

**UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE**

SCHEILA MEDEIROS

**EFEITOS HIPOLIPEMIANTE, HIPOGLICEMIANTE E ANTIOXIDANTE DA
Myrcia splendens (Sw.) DC. EM MODELO ANIMAL DE DIABETES TIPO II
INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA**

JOINVILLE – SC

2019

SCHEILA MEDEIROS

**EFEITOS HIPOLIPEMIANTE, HIPOGLICEMIANTE E ANTIOXIDANTE DA
Myrcia splendens (Sw.) DC. EM MODELO ANIMAL DE DIABETES TIPO II
INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA**

Dissertação de mestrado
apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Saúde e Meio Ambiente, na
Universidade da Região de Joinville-
UNIVILLE.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela
Delwing de Lima.

JOINVILLE – SC

2019

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

M488 Medeiros, Scheila
Efeitos hipolipemiantes, hipoglicemiantes e antioxidantes da *Myrcia splendens* (Sw.) DC. em modelo animal de diabetes tipo II induzido por estreptozotocina / Scheila Medeiros; orientadora Dra. Daniela Delwing de Lima. – Joinville: UNIVILLE, 2019.

100f.: il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Estresse oxidativo. 2. Mirtaceae. 3. Diabetes. 4. Hipertrigliceridemia. I. Lima, Daniela Delwing (orient.). II. Título.

CDD615.1

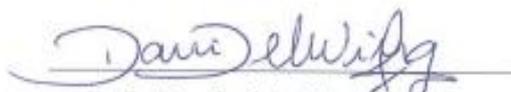
Termo de Aprovação

“Avaliação do Potencial Hipoglicemiante, Hipolipemiante e Antioxidante de *Myrcia splendens* em Modelo Animal de Diabetes Tipo II”

por

Scheila Medeiros

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

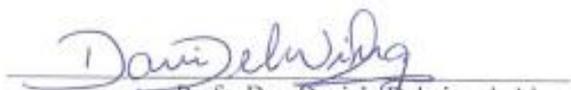


Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)

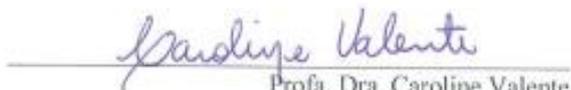


Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

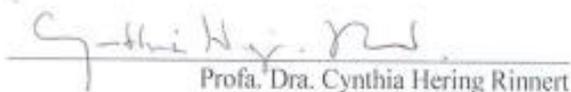
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)



Profa. Dra. Caroline Valente
(FURB)



Profa. Dra. Cynthia Hering Rinnert
(UNIVILLE)

Joinville, 08 de novembro de 2019

“Dedico esta dissertação a minha família, meu marido e filho, que são a motivação para viver. E a minha orientadora e colegas de pesquisa que, pela vivência de uma produção compartilhada na comunhão com amigos nesses espaços foram a melhor experiência da minha formação.”

AGRADECIMENTOS

Há uma frase que diz: Sozinhos somos frágeis, mas juntos não há nada que possa nos impedir de conquistar o mundo. E é com estas palavras que começo meu agradecimento, partindo do princípio de que não seria possível alcançar mais esta realização sem o amparo de pessoas especiais que seguem ao meu lado.

Deus tem seu primeiro lugar nesta lista, já que foi nele em que me amparei quando precisei acalmar meu coração e buscar sabedoria e serenidade para superar cada obstáculo. Pela dádiva da vida, obrigada.

Agradeço aos meus pais e irmãos pelos vários ensinamentos, sendo o principal deles a persistir naquilo que acredito. Obrigada por entenderem as minhas faltas e reclusão quando precisei me dedicar ao estudo. A minha mãe em especial, por sua dedicação indispensável ao cuidar do meu filho para que eu pudesse me fazer presente em sala de aula ou em laboratório.

Ao meu esposo, Joel pela sua paciência ao entender quão importante foi para eu concluir mais este desafio. E por ter me dado alento quando me senti sem forças para continuar. Por cuidar do nosso filho e se dedicar a ele quando eu não pude estar presente ou até mesmo suprimindo meu papel no trabalho. Você tem meu amor e reconhecimento.

Ao meu filho Murilo e seu amor incondicional. Ser sua mãe é minha maior felicidade e sua existência é a maior prova da existência de Deus.

Aos amigos, agradeço pelo incentivo que fez com que eu me mantivesse persistente em cada etapa, em especial a Aline Thomsen por ter sido a pessoa que sempre esteve presente para me fazer lembrar o meu potencial e minha capacidade.

Aos colegas de estudo, que hoje se tornaram amigos, agradeço por terem feito este caminho ficar mais leve. A presença de cada um foi de grande importância.

A minha imensa gratidão a professora Daniela, por sua inigualável orientação durante todo o mestrado e por compartilhar todo seu conhecimento e sabedoria comigo. Não tenho dúvidas de que tive a melhor orientadora e a melhor pessoa em quem eu pudesse me espelhar pelo profissionalismo e

competência impecável. Sua presença vai muito além do papel de orientadora, a preocupação e o carinho que tem com todos os envolvidos na pesquisa nos faz tê-la como uma amiga. Obrigada por sempre estar disponível, presente e disposta a contribuir para que fosse possível concluir esta etapa importante para me tornar mestre. Você tem o meu respeito, carinho e admiração.

Agradeço a minha amiga Thayná, que fez a diferença em todo este processo, indo muito além de suas obrigações, sendo conselheira, motivadora nas horas em que me preoquei com os resultados e por repassar a mim tantos ensinamentos com tanta paciência e carinho.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa da Univille que participaram da realização deste trabalho, obrigada pela companhia e por compartilharem comigo todos os ensinamentos e estarem sempre dispostos a ajudar. Sem a contribuição de todos vocês este trabalho não teria se findado.

A todos os professores do mestrado pelos ensinamentos, e a todos aqueles que de alguma forma estiveram ao meu lado durante a execução deste trabalho.

Aos membros da banca, pelas riquíssimas contribuições e o desprendimento de tempo em ler e ajudar na melhora deste trabalho.

À UNIVILLE, FAPESC e a FURB.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

“Um esforço só é expresso em recompensa,
quando uma pessoa se recusa a desistir. ”

Napoleon Hill

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da administração crônica do extrato de diclorometano (EDM) obtido de folhas da *Myrcia splendens* (Sw.) DC sobre as alterações provocadas pela diabetes (DM) tipo II, induzida pela estreptozotocina, na hipertrigliceridemia, hiperglicemia e estresse oxidativo como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas e a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) em sangue e rins de ratos machos de 60 dias de idade. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade da Região de Joinville, Brasil, sob o número 011/2017. Grupo controle que recebeu tampão citrato por injeção intraperitoneal uma vez e água via gavagem uma vez ao dia durante 15 dias; grupo DM tipo II que recebeu uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina, seguida de injeção de nicotinamida e água via gavagem uma vez ao dia durante 15 dias; grupo controle extrato que recebeu água por injeção intraperitoneal (1 vez) e EDM (25, 50, 100 ou 150 mg), via gavagem, uma vez ao dia durante 15 dias; grupo diabetes tipo 2 + extratos que recebeu uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (60mg/kg), 15 min após a administração de nicotinamida (120 mg/kg; intraperitoneal) e EDM (25, 50, 100 ou 150 mg/kg), via gavagem, uma vez ao dia durante 15 dias. O tratamento iniciou após a confirmação da diabetes. Os animais foram sacrificados por decapitação na ausência de anestesia e em seguida o sangue total foi coletado. O sangue, pâncreas e demais órgãos foram removidos para a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo, glicose e análise histológica. Os resultados mostraram que a administração de estreptozotocina-nicotinamida aumentou significativamente a glicose e níveis de triglicérides (TGs) no soro de ratos. A administração crônica de EDM (25, 50, 100 e 150 mg/kg) impediu parcialmente a hiperglicemia induzida pela estreptozotocina-nicotinamida. Além disso, o EDM preveniu parcialmente em doses de 50 mg/kg e em doses de 100 e 150 mg/kg impediu totalmente a hipertrigliceridemia. Os resultados também mostraram que a administração crônica de EDM nas doses de 100 mg/kg preveniu parcialmente e 150 mg/kg impediu totalmente os aumentos nos níveis de TBA-RS e a redução no teor de

sulfidrila no sangue de ratos. Com relação às enzimas antioxidantes CAT e GSH-Px, a administração crônica de EDM nas doses de 100 e 150 mg/kg levou a um aumento significativo nas atividades de CAT e GSH-Px. O EDM nas doses de 25 e 50 mg/kg não impediu aumento de CAT e parcialmente impediu a redução de GSH-Px, nas doses de 100 e 150 mg/kg, quando administrado em animais que receberam estreptozotocina-nicotinamida, levou a um aumento significativo na atividade de CAT, quando comparado ao grupo diabético. Além disso, evitou a diminuição da atividade GSH-Px induzida pela diabetes e aumentou esta atividade enzimática. Os resultados nas alterações nos parâmetros do estresse oxidativo renal mostram que o modelo de diabetes tipo II não alterou o TBA-RS, teor total de sulfidrilas, conteúdo de proteínas e atividade de SOD no rim de ratos. Por outro lado, houve diminuição da CAT e atividades de GSH-Px neste órgão. Os resultados também mostraram que o EDM (25, 50, 100 e 150 mg/kg) não alterou os níveis de TBA-RS, o teor total de sulfidrila, as atividades CAT e SOD, enquanto o EDM nas doses de 100 e 150 mg/kg reduziram o conteúdo de proteínas carboniladas e o na dose de 150 mg/kg aumentaram a atividade de GSH-Px. Além disso, o tratamento com EDM nas doses de 25 e 50 mg/kg não impediu as reduções de CAT e GSH-Px, em doses de 100 mg/kg, impediu parcialmente a redução na atividade da CAT e na dose de 150 mg/kg impediu totalmente as reduções de CAT e GSH-Px. O EDM foi capaz de prevenir diversas das alterações causadas pela DM tipo II nos níveis de hipertrigliceridemia como nos parâmetros de estresse oxidativo além de prevenir parcialmente a hiperglicemia no sangue e rins de ratos. Por meio deste estudo, evidenciou-se que a DM tipo 2 leva a um quadro de hiperglicemia seguido de aumento de triglicérides, bem como estresse oxidativo e que o EDM de *M. splendens* possui capacidade hipoglicemiante, hipolipemiante e antioxidante frente a estas substâncias.

Palavras Chave: Diabetes tipo 2; Estresse oxidativo; Hipertrigliceridemia; Antioxidantes; *M. splendens*.

ABSTRACT

The purpose of this study was to verify the effects of chronic administration of dichloromethane extract (EDM) from *Myrcia splendens* leaves on streptozotocin-induced type 2 DM, hypertriglyceridemia, hyperglycemia and oxidative stress as thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total sulfhydryl content and the activity of antioxidant catalase enzymes (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in blood and kidneys of 60-day-old male rats. The experiment was approved by the Animal Research and Ethics Committee of the University of Joinville, Brazil, under number 011/2017. Control group receiving intraperitoneal injection water once and gavage once daily for 15 days; type 2 diabetes group who received an intraperitoneal injection of streptozotocin, followed by nicotinamide injection and gavage once a day for 15 days; extract control group that received water by intraperitoneal injection (1 time) and EDM (25, 50, 100 or 150 mg/kg) via gavage once a day for 15 days; type 2 diabetes + extracts group who received an intraperitoneal injection of streptozotocin (60mg/kg) 15 min after prescription of nicotinamide (120 mg/kg; intraperitoneal) and EDM (25, 50, 100 or 150 mg/kg) via storage once a day for 15 days. Treatment started after the confirmation of diabetes. The animals were sacrificed by decapitation in the absence of anesthesia and then whole blood was collected. Blood, pancreas and kidneys were removed for oxidative stress, glucose and immunohistochemical analysis. Results showed that streptozotocin-nicotinamide administration significantly increased glucose and triglyceride levels in rat serum. Chronic administration of DME (25, 50, 100 and 150 mg/kg) partially prevented streptozotocin-nicotinamide-induced hyperglycemia. In addition, DME partially prevented at doses of 50 mg/kg and at doses of 100 and 150 mg/kg completely prevented hypertriglyceridemia. The results also showed that chronic administration of DME at doses of 100 mg/kg partially prevented and 150 mg/kg totally prevented increases in TBA-RS levels and a reduction in rat blood sulfhydryl content. Regarding the antioxidant enzymes CAT and GSH-Px, chronic administration of DME at doses of 100 and 150 mg/kg led to a significant increase in CAT and GSH-Px activities. DME at doses of 25 and 50 mg/kg did not prevent CAT increase and partially prevented GSH-Px reduction at 100 and 150 mg/kg doses when given to animals receiving streptozotocin-nicotinamide, led to an

increase significant in CAT activity when compared to the diabetic group. It also prevented the decrease in diabetes-induced GSH-Px activity and increased this enzymatic activity. Results of changes in renal oxidative stress parameters show that the type 2 diabetes model did not alter TBA-RS, total sulfhydryl content, protein content and SOD activity in rat kidney. On the other hand, there was a decrease in CAT and GSH-Px activities in this organ. The results also showed that DME (25, 50, 100 and 150 mg/kg) did not alter TBA-RS levels, total sulfhydryl content, CAT and SOD activities, while DME at 100 and 150 mg/kg reduced carbonylated protein content and DME at 150 mg/kg increased GSH-Px activity. In addition, DME treatment at 25 and 50 mg/kg did not prevent CAT and GSH-Px reductions at 100 mg/kg, partially prevented reduction in CAT activity and at 150 mg/kg dose totally prevented CAT and GSH-Px reductions. DME was able to prevent many of the changes caused by type 2 DM in hypertriglyceridemia levels as well as oxidative stress parameters and partially prevent hyperglycemia in rat blood and kidneys. Through this study, we showed that type 2 DM leads to hyperglycemia followed by increased triglycerides as well as oxidative stress and that *M. splendens* DME has hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant capacity against these substances.

Keywords: Type 2 diabetes; Oxidative stress; Hypertriglyceridemia; Antioxidants; *M. splendens*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação do Radical Livre.....	34
Figuras 2 – Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.....	37
Figura 3 – Reação de FENTON e HABER-WEISS.....	39
Figura 4 – Etapas da Peroxidação Lipídica.....	42
Figura 5 – Modificações de resíduos de aminoácidos.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG: Ácidos Graxos

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

ASCVD: Doença Cardiovascular Aterosclerótica

ATP: Adenosina Trifosfato

CAT: Catalase

COQ: Coenzima Q

DAB: Diaminobenzidina

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DM: Diabetes Mellitus

DME: Dichloromethane Extract

DMI: Diabetes Mellitus do tipo I

DMII: Diabetes Mellitus do tipo II

DMG: Diabetes Mellitus Gestacional

DTNB: Ácido Ditionitrobenzóico

EDM: Extrato de Diclorometano

EO: Estresse Oxidativo

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio

GSH: Glutathiona

GSH-Px: Glutathiona Peroxidase

GSSG: Glutathiona Oxidada

GRD: Glutathiona Redutase

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade

HE: Hematoxina Eosina

HO₂: Hidroperoxila

HTG: Hipertigliceridemia

KCl: Cloreto de Potássio

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade

LOO•: Radical Peroxila

LOOH: Hidroperóxidos

MDA: Malondialdeído

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NO•: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

O₂: Oxigênio

¹O₂: Oxigênio *Singlet*

O₂•: Radical Superóxido

OH•: Radical Hidroxil

OMS: Organização Mundial da Saúde

ON: Dióxido de Nitrogênio

ONOO⁻: Ânion Peroxinitrito

RL's: Radicais Livres

RNA: Ácido Ribonucleico

SOD: Superóxido Dismutase

TBA-RS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TG's: Triglicerídeos

VLDL: Lipoproteína de Densidade Muito Baixa

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 REVISÃO.....	24
3.1 DIABETES.....	24
3.1.1 Diabetes Mellitus tipo 2.....	25
3.1.2 Diagnóstico.....	25
3.1.3 Tratamento.....	27
3.2 HIPERTRIGLICERIDEMIA.....	29
3.2.1 Diagnóstico.....	30
3.2.2 Tratamento.....	31
3.3 RADICAIS LIVRES.....	32
3.3.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	34
3.4 ANTIOXIDANTES.....	36
3.5 SISTEMA DE DEFESA ENZIMÁTICO.....	36
3.5.1 SISTEMA DE DEFESA NÃO ENZIMÁTICO.....	39
3.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....	40
3.7 DANO LIPÍDICO.....	41
3.8 DANO PROTEICO.....	42
3.9 DANO AO DNA.....	43
3.10 PLANTAS MEDICINAIS.....	44
3.10.1 Família Myrtaceae.....	45
3.10.2 O gênero <i>Myrcia</i>	47
3.10.3 <i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC.....	47
4.0 METODOLOGIA.....	49
4.1 PREPARO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>M. splendens</i>	49
4.1.1 Obtenção do material vegetal.....	49
4.1.2 Preparo do extrato bruto.....	49

4.2 ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	49
4.3 ANIMAIS.....	51
4.3.1 INDUÇÃO DO DIABETES.....	51
4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	52
4.4.1 Preparo dos eritrócitos e do plasma.....	52
4.4.2 Preparo do soro.....	53
4.4.3 Preparo do órgão.....	53
4.5 Análise histológica.....	54
4.6 ESTUDOS BIOQUÍMICOS.....	54
4.6.1 DOSAGEM DE GLICOSE E TRIG.....	54
4.6.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS).....	54
4.6.3 Conteúdo Total de Sulfidrilas.....	55
4.6.4 Catalase (CAT).....	55
4.6.5 Glutathione Peroxidase (GSH-Px).....	55
4.6.6 Superóxido Dismutase (SOD).....	56
4.6.7 Conteúdo de Proteínas Carboniladas.....	56
4.6.8 Dosagem de Proteínas.....	57
4.7 Análise estatística.....	57
5 INTERDISCIPLINARIDADE.....	58
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	60
ARTIGO: HYPOLIPEMYANT, HYPOGLYCEMIANT AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF <i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC IN AN ANIMAL TYPE 2 DIABETES MODEL INDUCED BY STREPTOZOTOCIN.....	60

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....92

REFERÊNCIAS..... 94

1 INTRODUÇÃO

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica, e sua prevalência está aumentando no mundo. Segundo a OMS, desde 1980 o número de pessoas vivendo com diabetes quadruplicaram e alcançaram os 422 milhões em 2014, especialmente em países em desenvolvimento (TORRES, 2009). A diabetes é caracterizada por hiperglicemia persistente, resultado de um distúrbio na secreção ou na ação da insulina ou em ambos, que pode estar associado à obesidade, pressão alta, alteração nos níveis de colesterol e triglicerídeos e sedentarismo (CAMPOS, 2014; FERREIRA; MARQUES; MARIA *et al.*, 2014). A doença gera alto investimento nos cuidados com a saúde por parte do governo, sendo estimado um custo de mais de 827 bilhões de dólares por ano em todo o mundo (SEURING *et al.*, 2015). Durante a hiperglicemia persistente, ocorre um aumento da produção de radicais livres de oxigênio por meio da auto-oxidação da glicose, e esses radicais exercem seus efeitos citotóxicos nos fosfolípidos de membrana (MAZZANTI *et al.*, 2003).

A prevalência de diabetes mostra um aumento mundial e a maioria dos casos é de diabetes tipo 2 (DMII) (WALLENIUS; MALECKAS, 2015). A DMII ocorre devido à resistência à ação da insulina, associada a uma deficiência em sua secreção devido à destruição parcial das células β (SAÚDE, 2013). O tratamento da diabetes requer uma mudança na rotina do indivíduo, uma vez que a terapia médica ocorre em um segundo momento, quando existe a incapacidade de controlar os níveis glicêmicos, por meio de dieta equilibrada e atividades físicas, para minimizar o risco de cardiopatia, retinopatia, danos neuropático e renal, além de dislipidemia e estresse oxidativo (HOU *et al.*, 2018; NATHAN *et al.*, 2009; RAMOS; ARNAUD; FERREIRA, 2011).

Os tratamentos medicamentosos disponíveis atualmente para a diabetes incluem a administração de insulina e hipoglicemiantes orais, porém, é notável a busca dos pacientes por terapias alternativas, sendo que a maioria destas ainda não tem seu efeito e mecanismo elucidados (HASHEMPUR *et al.*, 2015).

Entre as opções médicas existentes para a terapia da diabetes, estão disponíveis a insulina e os agentes hipoglicemiantes orais, principalmente biguanidas, sulfonilureias, inibidores da dipeptidil peptidase 4, tiazolidinedionas,

agonistas do receptor GLP-1 e inibidores do co-transportador de sódio glicose-2 (SGLT2) (CALLIARI; FERNANDES, 2018; NATHAN *et al.*, 2009; RAMOS; ARNAUD; FERREIRA, 2011). As atuais diretrizes internacionais de tratamento (2018) recomendam o uso de metformina como tratamento inicial para pacientes com DMII. Se o controle glicêmico se mantiver inadequado, recomenda-se uma combinação de metformina com outra classe de antidiabéticos (SHESTAKOVA *et al.*, 2018).

A importância na descoberta de novas substâncias ativas obtidas de plantas muitas vezes não está só na questão do surgimento de um novo grupo de fármacos, mas também na identificação de novas possibilidades de intervenção farmacêutica. Muitas substâncias utilizadas para o tratamento da diabetes têm sido isoladas de plantas, demonstrando uma variedade de efeitos farmacológicos de diferentes espécies em modelos animais (RAFE, 2017).

Como se sabe, as plantas são utilizadas como fonte de tratamento há milhares de anos. Os primeiros registros de que a utilização como fonte medicinal datam da Mesopotâmia em 2600 a.C. (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006). Muitas espécies de plantas têm sido usadas etnofarmacologicamente ou experimentalmente para tratar os sintomas da DM e a pesquisa por novas opções de tratamento continua, pois as drogas sintéticas existentes apresentam limitações como falta de controle onde o fármaco irá agir (ARUMUGAM; MANJULA & PAARI, 2013; NEGRI, 2005).

A maioria das plantas que são utilizadas como antidiabéticas, os extratos vegetais aquosos e etanólicos ao serem avaliadas farmacologicamente demonstram ter atividade hipoglicemiante e antioxidante (NEGRI, 2005).

As espécies do gênero *Myrcia*, já foram utilizadas como hipoglicêmicas, de forma empírica, pela população (CERQUEIRA *et al.*, 2013; BATISTA *et al.*, 2011; BRITO & LAINETTI, 1996). Com a presença de triterpenos, esteróides, flavonoides e glicosídeos flavonoides, estes compostos apresentam atividades diferentes, sendo a inibição da aldose redutase e da alfa-glucosidase as mais relevantes (GOTTLIEB *et al.*, 1972; YOSHIKAWA *et al.*, 1998; FERREIRA *et al.*, 2006; MATSUDA *et al.*, 2002).

A produção de radicais livres é um processo fisiológico e constante que desempenha um importante papel metabólico, mas quando em desequilíbrio, seja pelo aumento na formação de radicais livres ou pela redução da atividade

dos sistemas antioxidantes, é prejudicial ao organismo e leva a um quadro de estresse oxidativo (BARREIROS; DAVID & DAVID, 2006; ENGERS; BEHLING & FRIZZO, 2011).

Diante destas informações observou-se que vários estudos envolvendo plantas demonstraram o potencial antioxidante dos flavonoides principalmente, sendo que a maioria dos quais é atribuída à miricitrina, um composto presente em algumas frações dos extratos (MORESCO *et al.*, 2014). Magina *et al.*, (2010) e Lima *et al.*, (2017), demonstraram a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de *Eugenia brasiliensis*, possivelmente devido ao conteúdo fenólico e flavonoides totais de extratos e frações de plantas.

Outro estudo realizado por Siebert *et al.* (2017), relatou a existência dos flavonoides quercetina, micetina, catequina, isoquercetina, rutina e galangina no extrato hidroalcoólico e a presença dos compostos catequina, isoquercetina, galangina e apigenina na fração de acetato de etila de *Eugenia brasiliensis* (SIEBERT *et al.*, 2017).

Baseado nestas circunstâncias tornam-se fundamentais estudos envolvendo modelos experimentais da diabetes que forneçam informações que possam auxiliar no progresso de procedimentos mais eficientes na prevenção e na terapêutica da doença (LEME *et al.*, 2010), sendo então o objetivo deste estudo verificar os efeitos da administração crônica do extrato de diclorometano (EDM) obtido das folhas de *Myrcia splendens* (Sw.) DC, nas alterações causadas pela DMII, induzidas pela administração de estreptozotocina e nicotinamida, na hiperglicemia, hipertrigliceridemia e estresse oxidativo no sangue e rim de ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral verificar os efeitos da administração crônica do Extrato diclorometano (EDM) das folhas da espécie *M.splendens* sobre as alterações provocadas pela DM tipo 2 induzidas pela administração de estreptozotocina, respectivamente, no estresse oxidativo e hiperglicemia em sangue e rins de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1). Verificar o efeito da hiperglicemia induzida pela estreptozotocina sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas e em plasma de ratos de 60 dias de idade;
- 2). Avaliar o efeito da hiperglicemia induzida pela estreptozotocina sobre a atividade das enzimas antioxidantes (catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos de ratos de 60 dias de idade;
- 3). Observar o efeito da hiperglicemia induzida pela estreptozotocina sobre o TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e em rins de ratos de 60 dias de idade;
- 4). Verificar o efeito da hiperglicemia induzida pela estreptozotocina sobre a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, GSH-Px e SOD) em rins de ratos de 60 dias de idade;
- 5). Analisar a ação hipoglicemiante do EDM (25, 50, 100 e 200mg/kg) das folhas da espécie *Myrcia splendens* por meio da dosagem de glicose plasmática;
- 6). Verificar a influência da administração crônica do EDM (25, 50, 100 e 200mg/kg) das folhas da espécie *Myrcia splendens* sobre os efeitos causados pela hiperglicemia sobre os níveis de TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e proteínas carboniladas em plasma e rins de ratos;
- 7). Observar a influência da administração crônica do EDM (25, 50, 100 e 200mg/kg) das folhas da espécie *Myrcia splendens* sobre os efeitos causados

pela hiperglicemia sobre a atividade das enzimas CAT, GSH-Px e SOD em eritrócitos e rins de ratos;

8). Quantificar as células β pancreáticas dos ratos normais e diabéticos por meio de análise histológica;

9). Identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes no EDM com melhor atividade antioxidante, hipoglicemiante e hipolipemiante.

3 REVISÃO

3.1 Diabetes

A Diabetes Mellitus (DM) é um grande problema de saúde no mundo atual em que a incidência vem aumentando exponencialmente. Em 2013, mais de 382 milhões de pessoas foram vítimas da diabetes (KHAZAEI *et al.*, 2016).

A DM pode ser compreendida como uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia sanguínea resultante de uma diminuição total ou parcial na secreção ou na ação da insulina ou ambos (FERREIRA; MARQUES & CAMPOS, 2014; MARIA *et al.*, 2014).

Esta doença tem sido classificada como uma epidemia e como um dos maiores problemas de saúde a ser resolvido em todo mundo. Pesquisas epidemiológicas evidenciam que a prevalência e a incidência de diabetes no Brasil têm crescido a cada ano. Estima-se que existam 12 milhões de indivíduos convivendo com diabetes no Brasil desde 2014 (FERREIRA; MARQUES & CAMPOS, 2014; RAMOS; ARNAUD & FERREIRA, 2011). A prevalência da diabetes demonstra um aumento mundial, compreendendo os países desenvolvidos e os países em desenvolvimento, e a maior parte dos casos é de Diabetes Mellitus tipo 2 (DMII), o que está fortemente associado a falta de atividade física e a obesidade (WALLENIUS & MALECKAS, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a hiperglicemia é o terceiro maior fator da causa de mortalidade prematura, superada apenas por hipertensão e uso de tabaco (CALLIARI & FERNANDES, 2018).

Considerando que a DMII já foi uma raridade em pessoas no passado, nos dias atuais esta condição está aumentando, sendo diagnosticados em crianças, adolescentes e adultos. É importante ressaltar que a taxa de mortalidade em adultos jovens com DMII é tão alta quanto a maioria das doenças cardiovasculares (GULSIN *et al.*, 2018). Diante desta realidade, esta doença gera altos investimentos nos cuidados com a saúde por parte do governo, sendo estimado um custo de mais de 827 bilhões de dólares por ano em todo o mundo (WHO ORGANIZATION, 2016).

3.1.1 Diabetes Mellitus tipo 2

Existem duas formas principais de diabetes. A Diabetes Mellitus tipo 1 (DMI), resultante de uma deficiência na secreção de insulina devido a uma questão autoimune que causa a destruição total das células β pancreáticas, ocasionando deficiência completa na produção de insulina (CALLIARI & FERNANDES, 2018; WALLENIUS & MALECKAS, 2015); e a DMII, em que existe uma resistência à ação da insulina, associada a uma deficiência em sua secreção devido a uma destruição parcial das células β , a qual é menos intensa do que o observado na DMI (SAÚDE, 2013).

A DMII é a doença endócrina mais disseminada e um dos problemas médicos e sociais mais agudos, pois leva à incapacidade precoce e ao aumento da mortalidade por diferentes complicações, sendo responsável por mais de 90% dos casos (FERREIRA; MARQUES & CAMPOS, 2014; WALLENIUS & MALECKAS, 2015). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, 11% da população (cerca de 5 milhões de pessoas) acima de 40 anos são portadores de DMII (TORRES; PACE & STRADIOTO, 2010).

3.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico de diabetes ocorre quando os níveis glicêmicos estão acima de 126 mg/dl (BRASILEIRA, 2018). O teste é realizado em amostra de sangue obtida após um período de jejum de 8 a 12 horas. Também é possível identificar a diabetes por meio do teste de hemoglobina glicada, o qual pode ser realizado na ausência de jejum. Este exame representa a média da concentração de glicose no sangue nas últimas semanas, ao invés do teste de glicose feito em jejum que indica os níveis glicêmicos naquele momento (FORBES & COOPER, 2013; WHO ORGANIZATION, 2016).

Em algumas circunstâncias, a diferenciação entre a DMI e a DMII pode ser mais complicada. Quando ocorrer a indefinição do diagnóstico, podem ser solicitados níveis de anticorpos anti-GAG e avaliação da reserva de insulina pancreática por meio da medida de peptídeo-C plasmático (MARASCHIN *et al.*, 2010). No caso de suspeita de DMII é preconizado um rastreio levando em conta fatores de risco para confirmação do diagnóstico como: indivíduos com idade >

45 anos, indivíduos com sobrepeso ou obesidade e que apresentem mais um fator de risco para DM dentre os seguintes: Pré-diabetes, história familiar de DM, raça/etnia de alto risco para DM, mulheres com diagnóstico prévio de Diabetes Mellitus Gestacional (DMG), história de doença cardiovascular, hipertensão arterial, HDL < 35 mg/dL e/ou triglicérides > 250 mg/dL e sedentarismo (CALLIARI & FERNANDES, 2018).

Esta doença, se não tratada de forma correta, em longo prazo, pode levar o indivíduo a manifestar complicações crônicas irreversíveis, como disfunção e falência de órgãos, podendo comprometer a função dos rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos, resultando em doenças como a neuropatia, a nefropatia, a retinopatia, o infarto do miocárdio, acidentes vasculares e infecções (RAMOS; ARNAUD & FERREIRA, 2011).

A DMII é uma doença multifatorial, como sua patogênese é caracterizada por disfunção das células β acompanhada por diminuição da secreção de insulina, há também o aumento da secreção de glucagon, resposta diminuída às incretinas, aumento da produção de glicose hepática, redução da absorção de glicose pelos músculos e disfunções nos neurotransmissores (SIKHAYEVA *et al.*, 2017). Ocorre também um aumento na produção de radicais livres e estresse oxidativo que está envolvida na patogênese e nas complicações da diabetes (KHAZAEI *et al.*, 2016).

Além disso, o aumento do nível de estresse oxidativo está correlacionado também com a predisposição à hiperatividade plaquetária, o que aumenta o risco de doença cardiovascular na DMII (KARKABOUNAS *et al.*, 2018). A hiperglicemia persistente causa aumento na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Quando em níveis fisiológicos, esta produção é neutralizada pelo sistema de defesa antioxidante celular, porém quando a homeostase é rompida, se instala o estresse oxidativo e o desencadeamento das complicações diabéticas (WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005; BAYNES, 1991).

3.1.3 Tratamento

O tratamento da diabetes envolve mudanças no estilo de vida dos pacientes. Cuidados com a auto monitoração da glicemia, a prática regular de atividade física, a administração de medicamentos e a adoção de uma alimentação saudável são importantes para manter os níveis glicêmicos estabilizados e, conseqüentemente, prevenir as complicações crônicas (RAMOS; ARNAUD & FERREIRA, 2011).

Os cuidados em relação à diabetes são bastante minuciosos, porque requer uma mudança na rotina diária deste indivíduo, o qual passa a necessitar de alimentação equilibrada, realização de exercícios físicos e de terapia medicamentosa. Idealmente, no tratamento da DMII é preciso tentar alcançar níveis glicêmicos tão próximos da normalidade quanto é possível alcançar na prática clínica (CALLIARI & FERNANDES, 2018).

Para sintetizar, os antidiabéticos de forma geral são classificados em quatro categorias: os que aumentam a secreção de insulina (hipoglicemiantes), os que não a aumentam (anti-hiperglicemiantes), os que aumentam a secreção de insulina de maneira dependente da glicose, além de promover a supressão do glucagon e os que promovem glicosúria (sem relação com a secreção de insulina) (CALLIARI & FERNANDES, 2018).

Entre as opções medicamentosas existentes para a terapia da diabetes, estão disponíveis a insulina e os hipoglicemiantes orais (NATHAN *et al.*, 2009; RAMOS; ARNAUD & FERREIRA, 2011). As atuais diretrizes internacionais de tratamento propõem o uso de metformina como tratamento de primeiro momento em pacientes com DMII. Se o controle da glicemia permanecer inadequado, recomenda-se uma combinação de metformina e uma das seguintes classes de antidiabéticos: sulfonilureias, inibidores da dipeptidil peptidase 4, tiazolidinedionas, agonistas do receptor GLP-1 ou inibidores do co-transportador sódio glicose-2 (SGLT2), no túbulo proximal (SHESTAKOVA *et al.*, 2018).

Apesar do progresso considerável no tratamento da diabetes por agentes hipoglicemiantes orais, a busca por novos fármacos continua em decorrência de limitações das drogas sintéticas. Os fármacos fitoterápicos com atividade antidiabética ainda não foram comercialmente formulados como medicamentos modernos, embora tenham sido aclamados por suas propriedades terapêuticas

nos sistemas tradicionais de medicina (ARUMUGAM; MANJULA & PAARI, 2013).

No estudo de Jayprasad e colaboradores (2016), observou-se um aumento significativo da insulina no final do período de tratamento e diminuição no nível de glicose sanguínea a partir do 15º dia de tratamento em ratos diabéticos com extrato aquoso e metanólico de casca de *Chloroxylon swieteniae* glibenclamida.

Outro estudo realizado por Kishalay e colaboradores (2015), demonstrou-se que a fração acetato de etila da semente de *Eugeniajambolana* possui grande atividade antidiabética em um modelo experimental realizado em ratos. Os resultados demonstram que o extrato mostra atividade antidiabética por meio da inibição direta da carga intestinal de glicose, atividade insulínica e também correção na via metabólica de carboidratos após inibição do processo de apoptose induzida por hiperglicemia (JANA; BERA & GHOSH, 2015).

Novos benefícios têm sido descobertos, até mesmo nos medicamentos que já são usados para diabetes há muito tempo, como a metformina. Estudos recentes evidenciaram que a metformina pode ter efeito hepatoprotetor por exercer função antioxidante juntamente com sua ação hipoglicemiante já esperado (MAGINA *et al.*, 2010).

Existem evidências de estudos em que extratos vegetais aquosos e etanólicos exerceram efeito hipoglicemiante mais acentuado do que a glibenclamida. O extrato aquoso de *Syzygium alternifolium* (Myrtaceae) apresentou excelente efeito hipoglicemiante tanto nos ratos normais, quanto nos ratos que tiveram a diabetes induzido por aloxano (NEGRI, 2005).

Os tratamentos para a diabetes de um modo geral geram custos que variam de 2,5 a 15% dos gastos nacionais em saúde, causando impacto social e econômico, tanto em termos de produtividade (relacionado a faltas ao trabalho), quanto de altos custos com a hospitalização, dependendo da prevalência local de diabetes e da complexidade do tratamento disponível. Portanto, a prevenção da diabetes e das complicações é a prioridade de saúde pública devido à grande morbimortalidade associada (CALLIARI & FERNANDES, 2018; RAMOS; ARNAUD & FERREIRA, 2011).

3.2 Hipertrigliceridemia

As funções desempenhadas pelos lipídios nas células são muito grandes, sendo eles responsáveis pela produção de ácidos biliares, formação de membrana, hormônios esteroides e fornecimento e armazenamento de energia (RUSCH *et al.*, 2018).

A Hipertrigliceridemia (HTG), decorrente dos níveis aumentados de triglicerídeos (TGs) no sangue, pode ser causada por fatores genéticos, pela deficiência da lipase lipoproteica, HTG familiar ou hiperlipidemia familiar combinada, ou mesmo em resposta secundária a outras doenças como hipotireoidismo, alcoolismo, diabetes mellitus, doenças renais, ou em associação a fatores ambientais que prejudicam a produção e depuração das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (HEGELE, 2009; HEGELE *et al.*, 2014; RUSCH *et al.*, 2018).

O colesterol exerce a função de ser o precursor dos hormônios esteroidais, dos ácidos biliares e da vitamina D. Os TGs são armazenados no tecido adiposo e muscular como reserva energética, possuindo forma endógena quando originados do fígado e forma exógena, quando oriundos da dieta (BRASILEIRA, 2013). Os TGs são formados a partir de três moléculas de ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol. São transportados em quilomícrons e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) que são sintetizadas no intestino e fígado, respectivamente. Também corresponde em torno de 10% da lipoproteína de densidade baixa (LDL). A lipólise destas lipoproteínas ricas em TGs pela enzima lipase lipoproteica, resulta na formação de partículas remanescentes menores enriquecidas de ésteres de colesterol (DALLINGA-THIE *et al.*, 2010; MOTTA, 2009; NELSON & COX, 2011).

O correto conhecimento do metabolismo dos TGs é crucial para identificar o momento em que intervenção à HTG deve ser realizada, buscando a prevenção de danos posteriores ao organismo (VALAIYAPATHI; SUNIL & ASHRAF, 2019).

A HTG é resultante do aumento das lipoproteínas circulantes de TG, ou seja, VLDL plasmática e quilomícrons (VALAIYAPATHI; SUNIL & ASHRAF, 2019). O acúmulo de TGs no fígado pode resultar em uma esteatose hepática não alcoólica, e conseguinte lesão do tecido, pela inflamação e danos oxidativos,

podendo chegar a falência do órgão (CHOIA & DIEHLA, 2008; PAGANO *et al.*, 2002; REAVEN, 1993).

Pesquisas mostram que anormalidades metabólicas como obesidade, dislipidemias e o aumento da resistência à insulina são as causas mais comuns de deposição de gordura hepática (CHOIA & DIEHLA, 2008; PAGANO *et al.*, 2002; REAVEN, 1993).

Pesquisas recentes sobre a HTG despertaram atenção redobrada nos últimos anos, pela correlação entre os altos níveis de TG e o aumento do risco de morbidade e mortalidade nas doenças cardíacas, podendo o TG ser um marcador de risco aterosclerótico ou um fator de risco causal para aterosclerose. Além disso, a HTG e o baixo nível de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) têm sido associados com síndrome metabólica e DMII (BUDOFF, 2016; CHARNG *et al.*, 2017; WIESNER & WATSON, 2017).

De acordo com Budoff (2016), as evidências indicam que os TGs e as lipoproteínas ricas em triglicerídeos (LRTs) estão na rota causal da doença cardiovascular aterosclerótica (ASCVD), sugerindo que desempenham um papel patogênico na aterosclerose, em vez de somente serem considerados como um biomarcador da doença risco.

Também existem evidências de que níveis muito altos de TGs estão relacionados a um risco aumentado de pancreatite aguda e demandam atenção e cuidado (SIMONS, 2019).

3.2.1 Diagnóstico

A dosagem de TGs é feita por técnica enzimática utilizando um método bastante preciso e de baixo custo. Níveis aumentados de TGs geralmente estão vinculados a baixos níveis de HDL-C e altos níveis de partículas de LDL pequenas e densas (BRASILEIRA, 2013; CHARNG *et al.*, 2017).

A coleta de sangue é realizada após jejum de 12 horas para dosagem das concentrações de TGs. A determinação do perfil lipídico deve ser feita em indivíduos com dieta habitual, estado metabólico e peso estável, por pelo menos duas semanas antes da realização do exame. O aumento da concentração

plasmática de TGs considera também a idade e sexo (BRASILEIRA, 2013; RUSCH *et al.*, 2018).

Nas diretrizes aplicadas para adultos, a HTG pode ser considerada leve a limítrofe (150-199 mg / dL), moderada a alta (200-499 mg / dL), muito alta (500–999 mg / dL), grave (1.000–1999 mg / dL) e muito grave (> 2.000 mg / dL). Existem estudos que evidenciam que a HTG não é uma realidade presente somente para os adultos, uma vez que nos EUA 10% das crianças e adolescentes entre 12 e 19 anos de idade têm níveis séricos de TGs superiores a 150 mg / DL, paralelo a isto aparece o aumento da incidência de obesidade infantil, síndrome metabólica, DMII, estilo de vida sedentário, dieta hiperlipídica e rica em carboidratos e uso de medicação (BRASILEIRA, 2015; VALAIYAPATHI; SUNIL & ASHRAF, 2019).

3.2.2 Tratamento

Os padrões séricos de TGs se elevam em consequência do consumo elevado de calorias e em particular pela ingestão de colesterol, ácidos graxos saturados, ácidos graxos trans e carboidratos (BRASILEIRA, 2013). Desta forma, a mudança no estilo de vida, com inserção de atividade física, restrição na ingestão de carboidratos, monossacarídeos e dissacarídeos na dieta, pode diminuir os TGs, além de possibilitar aumento do HDL-C com a redução da gordura trans e dos carboidratos na dieta (HARNG *et al.*, 2017; SAHEBKAR *et al.*, 2014).

Quando as estratégias de mudança alimentar e a realização de atividade física regular não são suficientes, podem ser associadas diversas opções medicamentosas que irão auxiliar na redução da HTG, como por exemplo, os fibratos, as estatinas e a niacina, embora em pacientes com TGs moderadamente alto, as estatinas sejam constantemente prescritas como terapia de primeira linha (BACKES *et al.*, 2016; HARNG *et al.*, 2017; SAHEBKAR *et al.*, 2014).

Embora as estatinas visem principalmente reduzir o LDL-C elevado, em pacientes com altos níveis basais de TGs (≥ 273 mg / dL), algumas estatinas de alta intensidade mostraram reduzir os TGs em até 43% (BACKES *et al.*, 2016).

Outra alternativa disponível no mercado é a utilização de ômega-3, sendo inserido em um segundo momento como adjuvante no tratamentos para reduzir os níveis de TGs em pacientes adultos com HTG grave (≥ 500 mg / dL)(KEDIA & LYNCH, 2015). Porém Kedia e colaboradores (2015), cita em seu estudo que os ésteres etílicos ômega-3 aumentam os níveis de LDL-C em cerca de 49%, em comparação com placebo, em pacientes com níveis de TGs ≥ 500 mg / dL; portanto, os níveis de LDL-C devem ser acompanhados periodicamente durante o tratamento (KEDIA & LYNCH, 2015).

A Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2017) também informa que a terapia com ômega 3 em altas doses (4 a 10g ao dia) reduz os TGs e aumenta discretamente o HDL-C, podendo, entretanto, aumentar o LDL-C.

Pesquisas evidenciam que o uso de antioxidantes também é satisfatório, uma vez que o estresse oxidativo está presente na lesão hepática e podem atuar de maneira benéfica e prevenir os danos oxidativos, embora ainda sejam necessários mais estudos para estabelecer critérios de utilização (LI *et al.*, 2015; PEREIRA, BARROS & FERREIRA, 2016).

3.3 Radicais Livres

Os radicais livres (RLs) são considerados uma das principais causas do envelhecimento e doenças. No entanto, quando mantidas em concentrações baixas ou moderadas, os RLs desempenham vários papéis benéficos para o organismo, sendo eles necessários para sintetizar algumas estruturas celulares e usados pelo sistema de defesa do hospedeiro para lutar contra patógenos, desempenhando um papel fundamental para o funcionamento adequado do organismo dos seres vivos (MARTELLI, 2015; VALKO *et al.*, 2006).

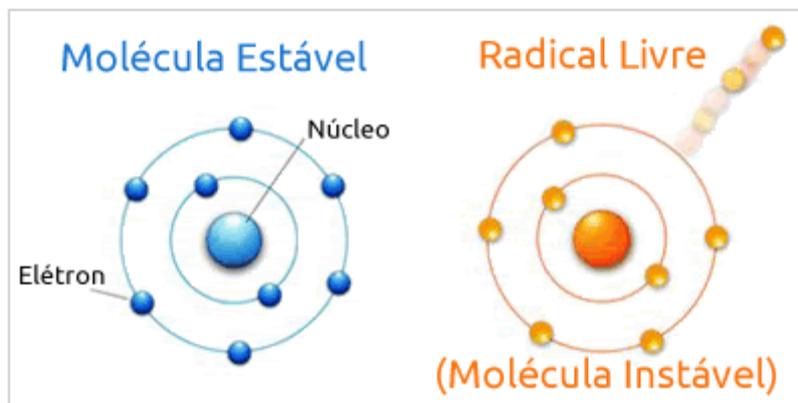
No entanto, quando produzidos em grande quantidade, estão envolvidos no desenvolvimento de diversas patologias e processos fisiopatológicos como envelhecimento, aterosclerose (KAYAMA *et al.*, 2015), obesidade (KEANEY, 2003) e inflamação (HO *et al.*, 2015).

Os RLs são caracterizados como átomos ou moléculas muito instáveis, sendo espécies químicas que apresentam um ou mais elétrons não pareados na

última camada de valência (Figura 1). São formados em circunstância de reações de óxido-redução, ou seja, ou doa o elétron solitário, oxidando-se, ou obtém outro elétron, reduzindo-se (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; BARREIROS & BARROS, 2012). Quando um radical livre não encontra outro para se ligar a fim de atingir estabilidade, obtém elétrons de outros compostos como carboidratos, lipídeos, proteínas e até do DNA, estabilizando-se e dando origem a outros radicais livres, desencadeando uma reação em cadeia com dano celular, caso não ocorra intervenção dos antioxidantes (DAVID, 2005; DOBRAKOWSKI *et al.*, 2016; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NEDEL, 2005; SHING *et al.*, 2007).

Destacando este ponto, pode-se ressaltar que a produção de RLs se dá tanto em processos fisiológicos e não fisiológicos como na respiração celular para produzir energia, na sinalização intercelular, no metabolismo de carboidratos, no estímulo e regulação do crescimento celular e nos processos de defesa do organismo, por meio da fagocitose. No processo de produção não fisiológica pode ocorrer por fatores como raios solares, atividade física, alimentação rica em gordura, consumo de álcool e cigarro, entre outros (MADIGAN *et al.*, 2010).

Figura 1- Formação do Radical Livre partindo de uma molécula estável para uma molécula instável.



Fonte: (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

3.3.1 Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio

Os elétrons desemparelhados centrados nos átomos de oxigênio e nitrogênio são denominados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), respectivamente (BARREIROS & DAVID, 2005). O termo ERO caracteriza o coletivo que engloba além dos RLs, outras substâncias provenientes do O_2 , que não contém elétrons desemparelhados, porém também apresentam particularidades quimicamente reativas (BRONCANO *et al.*, 2009).

A geração das ERO, na maior parte das vezes acontece nas mitocôndrias, no curso de condições fisiológicas e patológicas, durante o metabolismo aeróbico, por meio do estímulo da cadeia transportadora de elétrons, para a formação de ATP. Ao término da cadeia de transporte de elétrons, 95% a 98% do O_2 é convertido em água e os 2% a 5% reduzem-se em metabólitos que são os chamados ERO e ERN (HALLIWELL, 2013).

Dentre a gama de ERO existente, destacam-se: o radical superóxido (O_2^\bullet), que é produzido a partir da primeira redução do O_2 , e ocorre em praticamente todas as células aeróbicas; o radical hidroperoxila (HO_2), o qual é o (O_2^-) com um próton de hidrogênio acoplado, apresentam facilidade em iniciar a destruição

de membranas biológicas e o radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$), considerado o mais reativo em sistemas biológicos, reagindo com bases do DNA, diversas proteínas e membranas lipídicas (HALLIWELL, 2013).

Com relação à cadeia transportadora de elétrons, o O_2 sofre redução tetravalente com a adição de quatro elétrons, o que resulta na produção de água. Porém, uma pequena parcela sofre redução parcial, causando a formação de intermediários reativos, como os radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroperoxila (HO_2), hidroxila ($\text{OH}\bullet$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL, 2013).

Embora estas organelas tenham uma capacidade de eliminação intrínseca de ERO, é importante observar que não são suficientes para atender à necessidade celular de detoxificar todas as ERO produzidas pelas mitocôndrias (DORMANDY, 1983; NORDBERG *et al.*, 2001; NELSON & COX, 2008).

A produção de ERO depende basicamente de reações enzimáticas e não enzimáticas. Reações enzimáticas capazes de gerar ERO são aquelas envolvidas na cadeia respiratória, síntese de prostaglandinas, fagocitose e sistema do citocromo P450. Os RLs podem ser produzidos também a partir de reações não enzimáticas que ocorrem entre o O_2 e compostos orgânicos, os quais se iniciam por radiações ionizantes, e durante a fosforilação oxidativa mitocondrial (PHAM-HUY *et al.*, 2008).

Em resumo, quando as ERO e ERN se encontram em concentrações baixas e controladas, exercem um resultado positivo sobre as respostas celulares e função imunológica. Porém, quando há um aumento, eles provocam o estresse oxidativo, um processo deletério que pode causar prejuízos em todas as estruturas celulares (YOUNG & WOODSIDE, 2001).

Com relação as ERO não-radicalares, pode-se destacar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que embora não seja radicalar, é descrito como uma espécie altamente deletéria, pois participa da reação que produz o $\text{OH}\bullet$ e o oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$), que é a forma mais prejudicial do oxigênio no organismo, encontra-se em estado excitado, de maior energia do que o O_2 no estado fundamental, e é a causa ou intermediário da toxicidade fotoinduzida do O_2 em seres vivos (BARREIROS *et al.*, 2006; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; KEHRER & KLOTZ, 2015).

Dentre as ERN, podem-se ressaltar os principais sendo: o óxido nítrico (NO) que é um radical importante para o aprendizado e memória, indispensável

para a plasticidade sináptica, apresentando papel fundamental no processo de vasodilatação e regulação vascular, no entanto sua produção irregular está atrelada a um alto índice de doenças e prejuízos ao organismo. O peroxinitrito(ONOO^-), é uma ERN não-radicalar originada a partir da reação do NO com o O_2^- . É um forte oxidante e, além de sua toxicidade direta, ele pode ser decomposto em outras moléculas nocivas, como o OH^\bullet .

Na atualidade são destacados 11 ERN, os radicalares (ON e dióxido de nitrogênio) e os demais que são os não radicalares (ADAMS *et al.*, 2015; KEHRER & KLOTZ, 2015).

3.4 Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser estabelecidos como elementos que, quando presentes em pequenas concentrações, comparados com o substrato oxidável, impossibilitam ou retarda de forma significativa a oxidação deste substrato. No entanto, os antioxidantes podem também ser definidos como “qualquer substância que retarda, previne ou remova o dano oxidativo” (HALLIWELL, 2007). Khlebnikov e colaboradores (2007) também definiram antioxidantes como “qualquer substância que atue eliminando de forma direta as ERO ou de forma indireta, regulando a ação eficaz das defesas antioxidantes, impossibilitando a produção de ERO”.

Os antioxidantes também apresentam outra função, a eficiência em capturar o radical e criar um novo radical estabilizado, por meio da ligação de hidrogênio intramolecular em oxidação adicional (HALLIWELL, 1990).

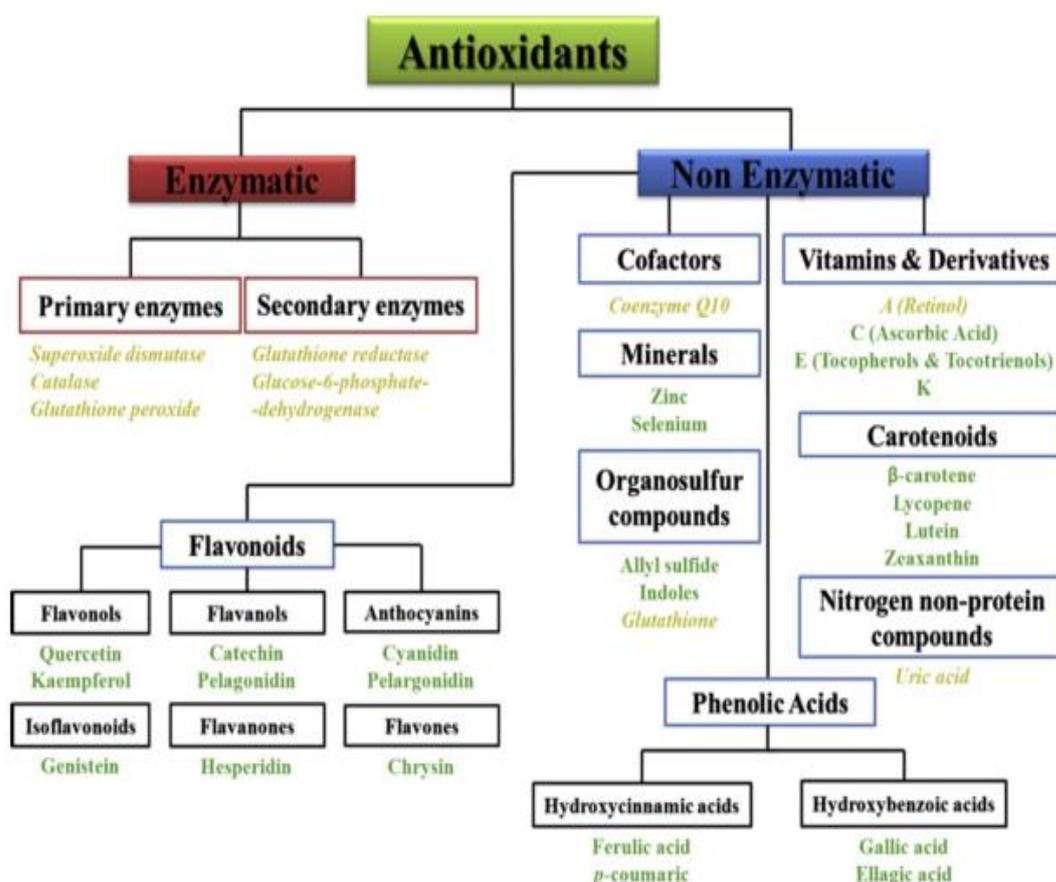
A produção de RLs é controlada por meio de uma forma de defesa eficiente que procura manter a produção de RLs em níveis fisiológicos, com o intuito de deter lesões celulares, e reparar, fazendo a recuperação das células danificadas (PIZZINO *et al.*, 2017).

Este sistema está baseado nos recursos antioxidantes existentes, que são formados por enzimas altamente eficazes, sendo elas, a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e por numerosas moléculas endógenas antioxidantes como a glutathione (GSH) e cisteína, e

suplementos antioxidantes como o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E), além de outros que podem ser observados na Figura 2.

Os antioxidantes são produzidos endogenamente, mas podem também ser obtidos por meio da ingestão, quando há uma dieta abundante em verduras, frutas, chás e chocolate, por exemplo. Este mecanismo regulador recebe o nome de sistema de defesa antioxidante, podendo ser dividido em sistema enzimática e não-enzimática, como pode-se observar na Figura 2 (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; YOSHIHARA; FUJIWARA & SUZUKI, 2010).

Figura 2 – Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.



Fonte: (CAROCHO & FERREIRA, 2012)

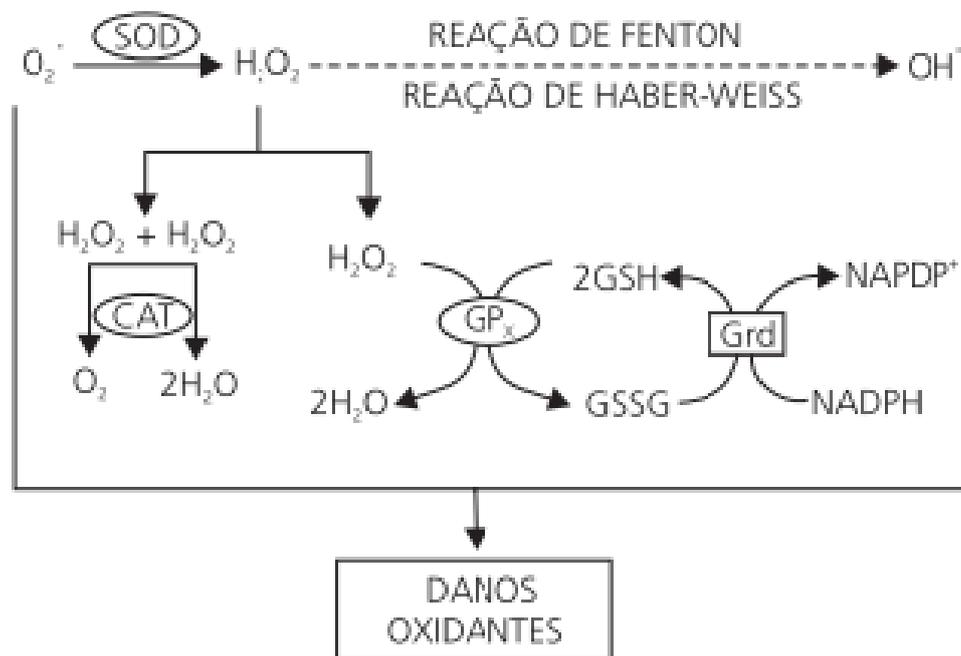
3.5 Sistema de defesa Enzimático

O sistema de defesa enzimático é composto pelas enzimas SOD, CAT e GSH-Px. Atuam como mecanismos de prevenção, evitando a produção de radicais e não radicais que iriam, sem a interferência destas iniciar as reações em cadeia que resultariam no dano oxidativo (BARRA *et al.*, 2010; VALKO *et al.*, 2006).

As enzimas CAT e GSH-Px agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de H₂O₂. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que esta espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber Weiss (Figura 3), mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical OH•, o qual não tem um sistema enzimático de defesa (BARRA *et al.*, 2010). A SOD está envolvida na reação de dismutação, catalisando a geração de H₂O₂ a partir do radical superóxido (BARRA *et al.*, 2010; VALKO *et al.*, 2006).

As enzimas CAT e GSH-Px se unem para impossibilitar o acúmulo de H₂O₂, que embora não seja um radical livre, tem as mesmas características reativas e alto poder de provocar danos. A GSH-Px reduz o H₂O₂ em água, mediante a conversão da glutathiona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), deste modo é muito importante a ação da glutathiona redutase (GRd), (responsável pela regeneração da GSH), dando a possibilidade para o equilíbrio ideal entre os sistemas de defesa enzimáticos (BARRA *et al.*, 2010; VALKO *et al.*, 2006).

Figura 3 – Reação de FENTON e HABER-WEISS



Fonte: (BARRA *et al.*, 2010).

3.5.1 Sistema não-enzimático

Em contrapartida, o sistema de defesa não-enzimático é constituído por compostos que são sintetizados endogenamente, como exemplo a bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q (CoQ) e ácido úrico que são destacados como antioxidantes biológicos de baixo peso molecular (SCHNEIDER & DE OLIVEIRA, 2004). Além disso, este sistema inclui os compostos antioxidantes de fonte dietética, dentre os quais pode-se citar as vitaminas, minerais e compostos fenólicos (BARREIROS & DAVID, 2006; KEHRER & KLOTZ, 2015).

O ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes (BARRA *et al.*, 2010). Estes compostos não enzimáticos agem doando hidrogênio e elétrons, reduzindo metais de transição, desativando o

oxigênio *singlet*, sequestrando os radicais peroxila, recuperando cofatores envolvidos nas reações de redução e oxidação (REDOX), atuando diretamente nas membranas, preservando-a dos danos originados pelos radicais nos lipídeos, proteínas e no DNA (BARREIROS & DAVID, 2006; KEHRER & KLOTZ, 2015).

A vitamina C é um micronutriente que é, por excelência, um antioxidante em potencial, solúvel em água e vastamente difundido em todos os tecidos do corpo. Atua como co-fator em reações enzimáticas como também tem a função de reciclar outros antioxidantes como a vitamina E e a GSH. No entanto, ela também pode funcionar como um pró-oxidante na presença de íons de metais de transição. Sua importância nas defesas antioxidantes celulares, quando presente em níveis fisiológicos, permanece incerta (BARRA *et al.*, 2010; HALLIWELL, 2013).

3.6 Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo (EO) é o termo utilizado para descrever os danos resultantes causados pelas ERO nas moléculas ou no organismo como um todo (VALKO *et al.*, 2006). A formação de ERO pode ocorrer por meio da geração do subproduto do metabolismo celular e também por estímulos ambientais como a poluição do ar, ingestão aumentada de sódio, exposição a metais pesados, uso de herbicidas e inseticidas, radiação UV, e temperaturas elevadas, tendo como consequência o EO (YOSHIHARA; FUJIWARA & SUZUKI, 2010).

O EO ocorre devido a um desequilíbrio entre a formação de RLs e as defesas antioxidantes. Está fortemente ligado a geração de danos estruturais, devido ao ataque de uma infinidade de biomoléculas como os lipídeos, proteínas, carboidratos, DNA e Ácido Ribonucleico (RNA) (MCINTYRE & HAZEN, 2010; SIES, 1986; YOSHIHARA; FUJIWARA & SUZUKI, 2010).

Estes danos têm sido associados a diversas patologias, como o envelhecimento, tumores, inflamação, doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos (MCINTYRE & HAZEN, 2010; SIES, 1986; YOSHIHARA; FUJIWARA & SUZUKI, 2010). Desta forma, o EO é citado como coadjuvante em uma ampla variedade de doenças, estando envolvido na fisiopatologia de em

alguns erros inatos do metabolismo intermediário (COLOME *et al.*, 2000; DELWING *et al.*, 2005; DELWING *et al.*, 2006; DELWING *et al.*, 2007; WAJNER *et al.*, 2004). A causa do estresse oxidativo aumentado entre estas diversas patologias citadas não está completamente elucidada, todavia pode haver uma ligação com o acúmulo de metabolitos tóxicos que provocam a produção excessiva de radicais livres ou a depleção celular de defesas antioxidantes (ARTUCH *et al.*, 2004; VAN BACKEL *et al.*, 2000).

3.7 Dano Lipídico

O dano lipídico ocorre por consequência das membranas plasmáticas serem as estruturas alvos dos ataques dos RLs, sendo passíveis à peroxidação lipídica, que por consequência altera sua estrutura, causando uma diminuição na sinalização transmembranar e na seletividade do transporte iônico. Estas alterações têm como consequência prejuízo no transporte celular, e a formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído, utilizado como biomarcador que, em altos níveis, têm potencial lesivo (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; SILVA & FERRARI, 2011).

Há duas ERO com potencial de afetar estes lipídeos de membrana, o $\text{OH}\cdot$ e o $\text{HO}_2\cdot$ enquanto o $\text{OH}\cdot$ deve sua toxicidade à sua não-especificidade de ataque a biomoléculas, o $\text{HO}_2\cdot$ muito alto atua intensamente na peroxidação lipídica, a qual ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação, conforme ilustra a Figura 4, processo pelo qual ácidos graxos poli-insaturados, glicolipídios, fosfolipídios e colesterol são oxidados, podendo levar à morte celular (AYALA; MUÑOZ & ARGÜELLES, 2014).

Figura 4- Etapas da Peroxidação Lipídica

$LH + OH^\bullet \text{ (ou } LO^\bullet) \longrightarrow L^\bullet + H_2O \text{ (ou } LOH)$	Iniciação
$L^\bullet + O_2 \longrightarrow LOO^\bullet$	propagação
$LH + LOO^\bullet \longrightarrow L^\bullet + LOOH$	propagação
$LOO^\bullet + L^\bullet \longrightarrow LOOL$	terminação
$LOO^\bullet + LOO^\bullet \longrightarrow LOOL + O_2$	terminação

Fonte: (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

3.8 Dano Proteico

A estrutura primária das proteínas é formada por sequências específicas de aminoácidos, apresentando função importante no organismo dos seres humanos. Mudanças na cadeia polipeptídica das proteínas pode desencadear a desnaturação protéica e interrupção da sua funcionalidade (NELSON & COX, 2011).

O mecanismo oxidativo causado pelas ERO provoca modificações físicas nas proteínas e sua fragmentação, agregação e suscetibilidade à degradação por proteossomos e proteases multicatalíticas (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; SILVA & FERRARI, 2011). Outro fato importante é que as ERO impedem a correção do RNA transportador, podendo ocasionar síntese proteica anômala (NELSON & COX, 2014; SILVA & FERRARI, 2011).

De acordo com a literatura, a agregação proteica ocorre essencialmente por meio da atividade oxidativa do radical OH^\bullet , responsável por construir ligações cruzadas entre as proteínas e favorecer a degradação pela formação de proteínas anômalas, facilitando sua remoção pelos proteossomos (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005). Além disso, as cadeias laterais de todos os resíduos de aminoácidos das proteínas estão susceptíveis à oxidação por radiação ionizante. Os resíduos de aminoácidos que são mais susceptíveis ao

ataque de várias ERO e ERN e seus produtos são ilustrados na Figura 5 (STADTMAN, 2004).

Figura 5 - Modificações de resíduos de aminoácidos

Amino acid residue	Products formed
Arginine	Glutamic semialdehyde
Cysteine	Disulfides: Cys-S-S-Cys, Cys-S-S-R
Glutamate	4-Hydroxy-glutamate, Pyruvate, α -Ketoglutarate
Histidine	2-Oxo-histidine
Leucine	3- and 4-Hydroxy-leucine
Lysine	2-Amino adipic-semialdehyde, 3-,4-, and 5-hydroxy-lysine
Methionine	Methionine sulfoxide, Methionine sulfone
Phenylalanine	2-, 3-, and 4-hydroxy-phenylalanine
Proline	Glutamic semialdehyde, Pyroglutamic acid, 2-Pyrrolidone 4-hydroxy-proline
Threonine	2-Amino-3-keto-butyric acid
Tryptophan	N-Formyl-kynurenine, kynurenine, 2-, 4-, 5-, 6-, and 7- Hydroxy-tryptophan
Tyrosine	3-4-dihydroxy phenylalanine (DOPA), Tyr-Tyr cross-linked proteins, 3-Nitro-tyrosine, 3,5-Dichloro-tyrosine
Valine	3-, 4-Hydroxy-valine

Fonte: (STADTMAN, 2004).

3.9 Dano ao DNA

No DNA está presente em todo material genético dos seres vivos, constando nele uma sequência de nucleotídeos e bases nitrogenadas. Constantemente o DNA humano é afetado por agentes químicos e físicos, os quais interferem em seu mecanismo biológico natural (LAAT, JASPERS & HOEIJMAKERS, 1999; LEWIN *et al.*, 2011; NELSON & COX 2011; MARTINEZ *et al.*, 2006).

As ERO têm o poder de provocar alterações diretas na molécula de DNA, como nas quatro bases do DNA, resultando em quebras simples ou duplas das

cadeias ou mesmo a criação de moléculas alteradas de DNA, devido a oxidação das proteínas. O DNA pode também ser afetado por meio da peroxidação lipídica e sofrer alterações na expressão gênica (AMES & SHIGENOGA, 1992; COUSSENS & HERMES-LIMA, 2004; KALYANARAMAN, 2013; KRYSTON *et al.*, 2011; NEOFYTOU *et al.*, 2012; WERB, 2002). De acordo com Barreiro, David e David (2006), os danos que podem ocorrer com o DNA e o RNA são graves, pois podem desencadear vários processos patogênicos como a oncogênese.

3.10 Plantas Medicinais

As plantas medicinais por suas qualidades terapêuticas têm sido utilizadas pelo homem desde o início de sua história. Os conhecimentos empíricos sobre esta categoria de plantas faz com que continuem sendo empregadas pela maioria da população mundial nos dias de hoje, como um recurso alternativo para o tratamento de diversas doenças e enfermidades, porque representam uma forma de tratamento mais acessível em relação aos medicamentos alopáticos (APARECIDA, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2014).

As plantas medicinais contêm substâncias capazes de amenizar e curar doenças e têm legado de uso como remédio nas comunidades e na população de modo geral, além disso, uma das vantagens das plantas medicinais é que estas estão prontamente disponíveis e têm menos efeitos colaterais (APARECIDA, 2007; ARUMUGAM; MANJULA & PAARI, 2013).

A OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% deste público utilizam métodos tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas, extratos vegetais ou preparações destas (SAÚDE, 2006).

A fitoterapia é erroneamente confundida com o uso de plantas medicinais pelo público de forma geral. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) conceitua que os medicamentos fitoterápicos são obtidos, exclusivamente por meio de matérias-primas vegetais. Sua eficácia e segurança são reconhecidas por meio de pesquisas etnofarmacológico de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3; neste contexto, os

fitoterápicos representam uma fatia muito significativa no mercado de medicamentos (APARECIDA, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2014).

No Brasil, o uso de terapias menos onerosas para o tratamento de enfermidades crônico-degenerativas representa ganho importante nos investimentos humanos e financeiros empregados na área de saúde. Deste modo, os fitoterápicos podem atuar como uma alternativa terapêutica levando em consideração o menor custo e cujos benefícios adicionam-se aos da terapia convencional (BORGES, K. B.; BAUTISTA, H. B. & GUILERA, 2008).

Para tanto, são necessários maiores investimentos para estudos científicos nesta área, de maneira a levar a comprovação da eficácia destas espécies como hipoglicemiantes e hipolipemiantes, garantindo a segurança e eficácia na aplicação por parte dos profissionais de saúde (BORGES, K. B.; BAUTISTA, H. B. & GUILERA, 2008).

Diante desta realidade, a DM é um alvo interessante para a busca de novos métodos de tratamento, com a possibilidade de uso de várias espécies de plantas medicinais. Muitas substâncias extraídas de plantas já vêm sendo citadas na literatura como adjuvantes no tratamento da DM, atuando tanto na doença em si como amenizando seus sintomas e possíveis consequências. Os benefícios destas plantas também têm evidenciado uma gama de efeitos farmacológicos destes extratos vegetais em modelo animal. Deste modo, os estudos desenvolvidos com o intuito de comprovar o efeito destas espécies vegetais têm aumentado de forma exponencial (NEGRI, 2005; SANTOS; NUNES & MARTINS, 2012).

3.10.1 Família Myrtaceae

A família de plantas Myrtaceae é de ocorrência pan-tropical, com concentrações na América do Sul, Sudeste Asiático e Austrália (REYNERTSON *et al.*, 2008). Compreende cerca de 144 gêneros e 5.774 espécies no mundo, sendo *Myrcia* um dos maiores gêneros da família, no Brasil existem 979 espécies e 23 gêneros (FONTANA & GASPER, 2014).

Estas plantas contribuem também para o desenvolvimento econômico, visto que uma ampla quantidade de espécies e plantas aromáticas produzem

frutos comestíveis, de sabores peculiares e especiais (PASCOAL & SALVADOR, 2011).

Algumas das espécies desta família já são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diabetes, como a *Eugenia punicifolia*, conhecida popularmente como "Pedra-hume-caá" ou "pedra-ume-caá" ou ainda "insulina vegetal" (PÉRICO., RODRIGUES & OHARA., 2019).

Os estudos com Myrtaceae são relativamente recentes e têm sido focados em compostos voláteis, sendo que estas espécies têm a capacidade de acumular fenólicos, compostos orgânicos importantes como antioxidantes, sendo mais potentes que as vitaminas C e E e os carotenoides (PASCOAL & SALVADOR, 2011; PONTES *et al.*, 2019; TAKAO; IMATOMI & GUALTIERI, 2015).

Várias espécies de *Eugenia* que fazem parte da família Myrtaceae já foram estudadas com perspectivas à determinação do seu potencial antioxidante como é o caso de *Eugenia caryophyllata*, *E. jambolana*, *E. uniflora*, *E. elliptica*, *E. orbiculata*, *E. tinifolia*, *E. caryophyllus* e *E. brasiliensis* (MAGINA *et al.*, 2010).

Segundo o estudo de Negri (2005), o extrato aquoso das sementes de *E. jambolana* reduziu os danos cerebrais de ratos diabéticos, causando uma diminuição significativa nos lipídeos e nas substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, e aumentou a concentração das enzimas catalase e superóxido dismutase no cérebro de ratos que tiveram a diabetes induzido por aloxano.

O mecanismo de ação pelos quais as plantas baixam a taxa de glicose do sangue pode ser atribuído aos seguintes fatores: aumento da liberação de insulina por meio da estimulação das células β -pancreáticas, resistência aos hormônios que aumentam a taxa de glicose, aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina, diminuição da perda de glicogênio, aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos, eliminação de radicais livres, resistência à peroxidação de lipídeos, correção da desordem metabólica causada em lipídeos e proteínas e estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo (NEGRI, 2005).

3.10.2 O Gênero *Myrcia*

Myrcia é um dos maiores gêneros da família Myrtaceae, com cerca de 760 espécies e uma das mais características do Brasil, expressando consideráveis benefícios econômicos (MARIA *et al.*, 2014; CRONQUIST, 1981; BARROSO, 1991; WILSON, 2011) sendo que mais de 300 espécies distribuídas do México ao sul do Brasil. Dezesete destas espécies são encontradas no sul do Brasil (MARCHIORI, 1997).

Há muito tempo algumas espécies de *Myrcia* são popularmente utilizadas na medicina, geralmente como infusões, nas tribos indígenas e em algumas comunidades. As espécies do gênero *Myrcia* já estão sendo utilizadas como adstringentes, antidiarreicas, diuréticos, para estancar hemorragias, contra a hipertensão e úlceras da boca. Também são conhecidas como “plantas de insulina” sendo empregadas como hipoglicemiantes na forma de infusão ou decocção (CERQUEIRA *et al.*, 2013; BRITO & LAINETTI, 1996; BATISTA *et al.*, 2011).

Geralmente são utilizadas as folhas ou a planta inteira e feitas infusões, sendo que este grupo de plantas inclui *Myrcia puniceifolia*, *M. speciosa*, *M. citrifolia*, *M. guianensis*, *M. multiflora*, *M. salicifolia*, *M. sylvatica*, *M. uniflora* (CASCAES; MARIA & PINHEIRO, 2015). As composições químicas dos óleos essenciais das espécies de *Myrcia* são bastante semelhantes às espécies de *Eugenia*, com predomínio de sesquiterpenos cíclicos na maioria das espécies e algumas espécies produtoras de óleos ricos em monoterpenos (PASCOAL & SALVADOR, 2011).

3.10.3 *Myrcia splendens* (Sw.) DC

Myrcia splendens tem seu nome popular no Brasil como "guamirim" ou "folha-miúda", ela é extensamente observada desde o México até o sul do Brasil. As plantas do gênero *Myrcia* apresentam em sua composição triterpenos e esteróides. Sua distribuição geográfica é ampla, ocorrendo em diversos biomas brasileiros e no cerrado sendo seu limite sul o estado de Santa Catarina (GOTTLIEB *et al.*, 1972), bem como flavanonas, acetofenonas e glicosídeos

flavonoides (YOSHIKAWA *et al.*,1998; FERREIRA *et al.*, 2006) e estes compostos apresentam diferentes atividades, notadamente a inibição da aldose redutase e da alfa-glicosidase (MATSUDA *et al.*, 2002).

Em alguns estudos também se constata potencial antioxidante, como é o caso de Moresco e Colaboradores (2014), que identificaram nas espécies *Myrcia splendens* e *Myrcia palustres* a atividade antioxidante das frações mais polares das duas espécies obtidas no particionamento líquido-líquido. A atividade antioxidante pode estar relacionada à composição flavonoídica dos extratos, sendo a maioria das frações composta principalmente por miricitrina.

Pontes e colaboradores (2019) demonstraram que *M. splendens*, em três extratos diferentes analisados (diclorometano, acetato de etila, acetona), apresentou atividade antioxidante significativa, especialmente no extrato acetônico. Desta forma concluíram que as folhas de *M. splendens* são uma importante fonte de compostos antioxidantes e podem ser comercialmente aplicadas no futuro.

4 METODOLOGIA

4.1 Preparo do extrato das folhas de *M. splendens*

4.1.1 Obtenção do material vegetal

A coleta de amostras da espécie de *M. splendens* foi realizada em Blumenau, Santa Catarina, Brasil (26 ° 53'55,2 "S 49 ° 04'41,3" W) em outubro de 2017. O material vegetal foi identificado pelos botânicos Dr. André Luiz de Gasper, do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Regional de Blumenau (FURB) e Dr. Marcos Sobral do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A amostra da planta foi depositada no Herbário Dr. Roberto Miguel Klein da FURB registrada com o número 00607.

4.1.2 Obtenção do extrato bruto

Após a coleta, o material vegetal foi seco sob temperatura ambiente e peso. Este material (~ 1 kg) foi macerado em diclorometano por 7 dias. O extrato foi filtrado e o solvente foi evaporado num evaporador rotativo (abaixo de 60°C) acoplado a um condensador de vácuo e concentrado até um volume reduzido. Este procedimento foi repetido mais uma vez e produziu extrato bruto de diclorometano (EDM) (BARAUNA *et al.*, 2018).

4.2 Análise de compostos fenólicos no DME por HPLC-ESI-MS / MS

Instrumentação

A análise dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com Siebert *et al.* (2019). Essa análise é realizada usando o cromatógrafo Agilent® 1200, com uma coluna Phenomenex® Synergi 4µ Polar-RP 80A (150 mm x 2 mm ID, tamanho de partícula de 4 µm) a 30°C. O cromatógrafo líquido foi acoplado a um sistema de espectrometria de massa que consiste em um espectrômetro de massas híbrido triplo quadrupolo / armadilha de íons linear Qtrap® 3200 (Applied Biosystems / MDS SCIEX, EUA) com Turbo Ion Spray® como fonte de ionização,

no modo de ionização negativa, com os seguintes parâmetros da fonte: interface de spray de íons a 400°C; tensão de pulverização iônica de 4500 V; gás de cortina, 10 psi; gás nebulizador, 45 psi; gás auxiliar, 45 psi; e gás de colisão, médio. O software Analyst® (versão 1.5.1) foi utilizado para o registro e processamento dos dados. Pares de íons foram monitorados no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM).

Condições cromatográficas

O eluente foi formado pela mistura dos solventes A (MeOH / H₂O na proporção de 95: 5, v v-1) e B (H₂O / ácido fórmico 0,1%) da seguinte forma: 1ª etapa - 10% de solvente A e 90% de B (modo isocrático) por 5 min; 2ª etapa - gradiente linear dos solventes A e B (de 10 a 90% de A) por 2 min; 3ª etapa - 90% de solvente A e 10% de B (modo isocrático) por 3 min; 4ª etapa - gradiente linear dos solventes A e B (de 90 a 10% de A) por 7 minutos com vazão de 250 µL min⁻¹ de fase móvel. Em todas as análises, o volume injetado foi de 5 µL.

Para identificação e quantificação, 47 compostos fenólicos padrão foram analisados nas mesmas condições descritas acima, sendo eles: ácido 4-aminobenzóico, ácido 4-hidroximetilbenzóico, apigenina, aromadendrina, ácido cafeico, carnosol, catequina, ácido clorogênico, crisina, ácido cinâmico, coniferaldeído, ácido elágico, epicatequina, epigallocatequina, galato de epigallocatequina, eriodictyol, ácido ferúlico, fustin, galangina, ácido gálico, hispudulina, isoquercetina, kaempferol, ácido mandélico, ácido metoxifenilacético, piperidinina, piperazina, naritrina e piperazina ácido coumarico, pinocembrina, ácido protocatecúico, quercetina, resveratrol, ácido rosmarínico, rutina, ácido salicílico, escopoletina, sinapaldeído, ácido sinápico, seringadeído, ácido sérico, taxifolina, umbelliferona, ácido vanílico e vanilina dissolvidos em metanol (0,02 a 6 mg).

A amostra do extrato foi preparada dissolvendo 50 mg do material liofilizado em uma solução de 5 mL de ácido clorídrico a pH 2. Essas soluções foram extraídas três vezes com 2 mL de éter etílico de cada vez e os três extratos foram combinados. Após secagem do extrato combinado, ele foi armazenado em um recipiente fechado a -20 ° C. Antes da análise, o material seco foi dissolvido em 1 mL de MeOH e centrifugado a 12.000 rpm por 120 s.

4.3 Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus*, variedade *albinus* da raça Wistar, sendo todos machos, com peso médio de 230 - 280g, provenientes do Laboratório de Criação e Comercialização de Animais LTDA EPP (ANILAB), Paulínia, São Paulo, Brasil. Os animais foram desmamados aos 21 dias de idade. Antes do processo de experimentação, os animais foram acomodados (4 por gaiola) e aclimatados por 7 dias para adaptação em um novo meio. Foram então mantidos em um ciclo de 12h claro/escuro a temperatura constante de 22°C com livre acesso à comida e água. Os experimentos foram realizados conforme o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (BRASIL, 2008; MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA).

As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996”. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Universidade da Região de Joinville, Brasil, sob o número 011/2017.

4.3.1 Indução da DM II e Tratamento

Para a indução da DMII, os ratos, em jejum de 12 horas, receberam uma injeção de estreptozotocina (60 mg/kg; i.p.) dissolvida em 0,1 M de tampão citrato (pH 4,5), 15 min após a aplicação de nicotinamida (120 mg/kg; i.p.). A nicotinamida preserva as células β pancreáticas (até 40%) da citotoxicidade da estreptozotocina e produz DMII (Sheela *et al.*, 2013). Após 72 h, os níveis glicêmicos foram avaliados. Animais foram considerados diabéticos quando a glicemia em jejum foi superior a 200 mg/dL.

Os ratos foram divididos em grupos (n = 10), como se segue:

Grupo controle: recebeu água por injeção i.p. (1 vez) e água via gavagem uma vez ao dia durante 15 dias.

Grupo DMII: recebeu uma injeção i.p. de estreptozotocina (60 mg/kg) dissolvida em 0,1 M de tampão citrato (pH 4,5), 15 min após a aplicação de nicotinamida (120 mg / kg; i.p.) e água via gavagem uma vez ao dia durante 15 dias;

Grupo controle extratos: recebeu água por injeção i.p. (1 vez) e injeção i.p. de EDM (25, 50, 100 ou 150 mg / kg) (cada grupo de animais com uma dose respectivamente) obtidos das folhas da espécie *M. splendens* via gavagem, uma vez ao dia durante 15 dias.

Grupo DMII + extratos: recebeu uma injeção i.p. de estreptozotocina (60 mg/kg) dissolvida em 0,1 M de tampão citrato (pH 4,5), 15 min após a aplicação de nicotinamida (120 mg / kg; i.p.) e EDM com grupos de animais recebendo as respectivas dosagens: 25, 50, 100 ou 150 mg / kg, via gavagem, uma vez ao dia durante 15 dias.

O tratamento teve início após a confirmação da diabetes, que foi realizada por dosagem glicêmica periférica, 72 horas após a administração de estreptozotocina. Para caracterizarmos o tratamento como crônico, os animais receberam intervenção por 15 dias consecutivos via oral (gavagem), obedecendo a um intervalo de 24 horas entre um tratamento e outro. 12 horas após o último tratamento, os animais foram sacrificados por decapitação na ausência de anestesia e em seguida o sangue total foi coletado e o pâncreas e rins foram removidos para a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo, glicose e análise histológica.

As doses do EDM (25, 50, 100 e 150mg/kg) foram escolhidas com base nos estudos de Kar *et al.*, 2003; Ravi *et al.*, 2005 e Ravi *et al.*, 2004.

4.4 Preparo das amostras

4.4.1 Preparação dos eritrócitos e do plasma:

Os eritrócitos e o plasma foram preparados a partir de amostras de sangue total obtidas de ratos (LIMA *et al.*, 2017).

O sangue total foi centrifugado a 1,000 x g, o plasma foi separado e congelado para posterior determinação. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L cloreto de sódio). Os lisados foram preparados pela adição de 1 mL de água destilada para 100 µL de eritrócitos lavados e congelados para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes (LIMA *et al.*, 2017).

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, eritrócitos foram congelados e descongelados três vezes e centrifugados a 13.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5 mg/mL de proteína (LIMA *et al.*, 2017).

4.4.2 Preparação do soro:

O soro foi preparado a partir de amostras totais de sangue obtidas de ratos. O sangue periférico foi rapidamente coletado e transferido para tubos sem anticoagulante, centrifugado a 1.000 rpm por 10 min e o soro foi separado e utilizado para a análise de parâmetros bioquímicos (LIMA *et al.*, 2017).

4.4.3 Preparação do órgão:

Os rins foram removidos, descapsulados e mantidos em gelo com solução tampão salina (154 mM NaCl, 5 mM Tris-HEPES, pH 7.5). O homogeneizado (15%) (p/v) foi preparado em tampão específico usando homogeneizador Potter-Elvehjem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a \times 3.000 g, a 4°C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante foi estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes, TBA-RS, proteínas carboniladas e conteúdo total de sulfidrilas (LIMA *et al.*, 2017).

4.5 Análise histológica (AH)

Após o sacrifício dos animais, o pâncreas foi removido e fixado em formalina a 10% por 24 horas e depois transferido para solução etanólica a 70%. Em seguida, os órgãos passaram por soluções com concentrações crescentes de álcool e embebidos em parafina para procedimento histológico de rotina. Seções de 7 µm foram rotineiramente coradas com hematoxilina e eosina (HE). Seções coradas do pâncreas foram analisadas sob um microscópio Olympus (Olympus CX3). Foram descritas características histopatológicas, que podem indicar danos nas ilhotas pancreáticas: presença de inflamação, infiltrado inflamatório, bordas assimétricas, fibrose e degeneração vacuolar do núcleo e citoplasma (SHARMA *et al.*,2019).

4.6 Estudos bioquímicos

4.6.1 Dosagem de Glicose

A dosagem de glicose foi realizada utilizando o kit de glicose Liquiform (referência 133 e 87 respectivamente da Labtest). As determinações foram realizadas por espectrofotometria seguindo a bula do fabricante.

4.6.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

O TBA-RS foi determinado de acordo com o método descrito por Ohkawa e colaboradores (1979). A metodologia de TBA-RS mensura o Malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais livres hidroxil. O pâncreas homogeneizado e o plasma foram misturados com ácido tricloroacético a 20% e 0,8% de ácido tiobarbitúrico e aquecido num banho de água fervente durante 60 min. TBA-RS foi determinado pela absorvância a 535 nm. Uma curva de calibração sendo obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o dos sobrenadantes. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteína (OHKAWA *et al.*,1979).

4.6.3 Conteúdo Total de Sulfidrilas

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov & Markesbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412nm. Resumidamente, 50µL de homogeneizado e o plasma foi adicionado a 1 mL de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1mM. A reação foi iniciada pela adição de 30µL de DTNB 10,0mM e incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

4.6.4 Catalase

A atividade de CAT foi realizada utilizando o homogenato de rins e eritrócitos e foi determinada pelo método de Aebi (1984) usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de H₂O₂ a 240 nm num meio de reação contendo 20 mM de H₂O₂, 0,1% de Triton X-100, 10 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, e proteína 0,1-0,3mg / mL. Uma unidade é definida como CAT 1µmol de H₂O₂ consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT / mg de proteína.

4.6.5 Glutationa Peroxidase (GSH-Px)

A atividade de GSH-Px foi realizada utilizando o homogenato de rins e eritrócitos e foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando tertbutil-hidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm por 4 minutos (espectrofotômetro Shimadzu UV-visível). O meio continha 2 mM de GSH, 0,15U / ml GSH redutase, 0,4 mM de azida, 0,5 mM de tertbutil-hidroperóxido e 0,1 mM de NADPH. Uma unidade de GSH-Px definida como 1µmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica foi apresentada como unidades de GSH-Px / mg de proteína.

4.6.6 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada utilizando o homogenato de rins e eritrócitos e determinada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que é um substrato para a SOD. Resumidamente, 15 μ l de cada amostra, 215 μ l de uma mistura contendo 50 μ M de tampão Tris, pH 8,2 foram adicionados à 1 μ M de EDTA e 30 μ M de CAT. Subsequentemente, foram adicionados 20 μ l de pirogalol e a absorvância foi registrada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos a 420 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como referência, para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogalol e a atividade específica foi relatado como unidades/mg de proteína SOD.

4.6.7 Conteúdo de proteínas carboniladas

O teor de carbonilas foi verificado por meio de um método descrito por Reznick e Packer (1994), com base na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo, medido espectrofotometricamente a 370 nm. Resumidamente, 200 μ l de homogeneizado de rins e plasma foram adicionados a tubos de plástico contendo 400 μ l de dinitrofenilhidrazina 10 mM (preparado em HCl 2 M). As amostras foram mantidas no escuro durante 1 h e agitadas em vórtex a cada 15 min. Subsequentemente, 500 μ l de ácido tricloroacético a 20% foi adicionado a cada tubo. A mistura foi submetida a vórtex e centrifugada a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante obtido foi descartado. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol / acetato de etila (1:1 v / v), agitado e centrifugado a 14000 x g durante 3 min. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspensionado em 600 μ l de guanidina 6M (preparado numa solução de fosfato de potássio 20 mM, pH 2,3),

antes de agitação em vórtex e incubação a 60°C durante 15 min. As amostras foram em seguida centrifugadas a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante foi usado para medir a absorvância a 370 nm (UV) numa cubeta de quartzo. Os resultados foram relatados como conteúdo total de carbonilas (nmol/mg de proteína).

4.6.8 Dosagem de Proteínas

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

4.7 Análise estatística

Os resultados nos diferentes grupos foram representados como média \pm desvio padrão, analisados por meio do Programa SPSS para Windows, versão 12 (SSPS, Chicago, IL, USA), utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post-hoc* de Duncan, para comparação entre as médias dos grupos, sendo que os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5 INTERDISCIPLINARIDADE

A estimativa de uma sociedade cada vez mais afetada pela diabetes e a hipertrigliceridemia resultante do estilo de vida atual, associado a maus hábitos alimentares e à falta de atividade física, provoca uma urgência de expandir e melhorar as possibilidades e a qualidade dos tratamentos.

No curso da doença da diabetes a exposição prolongada dos tecidos à hiperglicemia leva a danos endoteliais (SCHALKWIJK, 2005). Uma das causas das complicações da diabetes é o estresse oxidativo, condição na qual as defesas antioxidantes não são suficientes para inativar as espécies reativas geradas (RAINS& JAIN, 2011). A doença está associada a distúrbios metabólicos progressivos e disfunção em diferentes órgãos como o pâncreas, fígado, coração, rins e outros (HASHEMPUR *et al.*, 2015).

No caso da HTG que é caracterizada pelo aumento dos níveis plasmáticos de triglicérides, ela pode ser considerada um fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, nela ocorrem danos oxidativos e inflamatórios no espaço intimal dos vasos sanguíneos, danificando-os e desta forma aumentando a fragilidade vascular, contribuindo para o acometimento do tecido cardíaco.

A utilização de plantas medicinais é uma prática milenar realizada na maioria por leigos baseada no conhecimento popular, porém ao longo dos anos os pesquisadores têm buscado evidências que comprovam os potenciais farmacológicos de diversas plantas. Estes estudos ganharam destaque e vem sendo alvo cada vez mais de pesquisas de cunho científico, para atestar a atividade farmacológica das substâncias de origem vegetal.

Desta forma, o estudo que evidencia os prejuízos causados pela DM tipo 2 e a ação antioxidante, hipolipemiante e hipoglicemiante de *M. splendens* traz benefícios a nível de conhecimento científico, médico e ambiental, contribuindo para uma futura extração e comercialização do extrato, sendo ela também uma opção que pode ser utilizada como antioxidante, hipolipemiante além de hipoglicemiante com possibilidade de menos efeitos colaterais.

Podendo gerar possíveis ganhos na indústria farmacêutica e na economia de modo geral, além de melhorar o acesso aos medicamentos buscando trazer mais uma opção ao paciente com uma interface econômica mais acessível, não

só visando a questão comercial, mas podendo levar a população um tratamento não alopático que irá refletir em menor despesa na saúde pública, redução de procura hospitalar, redução com lixo hospitalar, e todos os fatores que levam a uma integração entre a saúde e o meio ambiente.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Artigo:

HYPOLIPEMYANT, HYPOGLYCEMIANT AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF *Myrcia splendens* (Sw.) DC IN AN ANIMAL TYPE 2 DIABETES MODEL INDUCED BY STREPTOZOTOCIN

EFFECTOS HIPOLIPEMIANTE, HIPOGLUCEMIA Y ANTIOXIDANTES DE *Myrcia splendens* (Sw.) DC EN UN MODELO DE DIABETES ANIMALES TIPO 2 MODELO INDUCIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Scheila Medeiros¹, Thayná Patachini Maia², Aline Barbosa Lima¹, Luana Carla Pscheidt³, Larissa Delmonego¹, Karine Louize Vincenzi¹, Bruna Vanzin Custodio², Milena Rebelo³, Débora Delwing-Dal Magro⁴, Sara Cristiane Barauna⁴, Michele Debiasi Alberton⁵, Eduardo Manoel Pereira³, Magda Ferraza¹, Daniela Delwing-de Lima^{1,2*}

1 Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki,10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil; scheila-medeiros@hotmail.com

2 Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

3 Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

4 Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga,140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

5 Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

*Address for correspondence: Dra. Daniela Delwing de Lima, Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: daniela.delwing@univille.br; danidelwing@hotmail.com

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the effects of chronic administration of dichloromethane extract (DME), obtained from the leaves of *Myrcia splendens*, on alterations caused by type 2 diabetes mellitus (DMII) in the hyperglycemia, hypertriglyceridemia and oxidative stress in the blood and kidney of rats, as well as in the damage caused in the pancreatic islets. The experiment was approved by the Animal Research and Ethics Committee of the University of Joinville, Brazil, under number 011/2017. The animals received streptozotocin (60 mg/kg; i.p.), 15 minutes after nicotinamide (120 mg/kg; i.p.) or vehicle. After 72 hours, the glycemic levels were evaluated to confirm diabetes and then the animals received, during 15 days, DME (25, 50, 100 or 150mg/Kg) or vehicle by gavage. The blood, kidney and pancreas were removed. Results showed that chronic administration of DME (25, 50, 100 and 150 mg/kg) partially reversed hyperglycemia and at 100 and 150 mg/kg reversed HTG. Histopathological findings elucidated that DME, at all doses, reduced damage to pancreatic β -cells. DME 150 mg/kg reversed the increases in TBA-RS and the reduction in the sulfhydryl content. DME 100 and 150 mg/kg increased CAT and GSH-Px activities in the blood. Furthermore, DME 100 and 150 mg/kg increased CAT, reversed the decrease in GSH-Px and increased this enzyme activity. Also, DMII decreased CAT and GSH-Px activities in the kidney. Additionally, DME 150 mg/kg reversed CAT and GSH-Px reductions. We believe that the hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects elicited by DME are dependent on the presence of phenolic compounds in this extract (syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, umbelliferone, isoquercetin, coniferaldehyde, synapaldehyde, carnosol, protocatecuic acid and ellagic acid) as demonstrated by HPLC-ESI-MS/MS.

Keywords: Myrtaceae, diabetes mellitus type II, oxidative stress, phenolic compounds, HPLC-ESI-MS/MS.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a health problem in the current world. In 2013, more than 382 million of people were victims of diabetes, characterized by blood hyperglycemia, resulted from a disorder in secretion or in insulin action or both, that can be associated with obesity, high blood pressure, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and sedentary lifestyle (Ferreira *et al.*, 2014; Vareda *et al.*, 2014).

The prevalence of diabetes shows a world increase and most of the cases are from type 2 diabetes (DMII) (Wallenius & Maleckas, 2015). DMII occurs due resistance to the insulin action, associated with a deficiency in its secretion due to a partial destruction of β -cells (Martin *et al.*, 2016). The diabetes treatment requires a change in the daily routine of the individual, since the medical therapy gets in a second moment, when there is the incapacity of controlling the glycemic levels, through balanced diet and physical activities, to minimize the risk of cardiac, neuropathic, renal damage, besides dyslipidemia and oxidative stress (Nathan *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2018).

Among the existent medical options for the diabetes therapy, there are available the insulin and the oral hypoglycemic agents, mainly, biguanides, sulfonylureas, dipeptidyl peptidase 4 inhibitors, thiazolidinediones, GLP-1 receptor agonists and sodium co-transporter glucose-2 inhibitors (SGLT2) (Nathan *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2011). The current international guidelines of treatment (2013), recommend the use of metformin as an initial treatment for patients with DMII. If the glycemic control keeps inappropriate, it is recommended a combination of metformin with another class of antidiabetics (Shestakova *et al.*, 2018).

The research for new treatments continuous because the existent synthetic drugs show limitations (Arumugam *et al.*, 2013). According to Negri (2005), there are evidences that aqueous and vegetable extracts have hypoglycemic effect such as *Equisetum myriochaetum* Schlecht and Cham (Equisetaceae), *Spergularia purpurea* L. (Caryophyllaceae), *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) among others.

The species of the genus *Myrcia* have already been used as hypoglycemic, as an empirical form, by the population (Batista *et al.*, 2011; Cerqueira *et al.*, 2013). With the presence of triterpenes, steroids, flavonoids and flavonoid glycosides, these compounds present different activities, being the inhibition of aldose reductase and alpha-glucosidase the most relevant (Matsuda *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2006).

Studies also demonstrate the antioxidant potential of flavonoid extracts, most of which are attributed to myricitrin, and a compound present in some fractions obtained from the *Myrcia* extracts (Moresco *et al.*, 2014). Magina *et al.* (2010) and Lima *et al.* (2017) demonstrated the *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Eugenia brasiliensis*, possibly due to the total phenolic and flavonoid content of plant extracts and fractions. Another study conducted by Siebert *et al.* (2019), reported the existence of flavonoids quercetin, mycetin, catechin, isoquercetin, rutin and galangin in the crude hydroalcoholic extract and the presence of the compounds catechin, isoquercetin, galangin and apigenin in the ethyl acetate fraction of *Eugenia brasiliensis* (Siebert *et al.*, 2019).

The purpose of this study was to verify the effects of chronic administration of dichloromethane extract (DME), obtained from the leaves of *Myrcia splendens*, on alterations caused by DMII, induced by the administration of streptozotocin and nicotinamide, in the hyperglycemia, hypertriglyceridemia and oxidative stress in the blood and kidney of rats, as well as to verify the effect of the DME on the damage caused by DMII in the pancreatic islets.

2. Materials and Methods

2.1 Animals and reagents

Male Wistar rats (230-280g), obtained from the Breeding and Commercial Laboratory Animals LTDA EPP (ANILAB), Paulínia, São Paulo, Brazil, were used in the experiments. The animals were weaned at 21 days of age. Before experimentation, the animals were housed and acclimated for 7 days to allow adaptation to the new environment and were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle, at a constant temperature (22±1°C), with free access to water and commercial chow. The animals were housed 4 per cage and the

tests were carried out in accordance with law N^o 11.794, of October 8, 2008, and the other norms applied to teaching and / or research, especially the Normative Resolutions of the National Council of Control of Animal Experimentation - CONCEA.

Environmental conditions, lighting, accommodation and nutrition followed the recommendations required by the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", 1996. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the University of Joinville Region, Joinville, Brazil, under the CEUA protocol number 011/2017.

2.2 Plant material

Leaves from *Myrcia splendens* (Sw.) DC, Myrtaceae were collected in Blumenau, Santa Catarina state, Brazil (26°53'55.2"S 49°04'41.3"W,) in October 2017. Botanist Dr. André Luiz de Gasper, from the Natural Sciences Department of Regional University of Blumenau (FURB), identified plant material and Dr. Marcos Sobral, Department of Botany, Federal University of Minas Gerais (UFMG) and a voucher specimen was deposited in the Dr. Roberto Miguel Klein Herbarium of the same institution under number FURB 00607.

2.2.1 Obtaining the crude extract of *M. splendens*

After collection, the plant material was dried under room temperature and weight. In order to obtain an extract of medium polarity, this material (~ 1 kg) was macerated in dichloromethane for 3 days. The extract was filtered, and the solvent evaporated in a rotary evaporator (below 60 °C) coupled with a vacuum condenser and concentrated to a reduced volume. This procedure was repeated one more time and yield crude dichloromethane extract (DME) (Barauna *et al.*, 2018).

2.3 Induction of DM II and treatment

For DMII induction, rats in a 12-hour fast received a streptozotocin injection (60 mg/kg; i.p.) solved in 0,1M citrate buffer (pH 4,5), 15 minutes after the nicotinamide prescription (120 mg/kg; i.p.). Citrate buffer was injected alone in control rats. The nicotinamide preserves the β pancreatic cells (by 40%) from the

cytotoxicity of streptozotocin and produces the DMII (Sheela *et al.*, 2013). After 72 hours, the glycemic levels were evaluated using a strip-operated blood glucose sensor G-TECH free light. The animals were considered diabetic when the blood glucose in fasting was over 200 mg/dL (Sheela *et al.*, 2013).

The rats were divided in groups (n = 10) as follows: **Control group:** received water by intraperitoneal (i.p.) injection (once) and water orally (by gavage) once a day during 15 days; **DMII group:** received an i.p. injection of streptozotocin (60 mg/kg) solved in 0,1 M citrate buffer (pH 4,5), 15 minutes after the nicotinamide prescription (120 mg / kg; i.p.) (once) and water by gavage once a day during 15 days; **Control groups extract:** received an i.p. injection of water (once) and DME (25, 50, 100 or 150 mg/kg) obtained from *M. splendens* species by gavage, once a day during 15 days; **DMII + extract groups:** received an i.p. injection of streptozotocin (60 mg/kg) solved in 0,1 M citrate buffer (pH 4,5), 15 minutes after the nicotinamide prescription (120 mg/kg; i.p.) (once) and DME (25, 50, 100 or 150 mg/kg) by gavage, once a day during 15 days consecutive for chronic treatment, obeying a 24-hours interval between administrations. After this period, the animals were sacrificed by decapitation in the absence of anesthesia, and blood and kidneys were collected and removed for oxidative stress, triglyceride, glucose and histological analysis. The DME (25, 50, 100 and 150 mg/kg) doses were chosen based on Kar *et al.* (2003) Ravi *et al.* (2004, 2005) and studies.

2.4 Serum preparation

Serum was prepared from total blood samples obtained from rats. The peripheral blood was rapidly collected and transferred to tubes without anticoagulant, centrifuged at 1,000 rpm for 10 min, after the serum was separated and used to the analyses of biochemical parameters (Lima *et al.*, 2017).

2.5 Erythrocyte and plasma preparation

Erythrocytes and plasma were prepared from total blood samples obtained from rats. For erythrocyte separation, peripheral blood was collected and transferred to heparinized tubes, which were centrifuged at 1.000 rpm, and the plasma was removed by aspiration and maintained frozen at -80 °C until assay.

Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride) and lysates were prepared by the addition of 1 mL of distilled water to 100 μ L washed erythrocytes and maintained frozen at -80°C until determination of the antioxidant enzyme activities (Lima *et al.*, 2017).

For antioxidant enzyme activity determination, erythrocytes were frozen and thawed three times, and centrifuged at 13.500 rpm for 10 min. The supernatant was diluted in order to contain approximately 0.5 mg/mL of protein (Lima *et al.*, 2017).

2.6 Organ Preparation

The kidneys were removed, kept on ice-cold buffered sodium phosphate (20 mM, pH 7.4, 140 mM KCl) and homogenized in ten volumes (1:10 w/v) of appropriate buffer, according to the technique to be performed. Homogenates were prepared using a Potter-Elvehjem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India) by passing 5 pulses and centrifuged at 800 rpm for 10 min at 4°C to discarding nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was saved in aliquots and stored at -80°C for further determination of parameters of oxidative stress (Lima *et al.*, 2017).

2.7 Histological analysis of the pancreas

Briefly, after sacrificing the animals, the pancreas was removed and fixed in 10% formalin for 24 hours and then transferred to ethanolic solution 70%. After, the organ was passed through solutions with increasing concentrations of alcohol and embedded in paraffin for routine histology procedure. Sections of 7 μ m were routinely stained with hematoxylin and eosin (HE). Stained sections of pancreas were analyzed under an Olympus microscope (Olympus CX3).

Histopathological characteristics were described, which may indicate pancreatic islets damage: presence of inflammation, inflammatory infiltrate, asymmetric edges, fibrosis and vacuolar degeneration of nucleus and cytoplasm (Sharma *et al.*, 2019).

3. Biochemical studies

3.1 Dosage of glucose and triglycerides

The dosage of glucose and triglycerides were performed using the Glucose and Triglycerides Liquiform kits (Labtest). Absorbance was determined using a UV-vis Shimadzu spectrophotometer, following the manufacturer's package insert.

3.2 Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS were determined according to the method described by Ohkawa *et al.* (1979). The methodology for the analysis of TBA-RS measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, caused mainly by hydroxyl free radicals. Initially, plasma and kidney in 1.15% KCl was mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBA-RS were determined by the absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the MDA precursor and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS content was expressed as nanomoles of MDA formed per milligram of protein.

3.3 Total Sulfhydryl Content

The total sulfhydryl content was determined according to the method of Aksenov & Markersbery (2001), which is based on the reduction of dithionitrobenzoic acid (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB), which is measured spectrophotometrically at 412 nm. For the assay, 50 μ L of homogenate was added to 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The reaction was started by the addition of 30 μ L of 10 mM DTNB and incubated for 30 minutes at room temperature in the dark. Analyses of a blank (DTNB absorbance) was also performed. The results were expressed as nmol TNB/mg protein.

3.4 Catalase Assay (CAT)

CAT activity was determined by the method of Aebi (1984). The method used is based on the disappearance of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2 , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. One CAT unit is defined as 1 μmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

3.5 Glutathione Peroxidase Assay (GSH-Px)

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (1981), using *tert*-butylhydroperoxide as substrate. The decomposition of NADPH was monitored in a spectrophotometer at 340 nm for 4 minutes. The medium contained 2.0 mM GSH, 0.15 U/mL GSH reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM *tert*-butylhydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as 1 μmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is reported as GSH-Px units/mg of protein.

3.6 Superoxide Dismutase Assay (SOD)

The activity of SOD was assayed by the method described by Marklund (1985), a highly dependent superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) process, which is a substrate for SOD. 15 μL of each sample was added to 215 μL of a mixture containing 50 μM Tris buffer, 1 μM EDTA, pH 8.2, and 30 μM CAT. Subsequently, 20 μL of pyrogallol was added and the absorbance was measured every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm using a spectrophotometer. Inhibition of auto-oxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD, the activity of which can be indirectly tested spectrophotometrically. One unit of SOD is defined as the amount of SOD required to inhibit 50% of the auto-oxidation of pyrogallol and the specific activity is reported as SOD units/mg protein.

3.7 Protein carbonyl Content

Protein Carbonyl content was assayed by a method described by Reznick & Packer (1994) [31], based on the reaction of protein carbonyls with dinitrophenylhydrazine to form dinitrophenylhydrazone, a yellow compound that is measured spectrophotometrically at 370 nm. Briefly, 200 μ L of homogenate were added to plastic tubes containing 400 μ L of 10 mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2M HCl). Samples were kept in the dark for 1 h and vortexed every 15 min. Subsequently, 500 μ L of 20% trichloroacetic acid were added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14,000 rpm for 3 min and the supernatant obtained was discarded. The pellet was washed with 1 mL ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v), vortexed and centrifuged at 14,000 rpm for 3 min. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended in 600 μ L of 6 M guanidine (prepared in a 20 mM potassium phosphate solution, pH 2.3), before vortexing and incubating at 60 ° C for 15 min., Samples were then centrifuged at 14,000 rpm for 3 min and the supernatant was used to measure absorbance at 370 nm (UV) in a quartz cuvette. Results were reported as carbonyl content (nmol/mg protein).

3.8 Protein determination

Protein was measured by the Lowry *et al.* (1951), method, using serum bovine albumin as standard.

3.9 Analysis of phenolic compounds in the DME by HPLC-ESI-MS/MS

Instrumentation

Analysis of phenolic compounds was performed according Siebert *et al.* (2019). This analysis is conducted using Agilent® 1200 chromatograph, with a Phenomenex® Synergi 4 μ Polar-RP 80A column (150 mm x 2 mm ID, particle size of 4 μ m) at 30°C. The liquid chromatograph was coupled to a mass spectrometry system consisting of a hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer Qtrap® 3200 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, USA) with TurbolonSpray® as the ionization source, in negative ionization mode, with the following source parameters: ion spray interface at 400°C; ion spray voltage of 4500 V; curtain gas, 10 psi; nebulizer gas, 45 psi; auxiliary gas, 45 psi; and

collision gas, medium. The Analyst® software (version 1.5.1) was used for the recording and processing of the data. Pairs of ions were monitored in multiple reaction monitoring (MRM) mode.

Chromatographic conditions

The eluent was formed by mixing solvents A (MeOH/H₂O in ratio of 95:5, v v⁻¹) and B (H₂O/formic acid 0,1%) as follows: 1st stage – 10% solvent A and 90% B (isocratic mode) for 5 min; 2nd stage – linear gradient of solvents A and B (from 10 to 90% of A) for 2 min; 3rd stage – 90% solvent A and 10% B (isocratic mode) for 3 min; 4th stage – linear gradient of solvents A and B (from 90 to 10% of A) for 7 min with a flow rate of 250 µL min⁻¹ of mobile phase. In all analyses, the injected volume was 5 µL.

For the identification and quantification, 47 standard phenolic compounds were analyzed under the same conditions described above, being them: 4-aminobenzoic acid, 4-hydroxymethylbenzoic acid, apigenin, aromadendrin, caffeic acid, carnosol, catechin, chlorogenic acid, chrysin, cinnamic acid, coniferaldehyde, ellagic acid, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, eriodictyol, ferulic acid, fustin, galangin, gallic acid, hispudulin, isoquercetin, kaempferol, mandelic acid, methoxyphenylacetic acid, myricetrin, naringerin, naringin, p-anisic acid, p-coumaric acid, pinocembrin, protocatechuic acid, quercetin, resveratrol, rosmarinic acid, rutin, salicylic acid, scopoletin, sinapaldehyde, sinapic acid, syringaldehyde, syringic acid, taxifolin, umbelliferone, vanillic acid and vanillin dissolved in methanol (0.02 to 6 mg L⁻¹). Sample of extract was prepared by dissolving 50 mg of the freeze-dried material in a 5 mL solution of hydrochloric acid at pH 2. These solutions were extracted three times with 2 mL of ethyl ether each time and the three extracts were combined. After drying the combined extract, it was stored in a sealed container at -20 °C. Prior to analysis, the dried material was dissolved in 1 mL of MeOH and centrifuged at 12,000 rpm for 120 s.

3. Results

3.1 Effects of chronic administration of DME from *M. splendens* on glucose and triglyceride levels on streptozotocin-nicotinamide-induced type-2 diabetic in rats

We investigated the effects of chronic administration of DME (25, 50, 100 and 150 mg/kg) obtained from the leaves of *M. splendens* on glucose and triglyceride levels in the serum of type-2 diabetics rats. The figure 1 shows that streptozotocin-nicotinamide administration significantly enhanced glucose (A) [F(9,52)=37.850; p<0.001] and triglyceride (B) levels [F(9,52)=8.881; p<0.001] in the serum of rats, when compared to the control groups. Post hoc analyzes showed that chronic administration of DME at doses of 25, 50, 100 and 150 mg/kg per se did not alter glucose and triglyceride levels. DME (25, 50, 100 and 150 mg/kg) administration partially reversed, at dose dependent, the hyperglycemia induced by streptozotocin-nicotinamide administration. Also, DME at dose of 50 mg/kg partially reversed and at doses of 100 and 150 mg/kg totally reversed hypertriglyceridemia induced by streptozotocin-nicotinamide administration.

Figure 1.

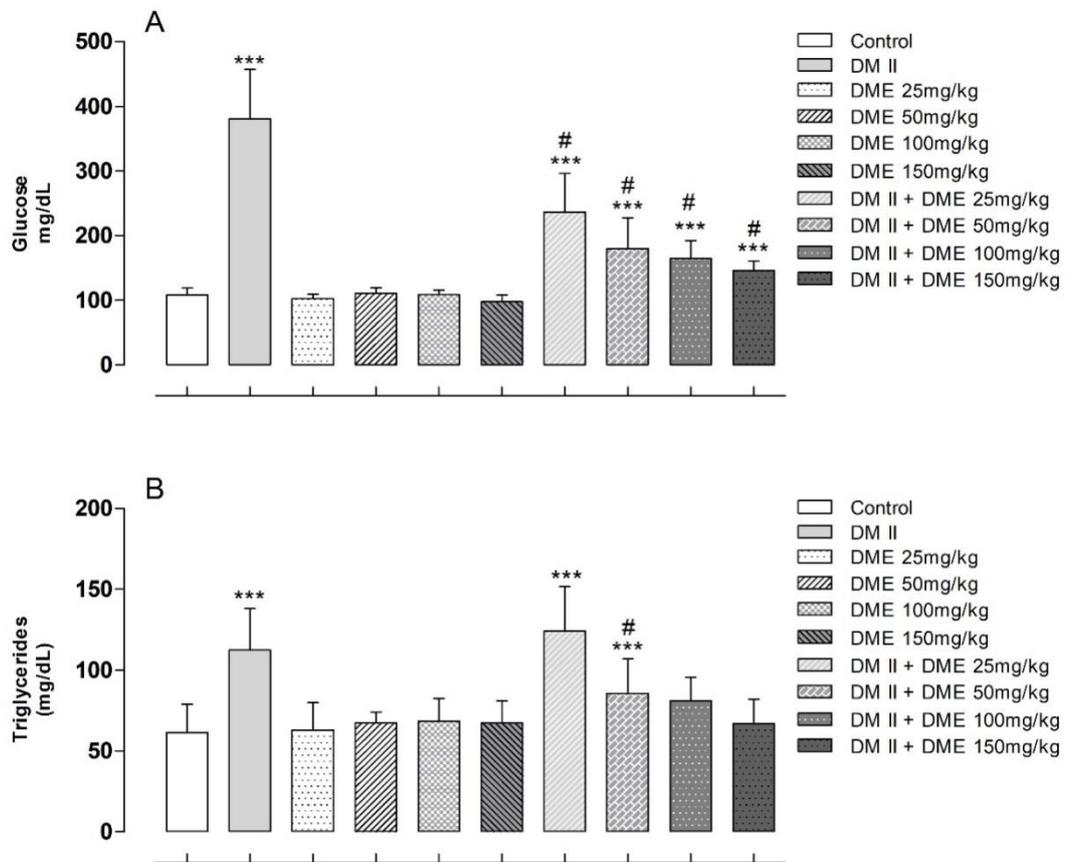


Figure 1. Effect of different DME doses (25, 50, 100 or 150mg/kg) on the effects elicited by DMII on glucose levels (A) and triglycerides levels (B) in the blood of 60-day-old Wistar rats. Results are expressed as mean \pm standard deviation for 7-8 independent (animal) experiments performed in duplicate. *** $p < 0.001$, compared to the control. #: Partial reversal.

3.2 Effects of chronic administration of DME from *M. splendens* on histological analysis of the pancreas on streptozotocin-nicotinamide-induced type-2 diabetic in rats

A qualitative analysis of the pancreatic islets showed differences in the morphological aspects analyzed. As shown in figure 2, the streptozotocin administration induced degeneration of the pancreatic islets, since the group that received streptozotocin and was treated with vehicle show pancreatic islets with asymmetrical edges, a decreased in the islets size and the presence of cytoplasmic vacuolization. The diabetic groups treated with DME of the *M.*

splendens at all doses (25mg/Kg, 50mg/Kg, 100mg/Kg and 150mg/Kg) showed the same characteristics of the diabetic group treated with vehicle, however, a decreased in cytoplasmic vacuolization can be observed, indicating less cell damage. The diabetic groups that received DME of the *M. splendens*, at doses of 25mg/Kg and 150mg/Kg, presented fibrosis areas, indicating tissue regeneration.

Figure 2.

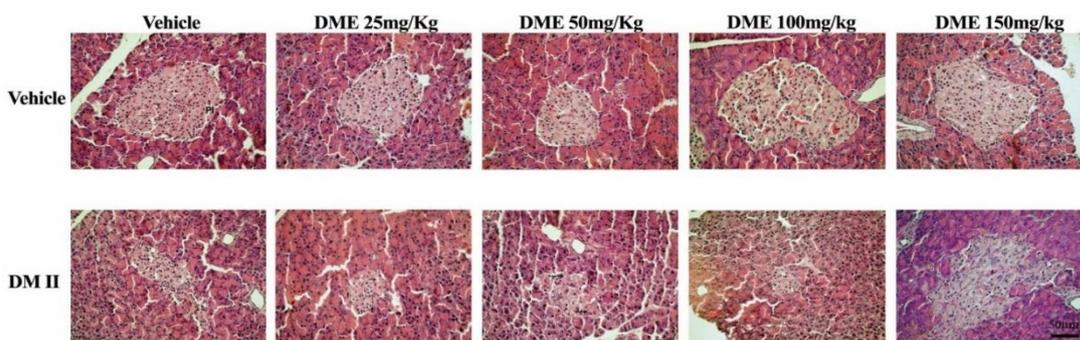


Figure 2. Pancreatic islets of control group streated with vehicle or DME at doses of 25mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg or 150mg/kg presenting normal appearance and symmetrical borders. Pancreatic islets of diabetic groups treated with vehicle or DME at doses of 25mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg or 150mg/kg showing asymmetrical borders. PI: pancreatic islet, v: blood vessels, arrow: cytoplasmic vacuolization, f: fibrosis. Scale bar = 50 μ m. Olympus optical microscope.

3.1 Effects of the chronic administration of DME from *M. splendens* on the alterations in the blood oxidative stress parameters caused by streptozotocin-nicotinamideinduced type-2 diabetic in rats

We next investigated the effects of the chronic administration of DME (25, 50, 100 and 150 mg/kg) on the alterations in TBA-RS, total sulfhydryl content, protein carbonyl content and antioxidant enzymes activities caused by type-2 diabetes in the blood of rats. As shown in figure 3, streptozotocin-nicotinamide DMII model increased TBA-RS (A) [F(9,52)=30.966; p<0.001], reduced total sulfhydryl content (B) [F(9,52)=22.302; p<0.001], did not alter protein carbonyl

content (C) [$F(5,32)=1.601$; $p>0.05$] and SOD (D) activity [$F(5,32)= 0.821$; $p>0.05$], increased CAT (E) [$F(9,52)=12.683$; $p<0.001$] and reduced GSH-Px (F) [$F(9,52)=13.190$; $p<0.001$] activities. *Post hoc* analysis showed that DME per se did not alter TBA-RS levels, total sulfhydryl content, protein carbonyl content and SOD activity, when compared to the control groups. Moreover, chronic administration of DME at doses of 25 and 50 mg/kg didn't reverse, 100 mg/Kg partially reversed and 150 mg/kg totally reversed the increases in TBA-RS levels (Figure 3A) and the reduction in the sulfhydryl content (Figure 3B) in the blood of rats. With regard to the antioxidant enzymes CAT (Figure 3E) and GSH-Px (Figure 3F), chronic administration of DME at doses of 100 and 150 mg/kg led to a significant increase in the CAT and GSH-Px activities, when compared to the control group. DME treatment at doses of 25 and 50 mg/kg didn't revert CAT increases and partially reversed GSH-Px reduction, at doses of 100 and 150 mg/kg, when administrated in animals that received streptozotocin-nicotinamide, led to a significant increase in the CAT activity, when compared to diabetics group. Furthermore, reversed the decrease in GSH-Px activity induced by diabetes and increased this enzyme activity.

Figure 3.

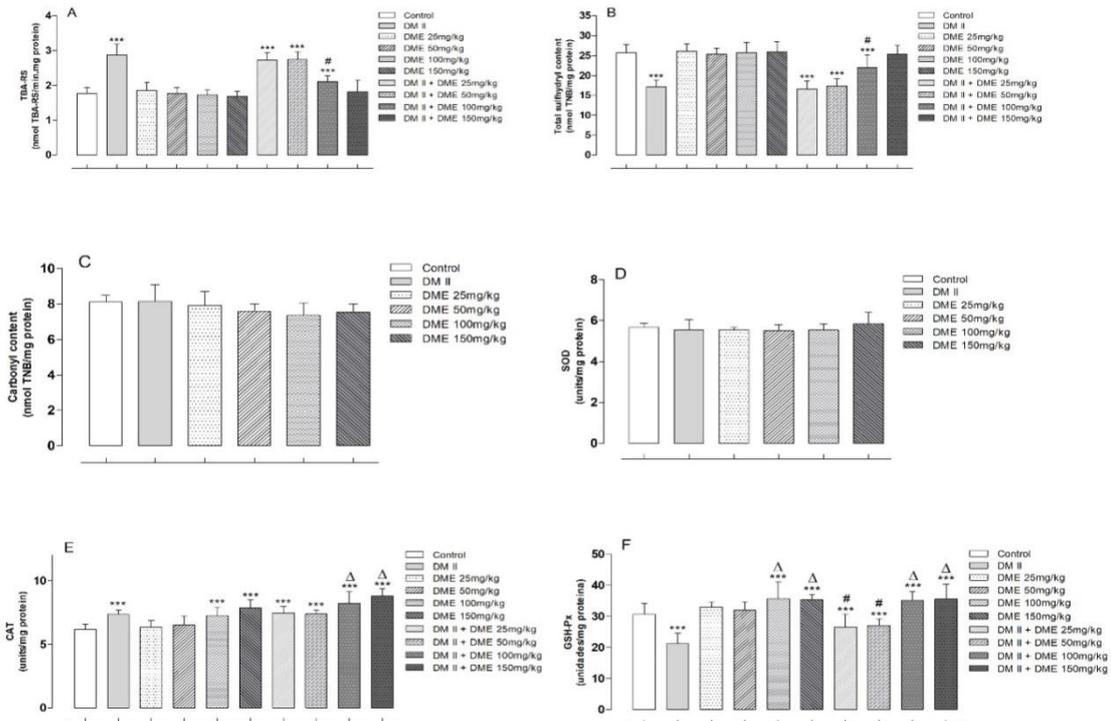


Figure 3. Effect of different DME doses (25, 50, 100 or 150mg/kg) on the effects elicited by DMII on TBA-RS (A) levels, total sulfhydryl content (B), carbonylated proteins (C), SOD (D), CAT (E) and GSH-Px (F) in the blood of 60-day-old Wistar rats. Results are expressed as mean \pm standard deviation for 7 independent (animal) experiments performed in duplicate. *** $p < 0.001$, compared to controls. #: Partial reversed. Δ : Potentiation of the effect.

3.4. Effects of the chronic administration of DME from *M. splendens* on the alterations in the kidney oxidative stress parameters caused by streptozotocin-nicotinamide induced type-2 diabetic in rats

We also investigated the effects of the chronic administration of DME (25, 50, 100 and 150 mg/kg) on the alterations in oxidative stress parameters induced by type-2 diabetes in the kidney of rats. Figure 4 shows that streptozotocin-nicotinamide DMII model did not alter TBA-RS (A) [$F(5,32)=0.525$; $p > 0.05$], total sulfhydryl content (B) [$F(5,32)=0.724$; $p > 0.05$], protein carbonyl content (C) [$F(5,32)=25.351$; $p < 0.001$] and SOD (D) activity [$F(5,32)=0.120$; $p > 0.05$] in the kidney of rats. In contrast, decreased CAT (E) [$F(9,52)= 34.774$; $p < 0.001$] and

GSH-Px (F) activities [F(9,52)=25.410; p<0.001] in this organ. *Post hoc* analysis showed that DME (25, 50, 100 and 150 mg/kg) *per se* did not alter TBA-RS levels, total sulfhydryl content, CAT and SOD activities, when compared to the control groups, while DME at doses of 100 and 150 mg/kg reduced protein carbonyl content and DME at dose of 150 mg/kg increased GSH-Px activity, when compared to the control groups. Additionally, DME treatment at doses of 25 and 50 mg/kg did not reversed CAT (Figure 4E) and GSH-Px (Figure 4) reductions caused by DMII, at doses of 100 mg/kg partially reversed the reduction in CAT activity and at dose of 150 mg/kg totally reversed CAT and GSH-Px reductions.

Figure 4.

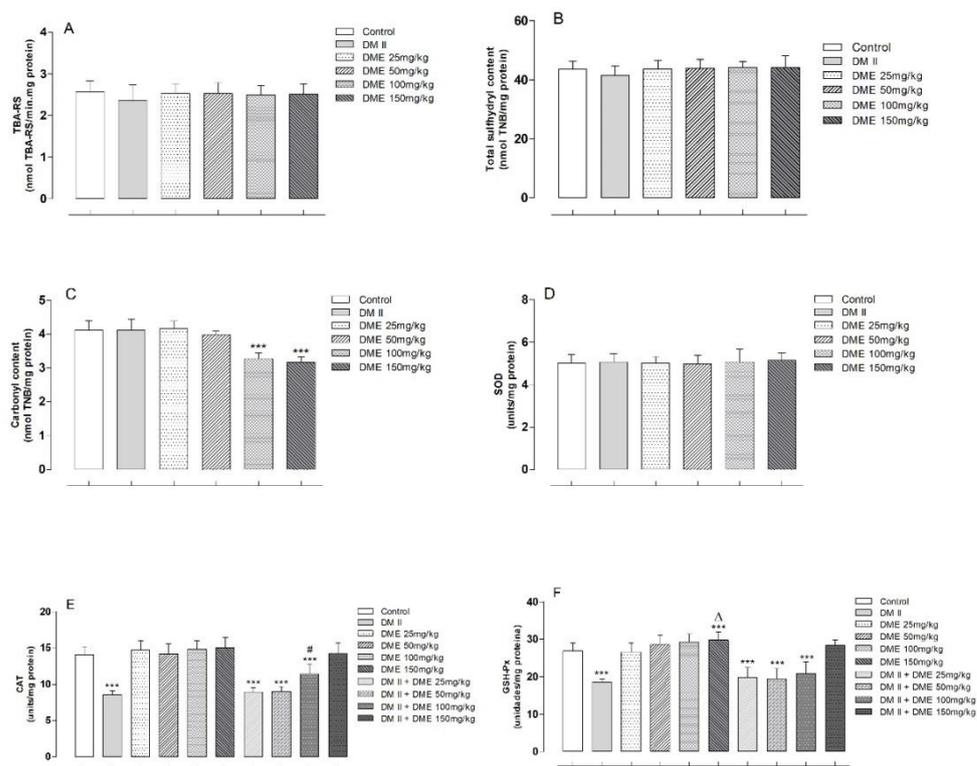


Figure 4. Effect of different DME doses (25, 50, 100 or 150mg/kg) on the effects elicited by DMII on TBA-RS (A) levels, total sulfhydryl content (B), carbonylated proteins (C), SOD (D), CAT (E) and GSH-Px (F) in the kidney of 60-day-old Wistar rats. Results are expressed as mean ± standard deviation for 7 independent (animal) experiments performed in duplicate. *** p<0.001, compared to the control. #: Partial reversed. Δ: Potentiation of the effect.

3.5 Identification of the compounds present in the DME by qualitative analysis using HPLC-ESI-MS/MS

After complete drying of samples, the extract yields were calculated. Leaf EBDM yielded 0.7%. Table 1 shows the results obtained by HPLC-ESI-MS/MS analysis. This technique provides superior specificity and sensitivity when compared to direct injection methods, since modern mass spectrometers are highly sensitive than LC-MS assays. Another advantage is its ability to multiplex multiple analytes in a single analytical run (Pitt, 2009). From forty-seven investigated standards, eleven phenolic compounds were identified in the extract, although the low yield of the EBDM. The compound with the highest amount

found was ellagic acid. Further, protocatechuic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, salicylic acid, isoquercetin ferulic acid, umbelliferone, coniferaldehyde, sinapaldehyde and carnosol were also identified.

Table 1. Identified phenolic ($\mu\text{g g}^{-1}$) in *M. splendens* leaves extracts.

Phenolic compound	Rt (min)	TM (Da)	EM (M-H, m/z)	MS/M S (m/z)	EBDM	Rt =
Protocatecuic acid	6,27	154,1 2	152,9 2	109,00	0,03 \pm 0,005	
Syringic acid	9,91	198,1 7	196,9 3	121,10	1,18 \pm 0,03	
<i>p</i> -Coumaric acid	10,3	164,0 2	162,9 2	119,10	0,28 \pm 0,008	
Ferulic acid	10,6	194,1 5	192,9 5	134,00	0,03 \pm 0,001	
Salicylic acid	10,7	138,1 5	136,9 4	93,00	1,09 \pm 0,008	
Umbelliferone	10,7	162,1 8	160,9 4	133,10	0,05 \pm 0	
Isoquercetin	10,7	464,3 9	463,1 5	300,00	< LOQ	
Coniferaldehyd e	11,2	178,1 4	177,0 1	162,00	0,24 \pm 0,002	
Synapaldehyde	11,3	208,2 3	207,0 4	177,00	0,77 \pm 0,01	
Ellagic acid	11,7	302,1 8	300,9 5	145,00	3,84 \pm 0,08	
Carnosol	13,8	330,4 7	329,1 6	285,20	0,24 \pm 0,014	

Retention time (min); TM = Theoretical mass (Da); EM = Experimental mass (m/z); MS/MS = MS/MS Fragments (m/z); <LOQ = Less than limit of quantification

3. Discussion

The main characteristic of DM is hyperglycemia, causing disturbances in metabolism (Subramanian & Chait, 2012). One of the causes of diabetes complications is oxidative stress, a condition in which antioxidant defenses are not enough to inactivate the reactive species generated (Rains & Jains, 2011). Diabetes is characterized by a series of complications that affect different organs and oxygen free radicals are involved in the pathogenesis of this disease (Maritim *et al.*, 2003). During persistent hyperglycemia of diabetes, there is an increase in oxygen free radical production through glucose self-oxidation, and these radicals exert their cytotoxic effects on membrane phospholipids, resulting in the formation of malondialdehyde (MDA), an end product of lipid peroxidation, which reacts with thiobarbituric acid (Ayoub *et al.*, 2000).

Streptozotocin causes irreversible damage to pancreatic beta cells, generating inability to secrete insulin, justifying its use in research (Zafar *et al.*, 2009). Increased hypertriglyceridemia is associated with diabetes due to metabolic syndrome (Subramanian & Chait, 2012).

Our results showed that administration of streptozotocin/nicotinamide increased serum glucose and triglyceride levels in treated rats, generating diabetes and HTG. Chronic administration of DME for 15 days at doses of 25, 50, 100 and 150 mg/kg did not alter glucose and triglyceride levels and partially reversed, depending on the dose, leading us to believe that a higher dose would be able to reverse hyperglycemia induced by streptozotocin-nicotinamide administration. In addition, DME at 50 mg/kg partially reversed and at 100 and 150 mg/kg completely reversed HTG. Corroborating our data, the study of Bongiolo (2008) showed that treatment with hydroalcoholic extract of *Eugenia uniflora* (500 and 1000 mg/kg), a Myrtaceae species, caused reduction and/or reversed of HTG, suggesting that this hypolipidemic effect was mediated by the flavonoids quercetin and myricetin present in the extract. Furthermore, Santana (2016) and Kala *et al.* (2012) demonstrated that other plants of the same genus, including *Eugenia dysenterica* and *Eugenia floccosa*, also demonstrated a significant reduction in HTG. Also, Prince *et al.* (2003) highlights that the aqueous extract of *Syzygium cumini* (*Eugenia jambolana*) (Myrtaceae) also caused a

reduction in HTG and emphasized that aqueous extracts and ethanolic agents exerted a more significant hypoglycemic effect than glyburide. Yet, the studies by Grover *et al.* (2001), elicit that *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) extracts reduce hyperglycemia, protect a basal glomerular membrane from the deleterious effects of diabetes and inhibit increased urinary volume, albuminuria and renal hypertrophy. Additionally, *Mormodica charantia* extract has been shown to exert a hypoglycemic effect even in the presence of almost complete destruction of pancreatic β cells, signaling a direct insulinomimetic effect (Grover *et al.*, 2001). According to Lima *et al.* (2017), the chronic administration of the hydroalcoholic and acetonc extracts of *Eugenia brasiliensis* reversed HTG, decreased lipid accumulation in the hepatocytes, decreased lipid peroxidation and protein damage in the blood and inhibited alterations in the activities of antioxidant enzymes in the blood and liver of coconut oil-induced HTG rats.

Histopathological findings are according to Konda *et al.* (2019), which observed asymmetrical edges and a decreased in the islets size in diabetic animals due to decreased in β -cells number. Pancreatic β -cells express GLUT-2, which is identified by streptozotocin, so these cells are affected by the toxic effects of streptozotocin (Eleazu *et al.*, 2013). Our results showed that administration of DME from *M. splendens*, at all doses tested showed less cell damage when compared with the diabetic control group. It can be due to antioxidant effect of this extract. A study by Krishnasamy *et al.* (2016) demonstrated that *Syzygium densiflorum*, a Myrtaceae specie, promotes decreased damage caused by streptozotocin in pancreatic tissue.

The extract of *M. splendens* studied here demonstrated similarity on the chemical composition with others of the genus *Myrcia*. Despite this, since phenolic compounds are ubiquitous in most medicinal plants and constitute an essential part of the human diet due to their antioxidant and many other beneficial health properties, the quantification of already known compounds, opens the possibility for further studies of biological potential and it contributes to a better understanding of the secondary metabolism in the *Myrcia* genus (Balasundram *et al.*, 2006).

Although some of the compounds identified in this work have already been cited in the *Myrcia* genus, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid,

umbelliferone, isoquercetin, coniferaldehyde, synapaldehyde and carnosol are reported for the first time in the genus. In addition to the previously mentioned compounds, this was also the first report of the presence of protocatechuic acid and ellagic acid in extracts in leaves of *M. splendens*.

The solvent used during extraction process are reported to have an influence on the nature and the number of secondary metabolites extracted from medicinal plants. Commonly, polar solvents are used to extract phenolic compounds and their glycosides (Dirar *et al.*, 2019). In this work, we used a solvent of medium polarity, and apolar compounds between standards searched, for example ferulic acid and carnosol, were found only in DME. This relation can be attributed to its more apolar structure, to have a greater carbonic chain or smaller number of hydroxyls.

Our results also show that streptozotocin-nicotinamide induced DMII increased TBA-RS and reduced total sulfhydryl content but did not alter the protein carbonyl content in rat plasma. With regard to the kidney, DMII model did not alter TBA-RS, total sulfhydryl and protein carbonyl contents. In addition, DME extract "per se", at doses of 100 and 150 mg/kg, reduced protein carbonyl content and at dose of 150 mg/kg increased GSH-Px activity. Moreover, chronic administration of DME at dose of 100 mg/kg partially reversed and 150 mg/kg totally reversed the increases in TBA-RS levels and the reduction in the sulfhydryl content in the blood of rats. TBA-RS is a lipid oxidation parameter and reflects the amount of malondialdehyde formation, an end product of membrane fatty acid peroxidation. Also, is an important parameter of lipoperoxidation and to measure damage to membrane lipids. Since lipoperoxidation is responsible for change the membrane lipids structure, reducing its selectivity in ionic transport and signaling, impairing its permeability and cellular transport, these alterations in excess, may result in cell death by the release of hydrolytic enzymes and formation of cytotoxic products, such as malondialdehyde (Aksenov & Marksberry, 2001). In addition, total sulfhydryl content is a parameter, which is very important to measure damage to protein. Alterations in protein structures lead to the increase of its fragmentation, aggregation, and susceptibility to degradation by proteasomes (Wendel, 1981; Aebi, 1984).

With regard to the antioxidant enzymes CAT and GSH-Px, chronic administration of DME, at doses of 100 and 150 mg/kg, increased CAT and GSH-Px activities in the blood of rats. Furthermore, DME treatment (25 and 50 mg/kg) did not reversed CAT increases and partially reversed GSH-Px reduction and at doses of 100 and 150 mg/kg, when administrated in animals that received streptozotocin-nicotinamide, increased CAT activity. Also, reversed the decrease in GSH-Px activity induced by diabetes and increased this enzyme activity. Results also showed that DMII model decreased CAT and GSH-Px activities in the kidney of rats. The antioxidant enzymes protects organ from highly reactive hydroxyl radicals. Thus, a reduction in kidney SOD and CAT activities, observed in our study, may lead to an increase in the availability of superoxide (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) in biological systems, enabling the generation of hydroxyl radicals ($OH\cdot$), resulting in the onset and spread of lipid peroxidation (Prince *et al.*, 2003). The DME *per se*, at dose of 150 mg/kg, increased GSH-Px activity. Additionally, DME treatment at doses of 25 and 50 mg/kg did not reversed CAT and GSH-Px reductions caused by DMII, at doses of 100 mg/kg partially reversed the reduction in CAT activity and at dose of 150 mg/kg totally reversed CAT and GSH-Px reductions. Corroborating to our data, Pontes *et al.* (2019), also showed antioxidant activity in different solvents of the leaves of *M. splendens*.

In summary, this study shows that streptozotocin-nicotinamide administration in rats causes DMII and HTG, in association with oxidative stress in the blood and kidneys. Chronic administration of DME of *M. splendens* was able to partially reversed hyperglycemia, totallyreversed HTG, and to reduce lipid peroxidation and protein damage in diabetics rats. In addition, this extract also reversed alterations in the activity of antioxidant enzymes in the blood and kidneys of rats. The data indicate that DME, obtained from *M. splendens* leaves, may have hypoglycemic and hypolipidemic effects and high antioxidant capacity, probably mediated by the action of phenolics present in this extract. However, further studies are needed to assess whether *M. splendens* could be useful as a potential adjuvant for the treatment of hyperglycemia, HTG and oxidative stress in DMII patients.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank Fundação Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB) and Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) – 88887.178154/2018-00 for the financial support and Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) for the partnership.

REFERENCES

- Aebi H. 1984. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p.121–126.
- Aksenov MY, Markesbery, WR. 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 302: 141–145.
- Arumugam G, Manjula P, Paari N. 2013. A review : Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. *Journal of Acute Disease* v. 2, n. 3, 196–200.
- Ayoub Rs, Yousif WH, Aziz BN. 2000. Serum glucose, cholesterol and total lipids levels and tissue lipid peroxidation in alloxan-diabetic rats treated with aqueous extract of *Nigella sativa* seeds. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* v.13, n.1, 43-49.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99: 191–203.
- Barauna SC, Delwing-Dal Magro D, Brueckheimer MB, Maia TP, Döhler AW, Delwing-De Lima D. 2018. Efeitos antioxidantes e antidepressivos de *Eugenia catharinensis* D. Legrand em um modelo animal de depressão induzida por corticosterona. *Doença Cerebral Metabólica*.
- Batista A, Colombo R, Pascoli L C, Teles HL, Silva GH, Bomfim GCC, Burgos RCR, Cavalheiro AJ, Bolzani VD, Silva DHS, Reimberg MCH. 2011. Development and validation of a HPLC method for standardization of herbal and commercial extracts of *Myrcia uniflora*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21: 402-406.
- Bongiolo AM. 2008. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) sobre a hiperglicemia e dislipidemia de ratos diabéticos induzidos por aloxana. *Dissertação Mestrado em Ciências da Saúde*. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brasil.
- Cerqueira MD, de Souza-Neta LC, Guedes MLS, Rivelino R, Cruz FG. 2013. Myrciaine, um novo éster nicotínico de *Myrcia blanchetiana* (Myrtaceae). *Tetrahedron Letters*, 54 (11), 1421-1423.
- Chance B, Green Stein DS, Roughton RJW. 1952. The mechanism of catalase action 1-steady state analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 37, 301-339.

Diabetes SB. 2018. Diretrizes da Sociedade Brasileira de diabetes, 2018-2019; Rio de Janeiro.

Dirar A I, Alsaadi DHM, Wada M, Mohamed M A, Watanabe T, Devkota H P. 2019. Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 120: 261–267.

Eleazu C, Eleazu K, Chukwuma S, Essien, U. 2013. Revisão do mecanismo de morte celular resultante do desafio da estreptozotocina em animais experimentais, seu uso prático e risco potencial para seres humanos. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12 (1), 60.

Ferreira ACF, Neto JC, Da Silva ACM, Kuster RM, Carvalho DP. 2006. Inhibition of thyroid peroxidase by *Myrcia uniflora* flavonoids. *Chem Res Toxicol*, 19: 351-355.

Ferreira VA, Marques S, Campos BDE. 2014. Avanços farmacológicos no tratamento da diabetes tipo 2. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, v. 8, p. 72–78.

Grover JK, Yadav S, Vats V. 2001. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(1), 81–100.

Hashempur MH, Heydari M, Mosavat SH, Heydari ST. 2015. Shams M. Complementary and alternative medicine use in Iranian patients with diabetes mellitus. *J Integr Med*, 13:319–325.

Hou YY, Ojo O, Wang LL, Wang Q, Jiang Q, Shao XY, Wang XH. 2018. A Randomized Controlled Trial to Compare the Effect of Peanuts and Almonds on the Cardio-Metabolic and Inflammatory Parameters in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients*, 10(11), 1565.

Kala MJ, Tresina PS, Mohan VR. 2012. Antioxidant, Antihyperlipidemic and Antidiabetic Activity of *Eugenia floccosa* Bedd Leaves in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 003: 235–240.

Kar A, Choudhary BK, Bandyopadhyay NG. 2003. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 84:105-108.

Konda PY, Dasari S, Konanki S, Nagarajan P. 2019. *In vivo* antihyperglycemic, antihyperlipidemic, antioxidative stress and antioxidant potential activities of

- Syzygium paniculatum* Gaertn. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Heliyon*, 5 (3), 01373.
- Krishnasamy G, Muthusamy K, Chellappan DR, Subbiah N. 2016. Antidiabetic, antihyperlipidaemic, and antioxidant activity of *Syzygium densiflorum* fruits in streptozotocin and nicotinamide-induced diabetic rats. *Pharm Biol.* 54(9): 1716-1726.
- Lima AB, Delwing-De Lima D, Vieira MR, Poletto MZ, Dal Magro DD, Barauna SC, Alberton MD, Pereira EM, Pereira NR, Salamaia EM, Siebert DA. 2017. Hypolipemiant and antioxidant effects of *Eugenia brasiliensis* in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* v 96: 642-649.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: p. 265–275.
- Martin MA, Goya L, Ramos S. 2016. Antidiabetic actions of cocoa flavanols. *Mol. Nutr. Food Res.* 60: 1756–1769.
- Magina MA, Gilioli A, Moresco HH, Colla G, Pizzolatti M G, Brighente CMI. 2010. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Latin American Journal of Pharmacy Am. J. Pharm*, v. 29, n. 3: 376–382.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* v.17: 24–38.
- Marklund S. 1985. Pyrogallol autooxidation. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.* Greenwald, Press boca raton: 243-247.
- Matsuda H, Nishida N. 2002. Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of Myrciacitrins III, VI and V. *Chem. Pharm. Bull.* 50: 429–431.
- Ministério da Ciência, Tecnologia I e C. Legislações do CONCEA. [Internet]. Acesso:<http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>
- Moresco HH, Pereira M, Bretanha LC, Miceb GA, Pizzolatti MG, BrighenteCMI. 2014. Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 4, n. p. 24.
- Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Zinman B. 2009. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetes Care* 32: 193–203.

- Negri G. 2005. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. Rev. Bras. Cienc. Farm. São Paulo, v. 41, n. 2: 121-142.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 95: 351-358.
- Pitt JJ.2009. Principles and applications of liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. Clin Biochem Rev, 30: 19-34.
- Prince PSM, Kamalakkannan N, Menon VP. 2003. *Syzygium cumini* seed extracts reduces tissue damage in diabetic rat brain. J. Ethnopharmacol., v. 84: 205-209.
- Pontes FC, Abdalla VCP, Imatomi M, Fuentes LFG, Gualtieri SCJ. 2019. Atividades antifúngicas e antioxidantes de folhas maduras de *Myrcia splendens* (Sw.) DC. Brazilian Journal of Biology , 79 (1), 127-132.
- Rains JL, Jain SK. 2011. Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. Free Radical Biology and Medicine, 50: 567-575.
- Ramos L, Arnaud E, Ferreira P. 2011. Fatores Emocionais, Qualidade De Vida E Adesão Ao Tratamento Em Adultos Com Diabetes Tipo 2 Emotional Factors, Life Quality and Adhesion. Rev. Brasileira de Crescimento Desenvolvimento Humano, v. 21, n. 91: 867–877.
- Ravi K, Rajasekaran S, Subramanian S. 2005. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food and Chemical Toxicology* 43:1433–1439.
- Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S. 2004. Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. Life Sciences 75: 2717–2731.
- Reznick AZ, Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. Methods Enzymol. 233: 57-63.
- Santana LF. 2016. Efeitos do extrato etanólico das folhas da Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Dissertação Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.
- Sharma A, Kim JW, KU S, Choi JLH. 2019. Anti-diabetic effects of blue honeyberry on high-fed-diet-induced type II diabetic mouse. Ntr Res Pract, 13(5): 367 – 376.

- Sheela N, Jose MA, Sathyamurthy D, Kumar B N. 2013. Effect of silymarin on streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic nephropathy in rats. *Iran J Kidney Dis* 7: 117–123.
- Shestakova MV, Wilding JPH, Wilpshaar W, Tretter R, Orlova VL, Verbovoy AF. 2018. A phase 3 randomized placebo-controlled trial to assess the efficacy and safety of ipragliflozin as an add-on therapy to metformin in Russian patients with inadequately controlled type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 146: 240–250.
- Siebert DA, Mello F, Alberton MD, Vitali L, Micke GA. 2019. Determination of acetylcholinesterase and α -glucosidase inhibition by electrophoretic ally-mediated microanalysis and phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS of fruit juices from Brazilian Myrtaceae *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel and *Eugenia uniflora* L. *Natural Product Research*, 8: 1-6.
- Subramanian S, Chait, A. 2012. Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(5), 819–825.
- Vareda PMP, Saldanha LL, Camaforte NA de P, Violato NM, Dokkedal AL, Bosqueiro JR. 2014. *Myrcia bela* Leaf Extract Presents Hypoglycemic Activity via PI3k/Akt Insulin Signaling Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11.
- Wallenius V, Maleckas, A. 2015. Surgery in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Scandinavian Journal of Surgery*, v. 104, 40–47.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. 2005. Inflamação, estresse e diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 115 (5), 1111-1119.
- Wendel A. 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77: 325–333.
- Who Organization, W. H. 2016. GLOBAL REPORT ON DIABETES. WHO Library Cataloguing-in-Publication, D,Lata, 88.
- Wilson, CA. 2011. Subgeneric classification in *Iris* re-examined using chloroplast sequence data. *Taxon*, V. 60 n.1, 27-35.
- Zafar M, Naeem-ul-hassan N S, Ahmed M, Kaimkhani Z A. 2009. Altered kidney morphology and enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Morphol.*, 27(3): 783-790.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conjunto argumentativo levantado na revisão de literatura justifica a importância do desenvolvimento deste estudo, a necessidade de novas abordagens terapêuticas para a diabetes e a hipertrigliceridemia promovendo o interesse por pesquisas mais aprofundadas para entender o curso da doença e seus prejuízos juntamente com uma estratégia terapêutica inovadora que venha a tornar possível a possibilidade de um tratamento mais eficaz.

Neste estudo foi possível reproduzir a DMII nos animais que resultou em um quadro de hiperglicemia, hipertrigliceridemia e estresse oxidativo, com o aumento dos níveis de TBA-RS, redução do conteúdo total de sulfidrilas e alterações na atividade da SOD, CAT e GSH-Px em sangue e rins de ratos de 60 dias de idade.

Deste modo pode-se evidenciar que a administração intraperitoneal de estreptozotocina-nicotinamida promoveu a hiperglicemia persistente, o aumento de triglicerídeos bem como a lipoperoxidação, danos às proteínas e alterações nas atividades das enzimas antioxidantes, contribuindo assim para elucidar o papel do estresse oxidativo na DMII.

Ao estudar o papel antioxidante do EDM sobre o dano oxidativo causado pela DMII, observou-se a capacidade em diversas concentrações do extrato da prevenção do aumento dos níveis de TBA-RS, na reversão da redução do conteúdo total de sulfidrilas e em várias das atividades das enzimas antioxidantes, como SOD e GSH-PX.

Foi possível evidenciar também a capacidade de reversão do aumento da glicemia e triglicerídeos.

Em conclusão, os resultados obtidos indicam que a DMII leva a um estado de hiperglicemia associado a hipertrigliceridemia e estresse oxidativo, com aumento de radicais livres, e que o em diversas das concentrações utilizadas neste estudo apresentou uma ação de reversão parcial do aumento de glicemia e total no aumento de triglicerídeos além de uma forte atividade antioxidante diante do estresse oxidativo causado pela DMII.

Estes resultados enriquecem e contribuem para um melhor conhecimento do potencial desta planta como também na elaboração de novas possibilidades terapêuticas para o manejo desta doença.

8 REFERÊNCIAS

- ADAMS, L.;FRANCO, MC.; ESTEVEZ, A. G.Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Experimental biology and medicine*. **Maywood, N.J.**, v. 240, n. 6, p. 711–7, 2015.
- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p.121–126, 1984.
- AGARWAL, A. *et al.* Os efeitos do estresse oxidativo na reprodução feminina: uma revisão. **Biologia Reprodutiva e Endocrinologia**, 10 (1), 49, 2012.
- AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer’s disease. **Neuroscience Letters**, 302: 141–145, 2001.
- AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K. Oxidants are a major contributor to aging. **Ann N Y Acad Sci**. Nov 21;663:85–96,1992.
- ANDRADE JÚNIOR,D. R. *et al.* Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60–68, 2005.
- APARECIDA, N.M. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. **Infarma Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 19, p. 32–40, 2007.
- ARTUCH,R.*et al.* A longitudinal study of antioxidant status in phenylketonuric patients. **Clin Biochem.**; 37:198–203, 2004.
- ARUMUGAM, G.; MANJULA, P.; PAARI, N. A review : Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. **Journal of Acute Disease**, v. 2, n. 3, p. 196–200, 2013.
- ATEROSCLEROSE, BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIA E S. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose – 2017. **Sociedade brasileira de Dislipidemia e aterosclerose**, v. 109, 2017.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGUELLES,S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism , and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014.
- AYOUB, R.S.; YOUSIF, W.H.; AZIZ, B.N. Serum glucose, cholesterol and total lipids levels and tissue lipid peroxidation in alloxan-diabetic rats treated with aqueous extract of *Nigella sativa* seeds. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v.13, n.1, p.43- 49, 2000.
- BACKES,J. *et al.* The clinical relevance of omega-3 fatty acids in the

management of hypertriglyceridemia. **Lipids in Health and Disease**, p. 1–12, 2016.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, 99: 191–203, 2006.

BARAUNA, S.C.*et al.* Efeitos antioxidantes e antidepressivos de *Eugenia catharinensis* D. Legrand em um modelo animal de depressão induzida por corticosterona. **Doença Cerebral Metabólica**, 2018.

BARRA, K. *et al.* Estresse oxidativo: conceito , implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. **Revista de Nutrição.**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BATISTA, A.D.*et al.*Development and validation of a HPLC method for standardization of herbal and commercial extracts of *Myrcia uniflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 21: 402-406, 2011.

BAYNES, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **American Diabetes Association**, 40: 405–412, 1991.

BONGIOLO,A.M. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) sobre a hiperglicemia e dislipidemia de ratos diabéticos induzidos por aloxana. [Dissertação]. Criciúma: **Universidade do Extremo Sul Catarinense**; 2008.

BORGES, K.B.;AUTISTA, H.B.;GUILERA, S. Diabetes – Utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento.**Revista Eletrônica de Farmácia**, v. V, n. 2, p. 12–20, 2008.

BRASILEIRA C. S. V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO. **Revista da sociedade brasileira de Cardiologia**, v. 101, 2017.

BRITO,N.R;LAINETTI,R.A. A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro. Rio de Janeiro, Brazil: **Editores Ediouro**, 1996.

BRONCANO,M.;PETRON, M.J.;PARRA, V.;TIMÓN, M. L. Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of free cholesterol oxidation products (COPs) in *Latissimus dorsi* muscle of Iberian pigs. **Meat science**, v. 83, n. 3, p. 431–7, 2009.

BUDOFF, M. Triglycerides and Triglyceride-Rich Lipoproteins in the Causal Pathway of Cardiovascular Disease. **The American Journal of Cardiology**, n. Cv, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de diabetes**, 2018-2019 Rio de Janeiro: 2019.

CARNEIRO, F. M. *et al.* Tendências Dos Estudos Com Plantas Medicinais No Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44–75, 2014.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants , prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds , screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, 2012.

CASCAES, M. M.; MARIA, G.; PINHEIRO, S. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): **A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants**. p. 23881–23904, 2015.

CERQUEIRA, M. D. *et al.* Myrciaine , a new nicotinic ester from *Myrcia blanchetiana* (Myrtaceae). **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 11, p. 1421–1423, 2013.

CHANCE, B.; GREEN STEIN, D.S.; ROUGHTON, R.J.W. The mechanism of catalase action 1-steady state analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 37, 301-339, 1952.

CHARNG, M. *et al.* 2017 Taiwan lipid guidelines for high risk. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 116, n. 4, p. 217–248, 2017.

CHOIA, S.S.; DIEHLA, A. M. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. **Current Opinion Lipidology**. 19(3):295-300, 2008.

COLOME, C.; SIERRA, C.; VILASECA, M.A. Congenital errors of metabolism: cause of oxidative stress? **MédClin**. 115:111–117, 2000.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. R. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and Cancer. **Nature**, v.420, p.1926, 2002.

DALLINGA-THIE, G. M. *et al.* The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. **Atherosclerosis** 211:1–8. 2010.

DELWING, D. *et al.* Protective effect of antioxidants on brain oxidative damage

caused by proline administration. **Neuroscience Research**, 52: 69–74, 2005.

DELWING, D. *et al.* Proline reduces brain cytochrome c oxidase: prevention by antioxidants. **Int J Devl Neuroscience**, 25: 17–22, 2007.

DELWING, D. *et al.* α -Tocopherol and ascorbic acid administration prevents the impairment of brain energy metabolism of hyperargininemic rats. **Cell Mol Neurobiol**, 26: 177–189, 2006.

DIABETES, S.B. Diretrizes da Sociedade Brasileira de diabetes, 2018-2019; Rio de Janeiro, 2019.

DIRAR, A.I. *et al.* Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. **South African Journal of Botany**, 120: 261–267, 2019.

DOBRAKOWSKI, M. *et al.* Glutathione, glutathione related enzymes, and oxidative stress in individuals with subacute occupational exposure to lead. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 235–240, 2016.

DORMANDY, T.L. An Approach To Free Radicals. **The Lancet**, v. 322, p. 1010–1014, 1983.

ELEAZU, C. *et al.* Revisão do mecanismo de morte celular resultante do desafio da estreptozotocina em animais experimentais, seu uso prático e risco potencial para seres humanos. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, 12 (1), 60, 2013.

FERREIRA, A.C.F. Inhibition of thyroid peroxidase by *Myrcia uniflora* flavonoids. **Chem Res Toxicol**, 19: 351–355, 2006.

FERREIRA, A. L. A. .; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, V. A.; MARQUES, S.; CAMPOS, B. D. E. Avanços farmacológicos no tratamento da diabetes tipo 2. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, p. 72–78, 2014.

FONTANA, C.; GASPER, A. L. S. L. Espécies raras e comuns de Myrtaceae da Floresta Estacional Decidual E. v. 65, n. 3, p. 767–776, 2014.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiol Rev** 93: 137–188, 2013.

GOTTLIEB, O.R.; DA SILVA, M.L.; MAIA, J.G.S. Eucalyptin from *Eugenia* and *Myrcia* species. **Phytochemistry**, 11: 1185, 1972.

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, 81(1), 81–100, 2001.

GULSIN, G. *et al.* Relation of aortic stiffness to left ventricular remodeling in younger adults with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 67, n. 7, p. 1395–1400, 2018.

HALLIWELL, B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed J. Department of Biochemistry, National University of Singapore*, 37(3): 99- 105. 2014.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.** 142, 231–55. 2004.

HASHEMPUR, M.H. *et al.* Complementary and alternative medicine use in Iranian patients with diabetes mellitus. **J Integr Med**, 13:319–325, 2015.

HEGELE, R. A.*et al.* Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. **Nat Rev Genet**,10:109–21. 2009.

HEGELE, R.A.*et al.* The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management.**Lancet Diabetes Endocrinol**, 2:655-666. 2014.

HOU, Y.Y. *et al.* A Randomized Controlled Trial to Compare the Effect of Peanuts and Almonds on the Cardio-Metabolic and Inflammatory Parameters in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Nutrients**, 10(11), 1565, 2018.

JANA, K.; BERA, T. K.; GHOSH, D. Antidiabetic effects of *Eugenia jambolana* in the streptozotocin-induced diabetic male albino rat. **Biomarkers and Genomic Medicine**, p. 1–9, 2015.

JAYAPRASAD, B.; SHARAVANAN, P.; SIVARAJ, R. Antidiabetic effect of Chloroxylon swietenia bark extracts on streptozotocin induced diabetic rats. **Elsevier**, [S. l.]16 fev. 2016.

KAKKAR, R. *et al.* Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.151, p.113-119, 1995.

KALA, M.J.; TRESINA, P.S.; MOHAN, V.R. Antioxidant, Antihyperlipidemic and Antidiabetic Activity of *Eugenia Floccosa* Bedd Leaves in Alloxan Induced Diabetic Rats. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**,003: 235–240, 2012.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox biology**. v. 1, n. 1, p. 244-257, 2013.

KAR, A.; CHOUDHARY, B. K.; BANDYOPADHYAY, N.G. 2003. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology** 84:105-108, 2003.

KARKABOUNAS, S. *et al.* Effects of α -Lipoic Acid, Carnosine, and Thiamine Supplementation in Obese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized, Double-Blind Study. **Journal of medicinal food**, v. 0, n. 0, p.2018.0007, 2018.

KAYAMA, Y. *et al.* Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 25234–25263, 2015.

KEANEY, J. F. Obesity and Systemic Oxidative Stress: Clinical Correlates of Oxidative Stress in The Framingham Study. Arteriosclerosis, **Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 3, p. 434–439, 2003.

KEDIA, A. W.; LYNCH, E. Effects of switching from omega-3-acid ethyl esters to icosapent ethyl in a statin-treated patient with elevated triglycerides. v. 5481, n. October, 2015.

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L. O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Critical reviews in toxicology**, v. 45, n. 9, p. 765–98, 2015.

KHAZAEI, M. *et al.* Effects of Resveratrol on Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Expression and Oxidative Stress in the Liver of Rats with Type 2 Diabetes. **Phytotherapy research** : PTR, v. 30, n. 1, p. 66–71, 2016.

KHLEBNIKOV, A. I. *et al.* Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorg. Med. Chem.** 15, 1749–1770, 2007.

KONDA, P.Y. *et al.* 2019. *In vivo* antihyperglycemic, antihyperlipidemic, antioxidative stress and antioxidant potential activities of *Syzygium paniculatum* Gaertn. in streptozotocin-induced diabetic rats. **Heliyon**, 5 (3), 01373, 2019.

KRISHNASAMY, G. *et al.* Antidiabetic, antihyperlipidaemic, and antioxidant activity of *Syzygium densiflorum* fruits in streptozotocin and nicotinamide-induced diabetic rats. **Pharm Biol.** 54(9): 1716-1726, 2016.

KRYSTON, T. B. *et al.* Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutat.Res.**, v. 711, n. 1-2, p. 193-201, 2011.

KUMAR, J. S.S.; MENON, V. P. Efeito do diabetes nos níveis de peróxidos

lipídicos e glicolipídios no cérebro de ratos. **Metabolism**, 42 (11), 1435-1439, 1993.

JANA, K.; BERA, T.K.; GHOSH, D. Efeitos antidiabéticos de *Eugenia jambolana* no rato albino diabético masculino induzido por estreptozotocina. **Biomarkers and Genomic Medicine**, 7 (3), 116-124, 2015.

LAAT, W. L.; JASPERS, N. G. J.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **GENES & DEVELOPMENT** 13:768–785 by **Cold Spring Harbor Laboratory**, 1999.

LEWIN, B. *et al.* Lewin's Genes X. 10. ed. [s.l.] **Jones & Bartlett Publishers**, 2011.

LI, S. *et al.* The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International Journal of Molecular Science**, 16(11): 26087–26124. 2015

LIMA A.B.; *et al.* Hypolipemiant and antioxidant effects of *Eugenia brasiliensis* in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v 96, p. 642-649, 2017.

LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: p. 265–275, 1951.

MADIGAN, M.T. *et al.* Microbiologia de Brock 12^a ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2010.

MAGINA, M. A. *et al.* Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy Am. J. Pharm**, v. 29, n. 3, p. 376–82, 2010.

MARASCHIN, J. D. F. *et al.* Atualização Clínica Classificação da Diabete Melito. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, 2010.

MARIA, P. *et al.* *Myrcia bella* Leaf Extract Presents Hypoglycemic Activity via PI3k / **Akt Insulin Signaling Pathway**, 2014.

MARCHIORI, J. N. C.; SOBRAL, M. Dendrologia das angiospermas: Myrtales. **Santa Maria**, Brazil: Ed. UFSM, 2000.

MARTELLI, F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Artigos e Ensaios**, p. 4, 2015.

MARTINEZ, M. A. R. *et al.* Molecular genetics of non-melanoma skin cancer. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 5, p. 405–419, 2006.

MARTIN, M.A.; GOYA, L.; RAMOS, S. Antidiabetic actions of cocoa flavanols. **Mol. Nutr. Food Res.** 60: 1756–1769, 2016.

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

MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. **Greenwald**: 243-247, 1985.

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of Myrciacitrins III, VI and V. **Chem. Pharm. Bull.**50, 429–431, 2002.

MCINTYRE, T.M.; HAZEN S. L. Lipid Oxidation and Cardiovascular Disease: Introduction to a Review Series. Circulation Research, **Journal of the American Heart Association**,107:1167–1169, 2010.

Ministério da Ciência, Tecnologia I e C. Legislações do CONCEA. **[Internet]**. Acesse:<http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>

MORESCO, H. H. *et al.* Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*.**Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. February, p. 24, 2014.

MOTTA, V. T. Bioquímica clínica para o laboratório: Princípios e Interpretações. 5.ed. Rio de Janeiro: **MedBook**, 2009.

NATHAN, D.M.*et al.* Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. **Diabetes Care** 32: 193–203, 2009.

NEDEL, D. R. Antioxidantes x radicais livres: a influência das vitaminas antioxidantes no retardo do envelhecimento cutâneo. 2005. Monografia- 107 **Curso de Graduação em Farmácia**, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2005.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 121-142, June, 2005 .

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger.6ª ed. Porto Alegre: **Artimed**, 2014.

NEOFYTOU, E. *et al.* DNA Damage Due to Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). **International journal of molecular sciences**. v. 13, n. 12, p. 16853-16864, 2012.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and

the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p.1287–1312 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.** 95: 351-358, 1979.

PAGANO, G. Esteato-hepatite não alcoólica, resistência à insulina e síndrome metabólica: Mais evidências para uma associação etiológica. **Hepatology**, 35 (2), 367-372, 2002.

PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: **Chemical Diversity and Biological Properties**. v. 8, p. 73–94, 2011.

PEREIRA, C.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C.F.R. Extraction, identification, fractionation and isolation of phenolic compounds in plants with hepatoprotective effects. **Journal of the Science of Food Agriculture**. 96: 1068–1084, 2016

PÉRICO, L. *et al.* Can the gastric healing effect of *Eugenia punicifolia* be the same in male and female rats? L. **Journal of Ethnopharmacology**, 2019.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; HAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, 4(2), 89–96, 2008.

PITT, J.J. Principles and applications of liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. **Clin Biochem Rev**, 30: 19-34, 2009.

PIZZINO, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxidative. **Medicine and Cellular Longevity**, volume 2017, [S. I.], 27 jul. 2017.

PONTES, F. C. *et al.* Atividades antifúngicas e antioxidantes de folhas maduras de *Myrcia splendens* (Sw.) DC. **Brazilian Journal of Biology**, 79 (1), 127-132. 07 de maio de 2018.

PRINCE, P. S. M.; KAMALAKKANNAN, N.; MENON, V. P. *Syzigium cumini* seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. **Journal Ethnopharmacol**, v. 84, p. 205-209, 2003.

PRINCE, P. S. M.; MENON, V. P. Antioxidant action of *Tinospora cordifolia* root extract in alloxan diabetic rats. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 213-218, 2001.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, 50: 567-575, 2011.

RAMOS, L.; ARNAUD, E.; FERREIRA, P. Fatores Emocionais , Qualidade De Vida e Adesão Ao Tratamento Em Adultos Com Diabetes Tipo 2 Emotional

Factors , Life Quality and Adhesion. **Rev. Brasileira de Crescimento Desenvolvimento Humano**, v. 21, n. 91, p. 867–877, 2011.

RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food and Chemical Toxicology**.43:1433–1439, 2005.

RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Life Sciences**.75: 2717–2731, 2004.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L.Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**. 233: 57-63, 1994.

REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease (Syndrome X): an expanded definition.**Annu Rev Med**.44:121-131. 1993

REYNERTSON, K. A. *et al.* Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Química Alimentar**, v. 109, p. 883–890, 2008.

RUSCH, J. A. *et al.* Laboratory investigations in lipidology. v. 108, n. 4, p. 266–270, 2018.

SAHEBKAR, A.; CHEW, G. T.; WATTS, G. F. Recent advances in pharmacotherapy for hypertriglyceridemia Progress in Lipid.**Research** 56:47–66, 2014.

SANTANA, L. F. Efeitos do extrato etanólico das folhas da Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina. [Dissertação]. Campo Grande: **Universidade Federal do Mato Grosso do Sul**; 2016.

SANTOS, M. M.; NUNES, M. G. S.; MARTINS, R. D. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 327–334, 2012.

SAÚDE, M. Caderno de Atenção Básica Estratégias para o cuidado da Pessoa com Doença Crônica Diabetes Mellitus. [s.l: s.n.] 2013.

SAÚDE, M. **Plantas Mediciniais** E. Brasília DF: [s.n.]2006.

SCHNEIDER, C. D.; DE OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–316, 2004.

SHARMA, A. K. I. M. *et al.* Anti-diabetic effects of blue honeyberry on high-fed-diet-induced type II diabetic mouse. **Ntr Res Pract**, 13(5): 367 – 376, 2019.

SHESTAKOVA, M. V. *et al.* A phase 3 randomized placebo-controlled trial to assess the efficacy and safety of ipragliflozin as an add-on therapy to metformin in Russian patients with inadequately controlled type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 146, p. 240–250, 2018.

SHING, C. M. *et al.* O efeito de dias consecutivos de exercício nos marcadores de estresse oxidativo. **Fisiologia Aplicada, Nutrição e Metabolismo**, 32 (4), 677-685, 2007.

SIEBERT, D. A. *et al.* Of acetylcholinesterase and α -glucosidase inhibition by electrophoretic ally-mediated microanalysis and phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS of fruit juices from Brazilian Myrtaceae *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel and *Eugenia uniflora* L. **Natural Product Research**, 8: 1-6, 2019.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International**, Edition Engl. 25 1058-1071, 1986.

SIKHAYEVA, N. *et al.* Association between 28 single nucleotide polymorphisms and type 2 diabetes mellitus in the Kazakh population: A case-control study. **BMC Medical Genetics**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2017.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441–451, 2011.

SIMONS, L. A. Modifying therapy. **The Medical Journal of Australia**, p. 1–6, 2019.

STADTMAN, E. R. Role of Oxidant Species in Aging. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 8, 2004.

STAMLER, J.; WENTWORTH, D.; NEATON, J. D. For the MRFIT Research Group: Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 35,822 primary screens of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). **Jama**; 256:2.823-8, 1986.

Subramanian, S.; Chait, A. 2012. Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1821(5), 819–825, 2012.

VAREDA, P. M. P. *et al.* *Myrcia bela* Leaf Extract Presents Hypoglycemic Activity

via PI3k/Akt Insulin Signaling Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 1-11, 2014.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. J. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado. **Brazilian Savanna**, v. 75, n. 4, p. 948–952, 2015.

TORRES, H. C.; PACE, A. E.; STRADIOTO, M. A. Sociodemographic and clinical analysis of individuals with type 2 diabetes and its relation to self-care. **Cogitare Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 48–54 7p, 2010.

VALAIYAPATHI, B.; SUNIL, B.; ASHRAF, A. P. Abordagem da hipertrigliceridemia na população pediátrica. **Pediatrics in Review**, 38 (9), 424-434, 2017.

VALKO, M. *et al.* Free radicals , metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico Biological interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VAN BAKEL, M. M. *et al.* Status de antioxidantes e hormônios da tireóide em pacientes fenilcetonúricos e hiperfenilalaninêmicos deficientes em selênio. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 72 (4), 976–981, 2000.

WALLENIUS, V.; MALECKAS, A. Surgery in the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Scandinavian Journal of Surgery**, v. 104, p. 40–47, 2015.

Wellen, K.E.; Hotamisligil, G. S. Inflamação, estresse e diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, 115 (5), 1111-1119, 2005.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol** 1981;77: 325–333.

ORGANIZATION, W. H. GLOBAL REPORT ON DIABETES. WHO **Library Cataloguing-in-Publication**, Data, p. 88, 2016.

WIESNER, P.; WATSON, K. E. Triglycerides: A reappraisal. **Trends in Cardiovascular Medicine**, 2017.

WILD, S. *et al.* Global prevalence of diabetes: estimatives for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care** 7(5):1047-53, 2004.

WILSON, C. A. Subgeneric classification in Iris re-examined using chloroplast sequence data. **Taxon**, V. 60 n.1, p.27-35, 2011.

YOSHIHARA, D.; FUJIWARA, N.; SUZUKI, K. Antioxidants: Benefits and risks for long-term health. **Maturitas**, v. 67, n. 2, p. 103–107, 2010.

YOSHIKAWA, M. *et al.* Antidiabetic principles of natural medicines. II. **Chem Pharm Bull**, 46: 113-119, 1998.

YOUNG, I. S. Antioxidantes na saúde e na doença. **Journal of Clinical Pathology**, 54 (3), 176–186, 2001.

ZAFAR, M. *et al.* Altered kidney morphology and enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **Int. J. Morphol.** 27(3): 783-790, 2009.

AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: Scheila Medeiros

RG: 4659390

Título da Dissertação: "Avaliação do Potencial Hipoglicemiante, Hipolipemiante e Antioxidante de *Myrcia splendens* em Modelo Animal De Diabetes do Tipo II "

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 28 de Janeiro de 2020.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Scheila Medeiros', written over a horizontal line.

Assinatura do aluno