29, n. 1, p. 13-17, 2010.

HERNÁNDEZ-MARCO, R.; CODOÑER-FRANCH, P.; PONS, M.S.; DEL-CASTILLO, V.C.; BOIX, G.L.; VALL, B.V. Oxidant/antioxidant status and hyperfiltration in young patients with type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Nephrol**, v. 24, n. 1, p. 121-127, 2009.

HOLSCHER, M.E.; BODE, C.; BUGGER, H. Diabetic cardiomyopathy: does the type of diabetes matter? **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 12, p. 1-10, 2016.

HU, J.; KLEIN, J.D.; DU, J.; WANG, X.H. Cardiac muscle protein catabolism in diabetes mellitus: activation of the ubiquitin-proteasome system by insulin deficiency. **Endocrinology**, v. 149, n. 11, p. 5384-5390, 2008.

IBRAHIM, S.M.; EL-DENSHARY, E.S.; ABDALLAH, D.M. Geraniol, alone and in combination with pioglitazone, ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats via the modulation of both inflammatory and oxidative stress status. **Plos one**, v. 10, n. 2, p. e0117516-0117533, 2015.

IDE, T.; TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; UTSUMI, H.; KANG, D.; HATTORI, N.; UCHIDA, K.; ARIMURA, K.; EGASHIRA, K.; TAKESHITA, A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. **Circ Res**, v. 85, n. 4, p. 357-363, 1999.

IDE, T.; TSUTSUI, H.; HAYASHIDANI, S.; KANG, D.; SUEMATSU, N.; NAKAMURA, K.; UTSUMI, H.; HAMASAKI, N.; TAKESHITA, A. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. **Circ Res**, v. 88, n. 5, p. 529-535, 2001.

IGNATOWICZ, E.; RYBCZYNSKA, M. Some biochemical and pharmacological aspect of free radical-mediated tissue damage. **Pol J Pharmacol**, v. 46, n. 3, p. 103-114, 1994.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF diabetes atlas**. 7th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF diabetes atlas**. 8th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2017.

JACOBSON, A.M. The psychological care of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**, v. 334, n. 19, p. 1249-1253, 1996.

JAYACHANDRAN, M.; CHANDRASEKARAN, B.; NAMASIVAYAM, N. Geraniol attenuates fibrosis and exerts anti-inflammatory effects on diet induced atherogenesis by NF-kB signaling pathway. **Eur J Pharmacol**, v. 762, p. 102-111, 2015.

JEMAI, H.; SAYADI, S. Heart histopathology and oxidative features in diabetic rats and protective effects of oleuropein. **Adv Biosci Biotechnol**, v. 6, n. 6, p. 383-389, 2015.

JENEY, V.; ITOH, S.; WENDT, M.; GRADEK, Q.; USHIO-FUKAI, M.; HARRISON, D.G.; FUKAI, T. Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression. **Circ Res**, v. 96, n. 7, p. 723-729, 2005.

JEPPESEN, P.B.; GREGERSEN, S.; POULSEN, C.R.; HERMANSEN, K. Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel activity. **Metabolism**, v. 49, n. 2, p. 208-214, 2000.

JIANG, Z.Y.; WOOLARD, A.C.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBNA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853-856, 1991.

JOHANSEN, J.S.; HARRIS, A.K.; RYCHLY, D.J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovasc Diabetol**, v. 4, n. 5, p. 1-11, 2005.

JURKOVIC, S.; OSREDKAR, J.; MARC, J. Molecular impact of glutathione peroxidases in antioxidant processes. **Biochem Medica**, v. 18, n. 2, p. 162-174, 2008.

KAIN, V.; KUMAR, S.; SITASAWAD, S.L. Azelnidipine prevents cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic rats by reducing intracellular calcium accumulation, oxidative stress and apoptosis. **Cardiovas Diabetol**, v. 10, n. 1, p. 97-109, 2011.

KAVANAGH, K.L.; ELLING, R.A.; WILSON, D.L. Structure of *Toxoplasma gondii* LDH1: active-site differences from human lactate dehydrogenases and the structural basis for efficient APAD⁺ use. **Biochemistry**, v.43, n. 4, p.879–889, 2004.

KEENOY, B.M.Y.; VERTOMMEN, J.; LEEUW, I. The effect of flavonoid treatment on the glycation and antioxidant status in type 1 diabetic patients. **Diabetes Nutr Metab**, v. 12, n. 4, p. 256-263, 2005.

KELLY, K.A.; HAVRILLA, C.M.; BRADY, T.C.; ABRAMO, K.H.; LEVIN, E.D. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. **Environ Health Perspect**, v. 106, n. 7, p. 375-384, 1998.

KHAN, A.Q.; KHAN, R.; QAMAR, W.; LATEEF, A.; REHMAN, M.U.; TAHIR, M.; ALI, F.; HAMIZA, O.O.; HASAN, S.K.; SULTANA, S. Geraniol attenuates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced oxidative stress and inflammation in mouse skin: possible role of p38 MAP Kinase and NF- κ B. **Exp Mol Pathol**, v. 94, n. 3, p. 419-429, 2013.

KIM, E.C.; MIN, J.K.; KIM, T.Y.; LEE, S.J.; YANG, H.O.Y.; HAN, S.; KIM, Y.M.; KNOW, Y.G. 6-Gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 335, n. 2, p. 300-308, 2005.

KIM, S.H.; BAE, H.C.; PARK, E.J.; LEE, C.R.; KIM, B.J.; LEE, S.; PARK, H.H.; KIM, S.J.; SO, I.; KIM, T.W.; JEON, J.H. Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, v.407, n. 1, p. 129-134, 2011.

KIM, M.S.; WANG, Y.; RODRIGUES, B. Lipoprotein lipase mediated fatty acid delivery and its impact in diabetic cardiomyopathy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1821, n. 5, p. 800-808, 2012.

KIM, C.H. Expression of extracellular superoxide dismutase protein in diabetes. **Arch Plast Surg**, v. 40, n. 5, p. 517-521, 2013.

KING, A.J.F. The use of animal models in diabetes research. **Br J Pharmacol**, v. 166, n. 3, p. 877-894, 2012.

KLEPAC, N.; RUDES, Z.; KLEPAC, R. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. **Biomed Pharmacother**, v. 60, n. 1, p. 32-35, 2006.

KOCHHAR, K.P. Dietary spices in health and diseases (II). **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 52, n. 4, p. 327-354, 2008.

KORKMAZ, G.G.; KONUKOGLU, D.; KURTULUS, E.M.; IRMAK, H.; BOLAYIRLI, M.; UZUN, H. Total antioxidant status and markers of oxidative stress in subjects with normal or impaired glucose regulation (IFG, IGT) in diabetic patients. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 73, n. 8, p. 641-649, 2013.

KUBLI, D.A.; GUSTAFSSON, A.B. Umbreak my heart: targeting mitochondrial autophagy in diabetic cardiomyopathy. **Antioxid Redox Signal**, v. 22, n. 17, p. 1527-1544, 2015.

LAPCZYNSKI, A.; BATHIA, S.P.; FOXENBERG, R.J.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on geraniol. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 11, p. 160-170, 2008.

LARSEN, M.O.; WILKEN, M.; GORGREDSSEN, C.F.; CARR, R.D.; SVENDESEN, O.; ROLI, B. Mild streptozotocin diabetes in the Gottingen minipig. A novel model of moderate insulin deficiency and diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 282, n. 6, p. 1342-1351, 2002.

LE, C.T.; HOLLAR, L.; VAN, V.E.J.; VAN, L.A. Buthionine sulfoximine reduces the protective capacity of myocytes to withstand peroxide-derived free radical attack. **J Mol Cell Cardiol**, v. 25, n. 5, p. 519-528, 1993.

LEON, B.M.; MADDOX, T.M. Diabetes and cardiovascular disease: epidemiology, biological mechanism, treatment recommendations and future research. **World J Diabetes**, v. 6, n. 13, p. 1246-1258, 2015.

LERCO, M.M. Caracterização de um modelo experimental de diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir Bras**, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2003.

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, n. 1, p. 1-21, 2004.

LI, W.; YAO, M.; WANG, R.; SHI, Y.; HOU, L.; HOU, Z.; LIAN, K.; ZHANG, N.; WANG, Y.; LI, W.; WANG, W.; JIANG, L. Profile of cardica lipid metabolism in STZ-induced diabetic mice. **Lipids Health Dis**, v. 17, p. 231-243, 2018.

LIKIDLILID, A.; PATCHANANS, N.; POLDEE, S.; PEERAPATIDIT, T. Glutathione and glutathione peroxidase in type 1 diabetic patients. **J Med Assoc Thai**, v. 90, n. 9, p. 1759-1767, 2007.

LINK, J.J.; ROHATGI, A.; LEMOS, J.A. HDL cholesterol: physiology, pathophysiology and management. **Curr Probl Cardiol**, v. 32, n. 5, p. 268-314, 2007.

LONE, J.; YUN, J.W. Monoterpene limonene induces brown fat-like phenotype in 3T3-L1 white adipocytes. **Life Sci**, v. 153, p. 198-206, 2016.

LONG, A.N.; DAGOGO-JACK, S. Comorbidities of diabetes and hypertension: mechanisms and approach to target organ protection. **J Clin Hypertens**, v. 13, n. 4, p. 244-251, 2011.

LOPASCHUK, G.D.; FOMES, C.D.; STANLEY, W.C. Cardiac energy metabolism in obesity. **Circ Res**, v. 101, n. 4, p. 335-347, 2007.

LOPASCHUK, G.D.; USSHER, J.R.; FOLMES, C.D.; JASWAL, J.S.; STANLEY, W.C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. **Physiol Res**, v. 90, n. 1, p. 207-258, 2010.

LOPES-VIRELLA, M.F.; STONE, P.; ELLIS, S.; COLWELL, J.A. Cholesterol determination in high-density lipoprotein separated by three different methods. **Clin Chem**, v. 23, n. 5, p. 882-884, 1977.

LUCCHESI, A.N.; FREITAS, N.T.; CASSETTARI, L.L.; MARQUES, S.F.; SPADELLA, C.T. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease. **Acta Cir Bras**, v. 28, n. 7, p. 502-508, 2013.

LUPATTELLI, G.; MARCHESI, S.; LOMBARDINI, R.; SIEPI, D.; BAGAGLIA, F.; PIRRO, M.; CIUFFETTI, G.; SCHILLACI, G.; MANNARINO, E. Mechanisms of high-density lipoprotein cholesterol effects on the endothelial function in hyperlipemia. **Metabolism**, v. 52, n. 9, p. 1191-1195, 2003.

MAJITHIYA, J.B.; BALARAMAN, R. Time-dependent changes in antioxidant enzymes and vascular reactivity of aorta in streptozotocin-induced diabetic rats treated with curcumin. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 46, n. 5, p. 697-705, 2005.

MALLET, R.T.; SUN, J.; KNOTT, E.M.; SHARMA, A.B.; OLIVENCIA-YURVATI, A.H. Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. **Exp Biol Med**, v. 230, n. 7, p. 435-443, 2005.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.

MENDEZ, J.D.; BALDERAS, F. Regulation of hyperglycemia and dyslipidemia by exogenous L-arginine in diabetic rats. **Biochimie**, v. 83, n. 5, p. 453-458, 2001.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144-148, 1961.

MORRIS, E.M.; RECTOR, R.S.; THYFAULT, J.P.; IBDAH, J.A. Mitochondria and redox signaling in steatohepatitis. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 2, p. 485-504, 2011.

MOURA, R.A. **Técnicas de Laboratório**, 2ª. Ed., São Paulo: Atheneu, 1982.

MURALI, R.; SARAVANAN, R. Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomed Prev Nutr**, v. 2, n. 4, p. 269-275, 2012.

NADEEM, A.; MUMTAZ, S.; NAVEED, A.K.; ASLAM, M.; SIDDIQUI, A.; LODHI, G.M.; AHMAD, T. Gene-gene, gene-environment, gene-nutrient interactions and single nucleotide polymorphisms of inflammatory cytokines. **World J Diabetes**, v. 6, n. 4, p. 642-647, 2015.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. **Lancet**, v. 357, p. 1513-30, 2016.

NAKAMURA, W.; HOSODA, S.; HAYASHI, K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. **Biochim Biophys Acta**, v. 358, n. 2, p. 251-261, 1974.

NARAYAN, K.M.V.; BOYLE, J.P.; GEISS, L.S.; SAADDINE, J.B.; THOMPSON, T.J. Impact of recent increase in incidence on future diabetes burden. **Diabetes Care**, v. 29, n. 9, p. 2114-2116, 2006.

NATARAJAN, R.; NADLER, J.L. Lipoygenases and lipid signaling in vascular cells in diabetes. **Front Biosci**, v. 8, p. 783-795, 2003.

NEGI, G.; KUMAR, A.; JOSHI, R.P.; SHARMA, S.S. Oxidative stress and Nrf2 in the pathology of diabetic neuropathy: old perspective with a new angle. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 408, n. 1, p. 1-5, 2011.

NILE, S.H.; PARK, S.W. Chromatographic analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and xanthine oxidase inhibitory activities of ginger extracts and its reference compounds. **Ind Crops Prod**, v. 70, p. 238-244, 2015.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, X.L.; YAMAGISHI, S.; MATSUMURA, T.; KANEDA, Y.; YOREK, M.A.; BEEBE, D.; OASTES, P.J.; HAMMES, H.P.; GIARDINO, I.; BROWNLEE, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 878-790, 2000.

NISHIZAWA, T.; BORNFELDT, K.E. Diabetic vascular disease and the potential role of macrophage glucose metabolism. **Ann Med**, v. 44, n. 6, p. 555-563, 2012.

NITA, M.; GRZYBOWSKI, A. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1-23, 2016.

NIU, Y.G.; EVANS, R.D. Myocardial metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins in type 2 diabetes. **J Physiol**, v. 587, n. 13, p. 3301-3315, 2009.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OBROSOVA, I.G. Diabetes and the peripheral nerve. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 10, p. 931-940, 2009.

OKON, U.A.; OWO, D.U.; UDOKANG, N.E. UDOBANG, J.A.; EKPENYONG, C.E. Oral administration of aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum* ameliorates polyphagia, polydipsia and weight loss in streptozotocin-induced diabetic rats. **Am J Med Sci**, v. 2, n. 3, p. 45-49, 2012.

OKOSHI, K.; GUIMARÃES, J.F.; DI MUZIO, B.P.; FERNANDES, A.A.H.; OKOSHI, M.P. Diabetic cardiomyopathy. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 51, n. 2, p. 160-167, 2007.

OLIVEIRA, G.O.; BRAGA, C.P.; FERNANDES, A.A.H. Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius*] (Poepp. & Endl.) treatment. **Food Chem Toxicol**, v. 59, p. 256-260, 2013.

ORRENIUS, S.; McCONKEY, D.J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. **Trends Pharmacol Sci**, v. 10, n. 7, p. 281-285, 1989.

ORSOLIC, N.; GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVAC, V.; DIKIC, D.; PRSKALO, Z.S.; SIROVINA, D. DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. **Eur J Pharmacol**, v. 653, n. 1-3, p. 110-118, 2011.

OZCELIK, D.; TUNCDEMIR, M.; OZTURK, M.; UZUN, H. Evaluation of trace elements and oxidative stress levels in the liver and kidney of streptozotocin-induced experimental diabetic rat model. **Gen Physiol Biophys**, v. 30, n. 4, p. 356-363, 2011.

PARI, L.; RAJARAJESWARI, N. Efficacy of coumarin on hepatic key enzymes of glucose metabolism in chemical induced type 2 diabetic rats. **Chem Biol Interact**, v. 181, n. 3, p. 292-296, 2009.

PARK, C.H.; TANAKA, T.; KIM, J.H.; CHO, E.J.; PARK, J.C. SHIBAHARA, N.; YOKOZAWA, T. Hepato-protective effects of loganin, iridoid glycoside from Corni fructus, against hyperglycemia-activated signaling pathway in liver of type 2 diabetic ob/ob mice. **Toxicol**, v. 290, n. 1, p. 14-21, 2011.

PATEL, S.S.; GOYAL, R.K. Cardioprotective effects of gallic acid in diabetes-induced myocardial dysfunction in rats. **Pharmacognosy Res**, v. 3, n. 4, p. 239-245, 2011.

PAVAN, B.; DALPIAZ, A.; MARANI, L.; BEGGIATO, S.; FERRARO, L.; CANISTRO, D.; PAOLINI, M.; VIVARELLI, F.; VALERII, M.C.; COMPARONE, A.; FACIO, L.D.; SPISNI, E. Geraniol pharmacokinetics, bioavailability and its multiple effects on the liver antioxidant and xenobiotic-metabolizing enzymes. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 18-32, 2018.

PEDERSON, B.A.; SCHROEDER, J.M.; PARKER, G.E.; SMITH, M.W.; DePAOLI-ROACH, A.A.; ROACH, P.J. Glucose metabolism in mice lacking muscle glycogen synthase. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3466-3473, 2005.

PEREIRA, B.; COSTA-ROSA, L.F.; BECHARA, E.J.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenomedullated rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 6, p. 827-833, 1998.

PERSEGHIN, G.; LATTUADA, G.; DE COBELLI, F.; ESPOSITO, A.; COSTANTINO, F.; CANU, T.; SCIFO, P.; DE TADDEO, F.; MAFFI, P.; SECCHI, A.; DEL MASCHIO, A.; LUZI, L. Reduced intrahepatic fat content is associated with increased whole-body lipid oxidation in patients with type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 18, n. 12, p. 2615-1621, 2005.

PHAM-HUY, L.A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **Int J Biomed Sci**, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.

POLO, M.; CRESPO, R.; BRAVO, M.D. Geraniol and simvastatin show a synergistic effect on a human hepatocarcinoma cell line. **Cell Biochem Funct**, v. 29, n. 6, p. 452-458, 2011.

PRASAD, S.N.; MURALIDHARA. Protective effects of geraniol (a monoterpene) in a diabetic neuropathy rat model: attenuation of behavioral impairments and biochemical perturbations. **J Neurosci Res**, v. 92, n. 9, p. 1205-1216, 2014.

PRAVEENA, S; SUJATHA, P.; SAMEERA, K. Trace elements in diabetes mellitus. **J Clin Diagn Res**, v. 7, n. 9, p. 1863-1865, 2013.

PUNITHA, I.S.R.; RAJENDRAN, K.; SHIRWAIKAR, A.; SHIRWAIKAR, A. Alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* regulates carbohydrate metabolism and improves antioxidant status in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2, n. 3, p. 375–381, 2005.

RAHIGUDE, A.; BHUTADA, P.; KAULASKAR, S.; ASWAR, M.; OTARI, K. Participation of antioxidant and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats. **Neuroscience**, v. 226, p. 62-72, 2012.

RAINS, J.L.; JAIN, S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radic Biol Med**, v. 50, n. 5, p. 567-575, 2011.

RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E.N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. Antioxidants and human diseases. **Clin Chim Acta**, v. 436, p. 332-347, 2014.

RATHINAM, A.; PARI, L.; CHANDRAMOHAN, R.; SHEIKH, B.A. Histopathological findings of the pâncreas, liver and carbohydrate metabolizing enzymes in STZ-induced diabetic rats improved by administration of myrtenal. **J Physiol Biochem**, v. 70, n. 4, p. 935-946, 2014.

RAUSCHER, F.M.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. Effects of new antioxidant compounds PNU-104067F and PNU-74389G on antioxidant defense in normal and diabetic rats. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 14, n. 4, p. 189-194, 2000.

REDONDO, M.J.; EISENBARTH, G.S. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes and associated disorders. **Diabetolog**, v. 45, n. 5, p. 605-622, 2002.

REIS, J.S.; VELOSO, C.A.; MATTOS, R.T.; PURISH, S.; NOGUEIRA-MACHADO, J.A. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n. 7, p. 1096-1105, 2008.

REKHA, K.R.; SELVAKUMAR, G.P.; SETHUPATHY, S.; SANTHA, K.; SIVAKAMASUNDARI, R.I. Geraniol ameliorates the motor behavior and neurotrophic factors inadequacy in MPTP-induced mice model of Parkinson's disease. **J Mol Neurosci**, v. 51, n. 3, p. 851-862, 2013.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 357-363, 1994.

RIOS, L.; WARD, C. Feline diabetes mellitus: pathophysiology and risk factors. **Compend Contin Educ Vet**, v.30, n.12, p. 1-7, 2008.

RIZVI, S.I.; MAURYA, P.K. Markers of oxidative stress in erythrocytes during aging in humans. **Ann NY Acad Sci**, v. 1100, p. 373-82, 2007.

ROEHRIG, K.; ALLRED, J.B. Direct enzymatic produce for the determination of liver gkycogen. Analytical and flavoids after oral and intervenous administration. **Free Rad Biol Med**, v. 27, p. 278-286, 1974.

ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 212, n. 2, p.167-178, 2006.

ROMESTAING, C.; PIQUET, M.A.; LETEXIER, D.; REY, B.; MOURIER, A.; SERVAIS, S.; BELOUZE, M.; ROULEAU, V.; DAUTRESME, M.; OLLIVIER, I.; FAVIER, R.; RIGOULET, M.; DUCHAMP, C.; SIBILLE, B. Mitochondrial adaptations to steatohepatitis induced by a methionine-and choline-deficient diet. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 1, p. 110-119, 2008.

RONG, Z.T.; GONG, X.J.; SUN, H.B.; LI, Y.M.; JI, H. Protective effects of oleanolic acid on cerebral ischemic damage in vitro and H₂O₂-induced injury in vitro. **Pharm Biol**, v. 49, n. 1, p. 78-85, 2011.

ROSA, L.R.O.; KAGA, A.K.; BARBANERA, P.O.; QUEIROZ, P.M.; CARMO, N.O.L, FERNANDES, A.A.H. Beneficial effects of N-acetylcysteine on hepatic oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 96, n. 4, p. 412-418, 2018.

ROSEN, P.; NAWROTH, P.P.; KING, G.; MOLLER, W.; TRITSCHLER, H.J.; PACKER, L. The role of oxidative stress in the onset progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 17, n. 3, p. 189-912, 2001.

SADE, G. Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 28, n. 3, p. 228-235, 2012.

SAGARE, A.A.; TRIVEDI, D.J.; PATIL, V.S.; KULKARNI, S.P. Protein carbonyl e microalbuminuria in type 2 diabetes mellitus. **India J Bas Appl Med Res**, v. 2, n. 5, p. 399-404, 2012.

SAH, S.P.; SINGH, B.; CHOUDHARY, S.; KUMAR, A. Animal models of insulin resistance: A review. **Pharmacol Rep**, v. 68, n. 6, p. 1165-1177, 2016.

SAID, O.; KHALIL, K.; FULDER, S.; AZAIZEH, H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **J Ethnopharmacol**, v. 83, n. 3, p. 251-265, 2002.

SALGUEIRO, A.C.; LEAL, C.Q.; BIANCHINI, M.C.; PRADO, I.O.; MENDEZ, A.S.; PUNTEL, R.L.; FOLMER, V.; SOARES, F.A.; AVILA, D.S.; PUNTEL, G.O. The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations. **J Ethnopharmacol**, v. 148, n. 1, p. 81-87, 2013.

SANTOS, K.C.; BRAGA, C.P.; BARBANERA, P.O.; SEIVA, F.R.F.; JUNIOR, A.F.; FERNANDES, A.A.H. Cardiac energy metabolism and oxidative stress biomarkers in diabetic rat treated with resveratrol. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. 102775-102783, 2014.

SARKAR, P.; BHOWMICK, A.; BANU, S. Comparative analysis of different dietary antioxidants on oxidative stress pathway genes in L6 myotubes under oxidative stress. **Cytotechnology**, v. 70, n. 4, p. 1177-1192, 2018.

SARKHAIL, P.; RAHMANIPOUR, S.; FADYEVATAN, S.; MOHAMMADIRAD, A.; DEGHAN, G.; AMIN, G.; SHAFIEE, A.; ABDOLLAHI, M. Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. **Pharmacol Res**, v. 56, n. 3, p. 261-266, 2007.

SATAPATI, S.; KUCEJOVA, B.; DUARTE, J.A.; FLETCHER, J.A.; REYNOLDS, L.; SUNNY, N.E.; HE, T.; NAIR, L.A.; LIVINGSTON, K.A.; FU, X.; MERRITT, M.E.; SHERRY, A.D.; MALLOY, C.R.; SHELTON, J.M.; LAMBERT, J.; PARKS, E.J.; CORBIN, I.; MAGNUSON, M.A.; BROWNING, J.D.; BURGESS, S.C. Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. **J Clin Invest**, v. 125, n. 12, p. 4447-4462, 2015.

SCHIFFRIN, E.L. Antioxidants in hypertension and cardiovascular disease. **Mol Interv**, v. 10, n. 6, p. 354-362, 2010.

SCHILLING, J.D. The mitochondria in diabetic heart failure: from pathogenesis to therapeutic promise. **Antioxid Redox Signal**, v. 22, n. 17, p. 1515-1526, 2015.

SCHWARTZ, E.A.; REAVEN, P.D. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins, vascular inflammation, and atherosclerosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1821, n. 5, p. 858-866, 2012.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SEFEROVIC, P.M.; PAULUS, W.J. Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. **Eur Heart J**, v. 36, n. 27, p. 1718-1727, 2015.

SEIVA, F.R.; EBAID, G.M.; CASTRO, A.V.; OKOSHI, K.; NASCIMENTO, A.; ROCHA, K.K.; PADOVANI, C.R.; CICOONA, A.C.; NOVELLI, E.L. Growth hormone and heart failure: oxidative stress and energetic metabolism in rats. **Growth Horm IGF Res**, v. 18, n. 4, p. 275-283, 2008.

SEKAR, D.S.; SIVAGNANAM, K.; SUBRAMANIAN, S. Antidiabetic activity of *Momordica charantia* seeds streptozotocin induced diabetic rats. **Pharmazie**, v. 60, n.5, p. 283-387, 2005.

SEVERSON, D.L. Diabetic cardiomyopathy: recent evidence from mouse models of type 1 and type 2 diabetes. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 82, n. 10, p. 813-823, 2004.

SHAMIR, R.; KASSIS, H.; KAPLAN, M.; NAVEH, T.; SHEHADEH, N. Glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus improves lipid serum levels and oxidative stress. **Pediatr Diabetes**, v. 9, n. 2, p. 104-109, 2008.

SHARMA, S.; ADROGUE, J.V.; GOLFMAN, L.; URAY, I.; LEMM, J.; YOUKER, K.; NOON, G.O.; FRAZIER, O.H.; TAEGTMEYER, H. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. **Faseb J**, v. 18, n. 14, p. 1692-1700, 2004.

SHEW, W.H.; JENG, C.Y.; LEE, W.J.; LIN, S.Y.; PEI, D.; CHEN, Y.T. Simvastatin treatment in postprandial hypertriglyceridemia in type 2 diabetes mellitus patients with combined hyperlipidemia. **Metab**, v. 50, n. 3, p. 355-359, 2001.

SHUKLA, K.; DIKSHIT, P.; TYAGI, M.K.; SHUKLA, R.; GAMBHIR, J.K. Ameliorative effect of *Withania coagulans* on dyslipidemia and oxidative stress in nicotinamide-streptozotocin induced diabetes mellitus. **Food Chem Toxicol**, v. 50, n. 10, p. 3595-3604, 2012.

SILVA, B.Q.; HAHN, S.R. Use of medicinal plants by individuals with hypertension, diabetes mellitus or dyslipidemia. **R Bras Farm Hosp Serv**, v. 2, n. 3, p. 36-40, 2011.

SILVA, M.; LIMA, W.G.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L. Effect of streptozotocin on the glycemic and lipid profiles and oxidative stress in hamsters. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 55, n. 1, p. 46-53, 2011.

SINATRA, S.T. Metabolic cardiology: an integrative strategy in the treatment of congestive heart failure. **Altern Ther Health Med**, v. 15, n. 3, p. 44-52, 2009.

SINGER, T.P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and alpha-glycerophosphate dehydrogenase. **Methods Biochem Anal**, v.32, p.123-75, 1984.

SIVITZ, W.I.; YOREK, M.A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 4, p.537-711, 2010.

SIWIK, D.A.; TZORTZIS, J.D.; PIMENTAL, D.R.; CHANG, D.L.; PAGANO, P.J.; SINGH, K.; SAWYER, D.B.; COLUCCI, W.S. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. **Circ Res**, v. 85, n. 2, p. 147-153, 1999.

SKYLER, J.S.; BAKRIS, G.L.; BONIFACIO, E.; DARSOW, T.; ECKEL, R.H.; GROOP, L.; GROOP, P.; HANDELSMAN, Y.; INSEL, R.A.; MATHIEU, C.; McELVAINE, A.T.; PALMER, J.P.; PUGLIESE, A.; SCHATZ, D.A.; SOSENKO, J.M.; WILDING, J.P.H.; RATNER, R.E. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. **Diabetes**, v. 66, n. 2, p. 241-255, 2017.

SMALL, D.M.; COOMBES, J.S.; BENNETT, N.; JOHNSON, D.W.; GOBE, G.C. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. **Nephrology**, v. 17, n. 4, p. 311-321, 2012.

SMITH, R.A.; HARTLEY, R.C.; COCHEMÉ, H.M.; MURPHY, M.P. Mitochondrial pharmacology. **Trends Pharmacol Sci**, v. 33, n. 6, p. 341-352, 2012.

SOLONI, F.G. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. **Clin Chem**, v. 17, n. 6, p. 529-534, 1971.

SOLORZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Curr Opin Biotechnol**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

STANLEY, W.C.; SABBAH, H.N. Metabolic therapy for ischemic disease: the rationale for inhibition of fatty acid oxidation. **Heart Fail Rev**, v. 10, n. 4, p. 275-279, 2005.

SUGAWARA, T.; LEWÉN, A.; GASCHE, Y.; YU, F.; CHAN, P.H. Overexpression of SOD1 protects vulnerable motor neurons after spinal cord injury by attenuating mitochondrial cytochrome c release. **FASEB J**, v. 16, n. 14, p. 1997-1999, 2002.

SUNDARAM, R.; SHANTHI, P.; SACHDANANDAM, P. Effect of tangeretin, a polymethoxylated flavone on glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 21, n. 6, p. 793-799, 2014.

SUZUKI, D; MIYATA, T. Carbonyl stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Intern Med**, v. 38, n.4, p. 309-314, 1999.

SUZUKI, K. Anti-oxidants for therapeutic use: why are only a few drugs in clinical use? **Adv Drug Deliv Res**, v. 61, n. 4, p. 287-289, 2009.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.

TAKKAHASHI, N.; KAWADA, T.; GOTO, T.; YAMAMOTO, T.; TAIMATSU, A.; MATSUI, N.; KIMURA, K.; SAITO, M.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K.; FUSHIKI, T. Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR γ and PPAR α in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. **FEBS Lett**, v. 514, n. 2-3, p. 315-322, 2002.

TAO, Z.; SHI, A.; ZHAO, J. Epidemiological perspectives of diabetes. **Cell Biochem Biophys**, v. 73, n. 1, p. 181-185, 2015.

TASKINEN, M.R. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. **Diabetologia**, v. 46, n. 6, p. 733-749, 2003.

TESFAMARIAM, B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 12, p. 383-391, 1994.

THAPA, D.; LOSA, R.; ZWEIFEL, B.; WALLACE, R.J. Sensitivity of pathogenic and comensal bacteria from the human colon to essential oils. **Microbiology**, v. 158, n. 11, p. 2870-2877, 2012.

THOMASZ, L.; OGLIO, R.; SALVARREDI, L.; PERONA, M.; ROSSICH, L.; COPELLI, S.; PISAREV, M.; JUVENA, G. Regulation of NADPH-oxidase NOX4 by delta iodolactone (IL- δ) in thyroid cancer cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 470, p. 115-126, 2018.

TIETZE, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem**, v. 27, n. 3, p. 502-522, 1969.

TIWARI, B.K.; PANDEY, K.B.; ABIDI, A.B.; RIZVI, S.I. Markers of oxidative stress during diabetes mellitus. **J Biomark**, v. 2013, p. 8, 2013.

TOMADONI, B.; CASSANI, L.; MOREIRA, M.R.; PONCE, A. Efficacy of vanillin and geraniol in reducing *Escherichia coli* O1257:H7 on strawberry juice. **LWT-Food Sci Technol**, v. 64, n. 2, p. 554-557, 2015.

TOUSSAINT, O.; HOUBION, A.; REMACLE, J. Relationship between the critical level of oxidative stresses and the glutathione peroxidase activity. **Toxicology**, v. 81, n. 2, p. 89-101, 1993.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S.; YOKOTA, T. Oxidative stress in cardiac and skeletal muscle dysfunction associated with diabetes mellitus. **J Clin Biochem Nutr**, v. 48, n. 1, p. 68-71, 2011.

UPADHYAY, R.K. Emerging risk biomarkers in cardiovascular diseases and disorders. **J Lipids**, v. 2015, p. 1-50, 2015.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN DE WEIJER, T.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V.B.; SCHRAUWEN, P. Lipotoxicity in type 2 diabetic cardiomyopathy. **Cardiovasc Res**, v. 92, n. 1, p. 10-18, 2011.

VARMA, U.; KOUTSIFELI, P.; BENSON, V.L.; MELLOR, K.M.; DELBRIDGE, L.M.D. Molecular mechanism of cardiac pathology in diabetes – experimental insights. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1864, (5 Pt B), p. 1949-1959, 2018.

VERGES, B. Lipid disorders in type 1 diabetes. **Diabetes Metab**, v. 35, n. 5, p. 353-360, 2009.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. **Rev Bras Pl Med**, v. 4, n. 2, p. 35-45, 2002.

WALLACE, K.B.; EELLS, J.T.; MADEIRA, V.M.; CORTOPASSI, G.; JONES, D.P. Mitochondria-mediated cell injury. Symposium overview. **Fundam Appl Toxicol**, v. 38, n. 1, p. 23-37, 1997.

WANG, J.; WANG, H.; HAO, P.; XUE, L.; WEI, S.; ZHANG, Y.; CHEN, Y. Inhibition of aldehyde dehydrogenase 2 by oxidative stress is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. **Mol Med**, v. 17, n. 3-4, p. 172-179, 2011.

WANG, J.; SU, B.; ZHU, H.; CHEN, C.; ZHAO, G. Protective effect of geraniol inhibits inflammatory response, oxidative stress and apoptosis in traumatic injury of the spinal cord through modulation of NF- κ B and p38 MAPK. **Exp Ther Med**, v. 12, n. 6, p. 3607-3613, 2016.

WEYTJENS, C.; COSYNS, B.; VAN, C.G.; DANIELS, C.; SPINCEMAILLE, K.; DUPONT, A.; FRANKEN, P.R. Abnormal response to inotropic stimulation in young asymptomatic type 1 diabetic patients demonstrated by serial gated myocardial perfusion SPECT imaging. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 32, n. 11, p. 1317-1323, 2005.

WIERNSPERGER, N.F. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. **Diabetes Metab**, v. 29, n. 6, p. 549-585, 2003.

WILKINSON, J.H. **Introducción al diagnóstico enzimático**. Ediciones Toray, p. 310, 1965.

WINK, M. **Biochemistry of plant secondary metabolism**. In: Annual Plant Reviews, v. 2, Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, 1999.

WU, P.; PETERS, J.M.; HARRIS, R.A. Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 287, n. 2, p. 391-396, 2001.

YAN, B.; REN, J.; ZHANG, Q.; GAO, R.; ZHAO, F.; WU, J.; YANG, J. Antioxidative effects of natural products on diabetic cardiomyopathy. **J Diabetes Res**, v. 2017, p. 1-13, 2017.

YANG, Z.; LAUBACH, V.E.; FRENCH, B.A.; KRON, I.L. Acute hyperglycemia enhances oxidative stress and exacerbates myocardial infarction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase during reperfusion. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 137, n. 3, p. 723-729, 2009.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice – Hall, p. 718, 1996.

ZHENG, D.; MacLEAN, P.S.; POHNERT, S.C.; KNIGHT, J.B.; OLSON, A.L.; WINDER, W.W.; DOHM, G.L. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. **J Appl Physiol**, v. 91, n. 3, p. 1073-1083, 2001.

ZIMMET, P.; TURNER, R.; McCARTY, D.; ROWLEY, M.; MACKAY, I. Crucial points at diagnosis: type 2 diabetes or slow type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, p. 59-64, 1999.