

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

GABRIELA BORGSMANN

**BIOPROSPECÇÃO E POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE, HIPOLIPEMIANTE E
ANTIOXIDANTE DE *Myrcia pubipetala* NA DIABETES TIPO II**

JOINVILLE 2023

GABRIELA BORGSMANN

**BIOPROSPECÇÃO E POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE, HIPOLIPEMIANTE E
ANTIOXIDANTE DE *Myrcia pubipetala* NA DIABETES TIPO II**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE como requisito para obtenção do título de Mestre.

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

JOINVILLE 2023

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

B733b Borgmann, Gabriela
Bioprospecção e potencial hipoglicemiante, hipolipemiante e antioxidante de *Myrcia pubipetala* na diabetes tipo II/ Gabriela Borgmann; orientadora Dra. Daniela Delwing de Lima. – Joinville: UNIVILLE, 2023.
94 f.: il.
Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)
1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Hiperglicemia. 3. Hipertrigliceridemia. 4. Estresse oxidativo. 5. I. Lima, Daniela Delwing de (orient.). II. Título.
CDD 616.462

Termo de Aprovação

**“Bioprospecção e Potencial Hipoglicemiante, Hipolipemiante e Antioxidante de
Myrcia pubipetala na Diabetes Tipo II”**

por

Gabriela Borgmann

Banca Examinadora:

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

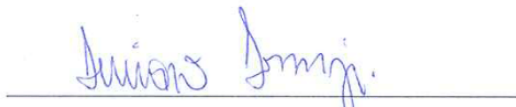
Profa. Dra. Keila Zaniboni Siqueira Batista
(FURB)

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
(UNIVILLE)

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. Luciano Lorenzi
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Joinville, 14 de março de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Isidio (*in memorian*) e Sonia. Pai, você foi o principal responsável pelo caminho acadêmico que construí, foi quem despertou minha paixão pelo conhecimento e garantiu incansavelmente minha educação. Mãe, obrigada pelo amor incondicional que sempre reservou para mim, pelas injeções de confiança e palavras de motivação que foram extremamente necessárias para que eu concluísse essa etapa em minha vida.

Ao meu irmão Fernando, por preencher meus dias com alegria e aguentar todas as minhas versões, inclusive a mais estressada. Sua presença me traz segurança e me faz lembrar que nunca estarei sozinha. À minha avó Maria, que está presente desde os meus primeiros anos de vida e é como uma segunda mãe para mim. À minha cunhada Betina, pelos momentos de descontração e vídeos diários de cachorrinhos.

À minha namorada Nathalia, pelo carinho, companheirismo, compreensão, por acreditar todos os dias - e me fazer acreditar também - na minha capacidade. Por me ensinar a dosar a autocobrança, por se interessar em minha pesquisa ao mesmo tempo em que me lembra de ter momentos de descanso e distração. Pelo apoio e incentivo em todas as atividades científicas que farão de mim uma profissional melhor, mesmo que às vezes isso signifique menos tempo juntas. Por tudo isso e muito mais, obrigada.

Agradeço também aos meus padrinhos Nilton e Rosana, por assegurar que eu continuasse o mestrado após o momento mais difícil que já passei. Sou eternamente grata ao apoio de ambos. Também de toda minha família: avós José e Mafalda, tios, tias, primos e primas.

À Katherine, minha amiga, dupla de estudos e da vida, companheira essencial de congressos científicos e viagens. Só você conhece as disciplinas optativas “Aventuras não planejadas II” e “Arte do improviso III” que fizemos durante o mestrado. Apesar de todas as piadas que acompanham nossa amizade em todos os momentos, eu com certeza não chegaria onde estou sem você, e aguardo ansiosamente pelas próximas aventuras.

Às minhas colegas de trabalho Nathaly, Aline, Ingrid, Ellen, Larissa, Dircélia, Patrícia, e todas as outras meninas do laboratório. Por alegrarem meus

plantões e ouvirem meus desabafos. Vocês nem imaginam o quanto me ajudam com minhas inseguranças, e foram fundamentais na construção desse trabalho.

À minha orientadora, professora Dra. Daniela Delwing de Lima, por me aceitar como orientanda e conduzir os estudos do grupo de pesquisa com tamanha excelência. Agradeço por todo o conhecimento compartilhado e por me guiar no caminho da ciência. À minha ex-professora e agora amiga Magda Helena Soratto Heitich Ferrazza, por me acolher durante a graduação e acreditar em meu potencial. Vocês são inspirações para mim.

Ao meu grupo de pesquisa Mecanismos de Saúde e Doença (MSD – Univille) pelo auxílio durante todas as etapas práticas da pesquisa, pelo acolhimento desde o primeiro dia e pelo companheirismo. Em especial, agradeço à colega Larissa Delmonego pela dedicação com todos os integrantes do grupo e pela oportunidade de realizar o estágio de docência sob sua orientação.

À turma XX do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, pela troca de conhecimentos, parceria e contribuições em minha pesquisa. Aos professores que conheci durante as aulas, que trouxeram questionamentos importantes e contribuíram no desenvolvimento do meu senso crítico.

À Universidade Regional de Blumenau – FURB pela parceria na realização da minha pesquisa, em especial à Claudia Almeida Coelho de Albuquerque e Michele Debiasi Alberton que contribuíram com a análise histológica e caracterização química dos extratos.

À Associação Hospitalar São José de Jaraguá do Sul por incentivar a busca constante por conhecimento e pelo auxílio na realização do mestrado.

À banca de defesa, Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger e Profa. Dra. Keila Zaniboni Siqueira Batista, pela presença e pelas contribuições valiosas.

Aos animais utilizados na pesquisa, que, apesar de sem escolha, contribuíram para o desenvolvimento científico.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização dessa pesquisa.

À UNIVILLE.

“May you always remember to enjoy the
road. Especially when it’s a hard one.”

Kobe Bryant

RESUMO

A diabetes *mellitus* tipo II (DMII) é uma doença crônica de alta prevalência, que está relacionada a complicações como neuropatia, nefropatia, retinopatia e doenças cardiovasculares. Estes agravos são desenvolvidos como consequência da hiperglicemia persistente e estresse oxidativo. A procura por tratamentos alternativos têm aumentado, evidenciando a necessidade de estudos para testar sua eficácia. Estudos recentes têm apontado as propriedades hipoglicemiantes e antioxidantes de extratos do gênero *Myrcia*, *in vitro* e *in vivo*. Há escassos estudos sobre a composição química ou farmacológica da espécie *Myrcia pubipetala*. Os objetivos deste estudo foram verificar os efeitos da administração crônica do extrato hidroalcoólico (EHA) e sua fração aquosa (FA) das folhas de *Myrcia pubipetala* (25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg e 150 mg/kg) sobre as alterações causadas por um modelo animal de DMII induzida por estreptozotocina e nicotinamida sobre a hiperglicemia, hipertrigliceridemia e parâmetros de estresse oxidativo (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas, proteínas carboniladas e enzimas catalase - CAT, superóxido dismutase - SOD e glutathione peroxidase - GSH-Px) em sangue e rins de ratos Wistar; comparar características histopatológicas indicativas de dano às ilhotas pancreáticas em tecidos de DMII com e sem tratamento; quantificar o teor de compostos fenólicos e flavonóides totais presentes no EHA e FA; e avaliar a atividade antioxidante, antiglicante e inibitória enzimática *in vitro* do EHA e FA. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE sob parecer CEUA número 001/2020. Os resultados nos diferentes grupos foram representados como média $\pm$ desvio padrão, utilizando análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post-hoc* de Duncan, sendo que os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A administração de estreptozotocina e nicotinamida aumentou significativamente os níveis de glicose e triglicerídeos séricos e causou danos estruturais nas ilhotas pancreáticas como necrose de células β -pancreáticas e infiltrado inflamatório. Em relação ao estresse oxidativo, o modelo de DMII levou ao aumento de TBA-RS e atividade da CAT, e redução do conteúdo total de sulfidrilas e atividade da GSH-Px no plasma e eritrócitos. Nos rins, houve redução

da atividade enzimática da CAT e GSH-Px. O tratamento com EHA e FA reverteu parcialmente a hiperglicemia induzida (dose-dependente) e reverteu totalmente a hipertrigliceridemia (dose-dependente). Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo plasmáticos e eritrocitários, EHA nas doses de 100 e 150 mg/kg reverteu parcialmente o aumento de TBA-RS e a redução da GSH-Px, e FA 150 mg/kg reverteu totalmente o aumento da atividade da CAT e redução da GSH-Px. Nos rins, tanto EHA quanto FA nas concentrações de 100 e 150 mg/kg reverteram totalmente a redução da atividade da CAT e GSH-Px. A caracterização química de EHA e FA demonstrou conteúdo de componentes fenólicos. EHA também revelou componentes flavonóides. Ambos apresentam atividade antioxidante descrita na literatura através da eliminação de radicais livres. Os testes *in vitro* e *in vivo* demonstraram atividade antioxidante, hipoglicemiante e hipolipemiante de EHA e FA, especialmente nas doses de 100 e 150 mg/kg no modelo animal. Mais estudos são necessários para avaliar a toxicidade, possíveis efeitos colaterais e padronizar concentrações seguras a fim de avaliar a possibilidade de tratamentos complementares de DMII com *M. pubipetala*.

Palavras Chave: Diabetes *mellitus*; Tipo 2; Hiperglicemia; Hipertrigliceridemia; Estresse oxidativo; *Myrcia pubipetala*.

BIOPROSPECTION AND HYPOGLYCEMIANT, HYPOLIPEMIC AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *Myrcia pubipetala* IN TYPE II DIABETES

ABSTRACT

Type II diabetes *mellitus* (DMII) is a highly prevalent chronic disease, which is related to complications such as neuropathies, nephropathies, retinopathies and cardiovascular diseases. These disorders are developed as a consequence of persistent hyperglycemia and oxidative stress. The demands for alternative treatments have increased, highlighting the need for studies to test their effectiveness. Recent studies have pointed out the hypoglycemic and antioxidant properties of extracts of the *Myrcia* genus *in vitro* and *in vivo*. There are few studies on the chemical or pharmacological composition of the *Myrcia pubipetala* species. The objectives of this study were to verify the effects of the chronic administration of the hydroalcoholic extract (HAE) and the aqueous fraction (AF) from the leaves of *Myrcia pubipetala* (25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg and 150 mg/kg) on the alterations caused by an streptozotocin-nicotinamide induced DMII animal model on hyperglycemia, hypertriglyceridemia and oxidative stress parameters (thiobarbituric acid reactive substance - TBA-RS, protein carbonyl content, total sulfhydryl content and antioxidant enzymes catalase - CAT, superoxide dismutase - SOD and glutathione peroxidase - GSH-Px) in Wistar rats blood and kidneys; to compare histopathological damage to the pancreatic islets in DMII rats tissue with and without treatment; to quantify the content of total phenolics and flavonoids compounds present in HAE and AF; and to evaluate *in vitro* antioxidant, antiglycation and enzymatic inhibitory activity of HAE and AF. The Ethics Committee for Animal Research of the University of Joinville Region approved the experiment, under the CEUA protocol number 001/2020. The results in the different groups were represented as mean $\pm$ standard deviation, using analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's *post-hoc* test, with *p* values < 0,05 being considered significant. Streptozotocin-nicotinamide administration significantly increased serum glucose and triglyceride levels and caused structural damage to the pancreatic islets such as beta cells necrosis and inflammatory infiltrate. Regarding oxidative stress, the DMII animal model led to an increase of

TBA-RS and CAT enzyme activity and reduction of total sulfhydryl content and GSH-Px enzyme activity in plasma and erythrocytes. In the kidneys, there was a reduction in CAT and GSH-Px enzymes activity. The HAE and AF treatment partially reverted the induced hyperglycemia (dose dependent) and totally reverted hypertriglyceridemia (dose dependent). 100 and 150 mg/kg of HAE partially reverted the increase of TBA-RS and the reduction of GSH-Px in plasma and erythrocytes oxidative stress parameters, and AF at 150 mg/kg totally reverted the increase of CAT activity and reduction of GSH-Px activity. In the kidneys, both HAE and AF at doses of 100 and 150 mg/kg totally reverted the reduction of CAT and GSH-Px enzymes activity. The chemical characterization of HAE and AF demonstrated phenolics compounds content. HAE also revealed flavonoids compounds. Both of the compounds have been presenting antioxidant activity in literature by scavenging free radicals. *In vitro* and *in vivo* tests demonstrated antioxidant, hypoglycemic and hypolipidemic activity of HAE and AF, specially at doses of 100 and 150 mg/kg. Further studies are needed to evaluate toxicity, possible side effects and standardize safe doses to assess the possibility of complementary treatments of DMII patients with *M. pubipetala*.

Key words: Diabetes *mellitus*; Type 2; Hyperglycemia; Hypertriglyceridemia; Oxidative stress; *Myrcia pubipetala*.

BIOPROSPECCIÓN Y POTENCIAL HIPOGLUCEMIANTE, HIPOLIPEMIANTE Y ANTIOXIDANTE DE *Myrcia pubipetala* EN DIABETES TIPO II

RESUMEN

La diabetes *mellitus* tipo II (DMII) es una enfermedad crónica de alta prevalencia, que se relaciona con complicaciones como neuropatías, nefropatías, retinopatías y enfermedades cardiovasculares. Estos trastornos se desarrollan como consecuencia de la hiperglucemia persistente y el estrés oxidativo. Las demandas de tratamientos alternativos han aumentado, destacando la necesidad de estudios para probar su eficacia. Estudios recientes han señalado las propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes de extractos del género *Myrcia* *in vitro* e *in vivo*. Existen pocos estudios sobre la composición química o farmacológica de la especie *Myrcia pubipetala*. Los objetivos de este estudio fueron comprobar los efectos de la administración crónica del extracto hidroalcohólico (EHA) y la fracción acuosa (FA) de las hojas de *Myrcia pubipetala* (25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg y 150 mg/kg) sobre las alteraciones provocadas por un modelo animal de DMII inducido por estreptozotocina-nicotinamida sobre los parámetros de hiperglucemia, hipertrigliceridemia y estrés oxidativo (substancia reactiva del ácido tiobarbitúrico - TBA-RS, contenido de proteína carbonilo, contenido de sulfidrilo total y enzimas antioxidantes catalasa - CAT, superóxido dismutasa - SOD y glutatión peroxidasa - GSH-Px) en sangre y riñones de ratas Wistar; comparar el daño histopatológico de los islotes pancreáticos en tejido de ratas DMII con y sin tratamiento; cuantificar el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales presentes en EHA y FA; y evaluar la actividad antioxidante, antiglicante y inhibidora enzimática *in vitro* de EHA y FA. El Comité de Ética en Investigación Animal de la Universidad de la Región de Joinville aprobó el experimento, bajo el protocolo CEUA número 001/2020. Los resultados en los diferentes grupos se representaron como media $\pm$ desviación estándar, mediante análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba *post-hoc* de Duncan, considerándose significativos los valores de $p < 0,05$. La administración de estreptozotocina-nicotinamida aumentó significativamente los niveles séricos de glucosa y triglicéridos y causó daños estructurales en los islotes pancreáticos,

como necrosis de células beta y infiltrado inflamatorio. En cuanto al estrés oxidativo, el modelo animal de DMII condujo a un aumento de la actividad de las enzimas TBA-RS y CAT y a una reducción del contenido total de sulfhidrilo y de la actividad de la enzima GSH-Px en plasma y eritrocitos. En los riñones, hubo una reducción en la actividad de las enzimas CAT y GSH-Px. El tratamiento con HAE y FA revirtió parcialmente la hiperglucemia inducida (dependiente de la dosis) y revirtió totalmente la hipertrigliceridemia (dependiente de la dosis). En cuanto a los parámetros de estrés oxidativo plasmático y de eritrocitos, HAE a dosis de 100 y 150 mg/kg revirtió parcialmente el aumento de TBA-RS y la reducción de GSH-Px, y FA a dosis de 100 y 150 mg/kg revirtió totalmente el aumento de la actividad de CAT y la reducción de GSH-Px. En riñones, EHA y FA a dosis de 100 y 150 mg/kg revirtieron totalmente la reducción de la actividad de las enzimas CAT y GSH-Px. La caracterización química de EHA y FA demostró el contenido de compuestos fenólicos. EHA también reveló compuestos de flavonoides. Los dos compuestos han presentado actividad antioxidante en la literatura al eliminar los radicales libres. Ensayos *in vitro* y *in vivo* demostraron actividad antioxidante, hipoglucemiante y hipolipemiante de EHA y FA, especialmente a dosis de 100 y 150 mg/kg. Se necesitan más estudios para evaluar la toxicidad, los posibles efectos secundarios y estandarizar concentraciones seguras para evaluar la posibilidad de tratamientos complementarios de pacientes diabéticos con *M. pubipetala*.

Palabras-claves: Diabetes *mellitus*; Tipo 2; Hiperglucemia; Hipertrigliceridemia; Estrés oxidativo; *Myrcia pubipetala*.

ABREVIATURAS

AlCl₃: Cloreto de alumínio
ANOVA: Análise de variância
ASB: Albumina de soro bovino
BHT: hidroxitolueno butilado
CAT: Catalase
CH₂: Metileno
CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DCNT: Doenças crônicas não transmissíveis
DM: Diabetes *mellitus*
DMI: Diabetes *mellitus* tipo I
DMII: Diabetes *mellitus* tipo II
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNS: Ácido 3,5, dinitro-salicílico
DPPH: 2,2-difenilpicril-hidrazil
DTNB: Ácido ditionitrobenzóico
EHA: Extrato hidroalcoólico
ERN: Espécies reativas de nitrogênio
ERO: Espécies reativas de oxigênio
FA: Fração aquosa
FURB: Universidade Regional de Blumenau
GSH-Px: Glutathione peroxidase
H⁺: Próton hidrogênio
H₂O: Água
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HE: Hematoxilina e eosina
IC₅₀: Concentração inibitória 50 %
M: Myrcia
MDA: Malondialdeído
Na₂CO₃: Carbonato de sódio
NO•: Óxido nítrico

O₂: Oxigênio

O₂•⁻: Radical superóxido

OH•: Radical hidroxil

ONOO⁻: Peroxinitrito

p-NPB: *p*-nitrofenil

pNPG: *p*-nitrofenilglicopiranosídeo

SOD: Superóxido dismutase

TBA-RS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNB: Trinitrobenzeno

UNIVILLE: Universidade da Região de Joinville

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 REVISÃO	21
3.1 Diabetes mellitus	21
3.1.1 Diabetes e pâncreas	22
3.1.2 Diagnóstico	23
3.1.3 Tratamento	24
3.1.4 Complicações	25
3.2 Radicais livres	25
3.2.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	26
3.2 Estresse oxidativo	26
3.2.1 Dano lipídico	27
3.2.2 Dano proteico	27
3.2.3 Dano ao DNA	28
3.3 Antioxidantes	28
3.4 Plantas medicinais	29
3.4.1 Família Myrtaceae	30
3.4.2 Myrcia pubipetala	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 Coleta das folhas de Myrcia pubipetala	32
4.2 Obtenção e fracionamento do extrato hidroalcoólico e fração aquosa	32
4.3 Caracterização química do EHA e da FA	33
4.3.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais	33
4.3.2 Determinação do teor de flavonoides	33
4.4 Ensaios in vitro	34
4.4.1 Determinação da atividade antioxidante in vitro	34
4.4.2 Ensaio de inibição in vitro das enzimas α -glicosidase, alfa-amilase e lipase	34
4.4.3 Determinação da atividade antiglicante in vitro	36
4.5 Modelo animal	37
4.5.1 Indução da DMII	38
4.5.2 Tratamento com EHA e FA	38
4.5.3 Preparo das amostras	39
4.5.4 Análise histológica do pâncreas	39
4.5.5 Dosagens bioquímicas	40
4.6 Análise estatística	42

5 RESULTADOS	43
5.1 Artigo	43
1 INTRODUCTION	46
2 MATERIALS AND METHODS	48
2.1 Plant material	48
2.1.1 Obtaining the crude extract of <i>Myrcia pubipetala</i>	48
2.2 Chemical characterization of the HAE and AF of <i>Myrcia pubipetala</i>	48
2.2.1 Total phenolic compound content determination	48
2.2.2 Flavonoid content determination	49
2.3 In vitro assays	49
2.3.1 In vitro antioxidant activity determination	49
2.3.2 Assays for measuring in vitro inhibition of α -glucosidase, α -amylase and lipase enzymes	50
2.3.3 Measurement of in vitro antiglycant activity	50
2.4 Animal model	50
2.5 Induction of DMII and treatment	51
2.6 Serum preparation	51
2.7 Erythrocyte and plasma preparation	52
2.8 Organ preparation	52
2.9 Pancreatic histological analysis	53
2.10 Biochemical studies	53
2.10.1 Dosage of glucose and triglycerides	53
2.10.2 Catalase (CAT) assay	53
2.10.3 Superoxide dismutase (SOD) assay	54
2.10.4 Glutathione peroxidase (GSH-Px) assay	54
2.10.5 Total sulfhydryl content	55
2.10.6 Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)	55
2.10.7 Protein carbonyl content	55
2.10.8 Protein determination	56
2.11 Statistical analysis	56
3 RESULTS	57
3.1 Chemical characterization of the hydroalcoholic extract and aqueous fraction of <i>Myrcia</i> (M.) <i>pubipetala</i> and in vitro assays of antioxidant activity, inhibition of α -glucosidase, α -amylase and lipase enzyme activities, and antiglycant activity	57
3.2 Effects of the chronic administration of the hydroalcoholic extract and aqueous fraction of <i>Myrcia</i> (M.) <i>pubipetala</i> on glucose and triglycerides levels in streptozotocin-nicotinamide-induced type II diabetic rats	59
3.3 Effects of the chronic administration of the hydroalcoholic extract and aqueous fraction of <i>Myrcia</i> (M.) <i>pubipetala</i> on the histological analysis of pancreases from streptozotocin-nicotinamide-induced type-2 diabetic rats	60
3.4 Effects of the chronic administration of the hydroalcoholic extract and aqueous fraction of <i>Myrcia</i> (M.) <i>pubipetala</i> on alterations in blood oxidative stress parameters in streptozotocin-nicotinamide induced type II diabetic rats	62
3.5 Effects of the chronic administration of HAE and AF from M. <i>pubipetala</i> on kidney oxidative stress parameters in streptozotocin-nicotinamide induced type II diabetic rats	65

4 DISCUSSION	67
5 REFERENCES	73
REFERÊNCIAS	80
ANEXO 1 – OFÍCIO N.º 001/2020 – PRPPG/CEP-CEUA	89
ANEXO 2 – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES	94

1 INTRODUÇÃO

A diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica de alta prevalência. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, no ano de 2021, aproximadamente 536 milhões de pessoas apresentavam DM, sendo que destas, 15,7 milhões são brasileiras (SUN et al., 2022). A DM faz parte das quatro doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) de grande importância para a saúde pública mundial, e está incluída nas medidas da Agenda 2030 para Desenvolvimento Sustentável com a meta de diminuir a mortalidade das DCNT (WHO, 2016).

A mortalidade da DM está associada às complicações desta doença, sendo as principais, neuropatias, nefropatias, retinopatias e doenças cardiovasculares (PAPATHEODOROU et al., 2017), desenvolvidas como consequência da hiperglicemia persistente e consequente estresse oxidativo, comuns na DM (LUC et al., 2019). Um dos principais efeitos do estresse oxidativo, neste sentido, é o comprometimento dos mecanismos de secreção e ação da insulina, que já se encontra danificado no quadro de DM (IGHODARO, 2018; RORSMAN e BRAUN, 2013).

A diabetes *mellitus* tipo II (DMII) é a forma mais comum da doença, caracterizada pela destruição parcial das células β -pancreáticas (COTRAN et al., 1994). Alguns fatores de risco estão associados a maiores chances de desenvolvimento da DMII, como sobrepeso, obesidade e sedentarismo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021). O tratamento não farmacológico para DMII envolve restrição calórica e prática de atividade física, visando diminuir a formação de radicais livres e aumentar a eficácia da insulina (WEI et al., 2018). Quando não suficiente para controlar os níveis de glicemia sanguínea e prevenir complicações, protocolos de tratamento com fármacos hipoglicemiantes e/ou insulina são inseridos no tratamento (WHO, 2021).

Os custos públicos globais para tratamento da DMII aumentaram em 316% nos últimos 15 anos. No ano de 2021, aproximadamente 966 bilhões de dólares foram gastos com prevenção, diagnóstico e tratamento desta doença (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021). Contudo, a procura por tratamentos alternativos têm aumentado, evidenciando a necessidade de estudos

para testar sua eficácia (BHALERAO et al., 2013; MOLLAOGLU e ACIYURT, 2013; AKILEN et al., 2014; HASHEMPUR, 2015).

Tratamentos alternativos são definidos como práticas que não pertencem aos protocolos de tratamento tradicionais estabelecidos para uma doença (KESKIN e BILGE, 2014). Estudos pré-clínicos têm demonstrado ampla variedade de espécies de plantas com aplicação farmacológica no tratamento dos efeitos da DMII (SUBRAMANIAN et al., 2008; REYES et al., 2006; TRIVEDI e RAWAL, 2001; RAFE, 2017). Entre elas, extratos de plantas da família *Myrtaceae*, como *Eucalyptus globulus*, *Eugenia jambolana*, *Syzygium alternifolium* e *Myrcia splendens* (MEDEIROS et al., 2021), têm sido relatadas como alternativas interessantes ou tratamentos adjuvantes com função hipoglicemiante e protetora (NEGRI, 2005).

A família *Myrtaceae* é composta por 133 gêneros, sendo *Myrcia* um dos mais representativos com cerca de 760 espécies (WILSON et al., 2001; DE CERQUEIRA et al., 2009). Registros indicam o uso de plantas deste gênero por indígenas brasileiros como tratamento de doenças crônicas, entre elas a DMII (RUSSO et al., 1990; HASHIMOTO, 1996). Estudos recentes têm apontado as propriedades hipoglicemiantes e antioxidantes de extratos do gênero *Myrcia* *in vitro* e *in vivo*, sendo os efeitos antioxidantes observados em modelos animais de DMII e outras doenças que causam estresse oxidativo, associados ao teor de flavonóides, triterpenos e ácidos fenólicos destas plantas (VAREDA et al., 2014; CASCAES et al., 2015; CASCAES et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021; SHUSTER et al., 2022).

A espécie *Myrcia pubipetala*, conhecida popularmente como “guamirim” ou “araçá” (SOBRAL et al., 2013), é endêmica no Brasil, com ocorrência desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul. Há escassos estudos sobre sua composição química ou farmacológica. Considerando a atividade hipoglicemiante e antioxidante de outras espécies desta família, é possível que extratos e frações de *M. pubipetala* demonstrem potencial no tratamento complementar da DMII e suas complicações, sendo o objetivo deste estudo verificar os efeitos do extrato hidroalcoólico e fração aquosa de *M. pubipetala* sobre alterações provocadas por um modelo pré-clínico de DMII.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar os efeitos da administração crônica do extrato hidroalcoólico (EHA) e sua fração aquosa (FA) das folhas de *Myrcia (M.) pubipetala* sobre as alterações provocadas por um modelo animal de DMII.

2.2 Objetivos específicos

1. Confirmar a indução da DMII após administração de estreptozotocina em ratos;
2. Pesquisar o efeito da DMII sobre a hipertrigliceridemia em sangue de ratos;
3. Verificar o efeito da DMII sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas e de carbonilas em plasma e rins de ratos;
4. Investigar o efeito da DMII sobre a atividade de enzimas antioxidantes em eritrócitos e rins de ratos;
5. Analisar o efeito da administração crônica do EHA e FA (25, 50, 100 e 150 mg/kg) de *M. pubipetala* sobre TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e de carbonilas e atividade de enzimas antioxidantes, em modelo animal de DMII;
6. Comparar características histopatológicas indicativas de dano às ilhotas pancreáticas em tecidos de modelo animal de DMII com e sem tratamento;
7. Determinar quantitativamente os metabólitos secundários presentes no EHA e FA de *M. pubipetala*: teor de compostos fenólicos totais e teor de flavonóides totais;
8. Avaliar a atividade antioxidante, antiglicante e inibitória enzimática do EHA e FA de *M. pubipetala*.

3 REVISÃO

3.1 Diabetes *mellitus*

Os primeiros registros sobre a diabetes que se tem conhecimento foram produzidos no Egito antigo, aproximadamente em 1.552 a.C. por Hesy-Rá, que fez as primeiras descrições dos sintomas desta doença no que posteriormente ficou conhecido como Papiro de Ebers (SHAFRIR, 2001). Cerca de 1.000 anos depois, o físico grego Arateus produziu um trabalho intitulado “Doenças Crônicas e Agudas” que se tornou uma das melhores descrições médicas sobre a diabetes da literatura antiga (PORTER, 1997).

Arateus utiliza o termo grego “diabetes” que deriva da palavra “sifão”, para representar a poliúria causada pela doença (LAIOS et al., 2012; PEUMERY, 1987). Com a contribuição de outros médicos gregos da época, como Galeno e Rufo de Éfeso, já se fazia a relação da diabetes com sede intensa e poliúria, e sabia-se que se tratava de uma doença crônica que afetava os rins (EPHESUS, 1879). A diabetes até então era considerada uma doença rara para aquela população, que seguia uma dieta com baixo teor de sacarose (LAIOS et al., 2012).

Em 1674, Thomas Willis reportou que a urina de pacientes diabéticos era doce ao paladar, e sugeriu que o que estava presente na urina também estaria presente no sangue (PAPASPYROS, 1952). Esta suposição foi confirmada por Robert Wyatt em 1774 e Matthew Dobson em 1776, através de estudos que identificaram a presença de açúcar no sangue e na urina de diabéticos (PAPASPYROS, 1952; DOBSON, 1776). A denominação “*mellitus*” foi adicionada a esta variação da doença, em alusão ao adjetivo “melito”: que contém açúcar (DAS e SHAH, 2011).

Michel Eugène Chevreul identificou o açúcar da urina e sangue de diabéticos como glicose em 1815 (CHEVREUL, 1815) e, posteriormente em 1855, Claude Bernard demonstrou a atividade glicogênica hepática (BERNARD, 1850). Estas descobertas foram base para a sucessão de estudos que viriam nas próximas décadas e levaram à compreensão da função do fígado e pâncreas na fisiopatologia da diabetes *mellitus* (DM) (KAHN et al., 2009).

A *American Diabetes Association* (2018) define a DM tipo I como uma doença crônica caracterizada por níveis altos de glicose sanguínea, causada pela disfunção de células β -pancreáticas e, conseqüentemente, produção insuficiente ou nula de insulina. Este hormônio permite que a glicose presente na corrente sanguínea ingresse nas células, para que sejam convertidas em piruvato ou glicogênio (RACHDAOUI, 2020). Quando este processo sofre interferência da disfunção ou ausência de insulina, o nível de glicose sanguínea aumenta, configurando o quadro de hiperglicemia (RACHDAOUI, 2020).

A diabetes *mellitus* tipo I (DMI) pode ser classificada como idiopática ou com fatores autoimunes, uma vez que há destruição progressiva das células β -pancreáticas pelo sistema imune do próprio organismo (MILECH et al., 2016). Isto prejudica a produção de insulina, que é produzida em baixa quantidade ou nula (ATKINSON et al., 2014). A hiperglicemia decorrente da fisiopatologia da doença pode levar aos sintomas de sede excessiva, poliúria, fadiga, fome constante, perda de peso repentina, visão turva e cetoacidose diabética (ATKINSON et al., 2014; CHERUBINI et al., 2020). O tratamento convencional para a DMI consiste em administração diária de insulina, para permitir o funcionamento do metabolismo da glicose (GUYTON e HALL, 2011).

Por outro lado, a diabetes *mellitus* tipo II (DMII) se caracteriza pela disfunção das células β -pancreáticas, ocasionada por um processo de resistência das células à insulina (COTRAN et al., 1994). Esta condição diminui a funcionalidade da insulina, provocando uma produção acentuada do hormônio pelo pâncreas para suprir sua necessidade. Como consequência, as células β -pancreáticas desenvolvem falhas na sua função produtora de insulina (LEHNINGER, 2002).

3.1.1 Diabetes e pâncreas

O pâncreas possui a função de secretar insulina e glucagon, hormônios que atuam na regulação do metabolismo da glicose. Quando secretada pelas células β -pancreáticas na corrente sanguínea, a insulina permanece em sua

forma livre até que se ligue aos receptores na célula-alvo ou seja eliminada pela enzima *insulinase*. Após estabelecer a ligação insulina-receptor, aumenta-se a captação celular de glicose, que é utilizada como substrato para as funções metabólicas dos carboidratos (GUYTON e HALL, 2011).

O glucagon, hormônio oposto à insulina, é secretado pelas células α das ilhotas de Langerhans. Ao ser inserido na corrente sanguínea, esse hormônio se desloca até as células hepáticas e ativa a enzima *adenilil ciclase*, levando à formação de monofosfato cíclico de adenosina e provocando uma reação de ativação da proteína reguladora da proteinocinase que ativa a proteinocinase que fosforila a fosforilase b convertendo-a em fosforilase a. Este último promove a degradação do glicogênio em glicose-1-fosfato, que é desfosforilada e liberada na corrente sanguínea como glicose (GUYTON e HALL, 2011).

O equilíbrio do sistema insulina-glucagon pode ser desfeito em situações de resistência à insulina, que aumentam os níveis de glicose sanguínea. Para compensar a disfunção da insulina secretada, as células β -pancreáticas aumentam a produção insulínica, e inicia-se um ciclo que resulta no aumento progressivo da resistência ao hormônio (GUYTON e HALL, 2011). O quadro anterior à DMII propriamente dita é denominado pré-diabetes, quando já existe hiperglicemia, mas há possibilidade de reversão. Quando esta situação se prolonga lesionando as células β -pancreáticas, estas se tornam disfuncionais na produção de insulina suficiente para a demanda do organismo, configurando a DMII (KHAN et al., 2019).

3.1.2 Diagnóstico

A sintomatologia da DMII é menos grave quando comparada à DMI, sendo que há casos em que a doença se desenvolve de forma assintomática, uma vez que a hiperglicemia não produz efeitos perceptíveis ao paciente. Nestas situações, o diagnóstico é feito apenas após complicações graves. Quando há início de sintomas leves, podem se caracterizar por polidipsia, poliúria, fadiga, polifagia (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021).

Os principais exames diagnósticos para a DMII são a dosagem de glicose em jejum, curva de tolerância à glicose e hemoglobina glicada, sendo que a

dosagem de glicose sanguínea é o método padrão (WHO e FID, 2020). Pacientes sem sintomas são considerados diabéticos se apresentarem glicose em jejum ≥ 126 mg/dL, glicose 2 horas após sobrecarga de 75 g de glicose ≥ 200 mg/dL ou hemoglobina glicada $\geq 6,5$ %, com necessidade de repetição do exame alterado para confirmação. Na presença de sintomas, a glicose ao acaso ≥ 200 mg/dL confirma o diagnóstico sem necessidade de repetição (WHO, 2020).

A pré-diabetes é diagnosticada se o paciente apresentar glicose em jejum ≥ 100 e < 126 mg/dL, glicose 2 horas após sobrecarga de 75 g de glicose ≥ 140 e < 200 mg/dL ou hemoglobina glicada $\geq 5,7$ e $< 6,5$ %, sem necessidade de repetição (WHO, 2020).

Em caso de impossibilidade da dosagem de glicose sanguínea, pode ser realizado exame de glicose urinária para confirmar suspeita de diabetes em pacientes com sintomas. Entretanto, um resultado negativo pode excluir apenas o diagnóstico de hiperglicemia severa, e não da diabetes em si (FID, 2020; WHO, 2020).

3.1.3 Tratamento

A *American Diabetes Association* (2020) defende que a eficácia do tratamento para DMII depende de fatores como efeito sobre o peso corporal, possíveis efeitos colaterais, custo, risco cardiovascular, complicações microvasculares e preferências do paciente. Na maior parte dos casos, o primeiro método de tratamento envolve a melhoria dos hábitos de vida do paciente, incluindo prática frequente de exercícios físicos, adoção de alimentação saudável e manutenção da saúde mental (YOUNG-HYMAN et al., 2016).

No tratamento da diabetes, os recursos medicamentosos são empregados, geralmente, em um segundo momento da terapêutica, quando da incapacidade de se controlar os níveis glicêmicos, preferencialmente através da prática da dieta e de exercícios físicos. Entre os agentes medicamentosos disponíveis para a terapia da diabetes estão incluídos a insulina e os hipoglicemiantes orais, principalmente, biguanidas, sulfonilureias, glitazonas, inibidores da α -glicosidase, fármacos que mimetizam as incretinas, inibidores da dipeptidil peptidase 4 e

inibidores de co-transportadores sódio/glicose (NATHAN et al., 2009; RAMOS et al., 2011).

3.1.4 Complicações

A progressão da DMII sem diagnóstico ou tratada de forma inadequada pode levar ao desenvolvimento de complicações agudas e crônicas. A complicação aguda de maior gravidade é a cetoacidose diabética, condição causada por hiperglicemia que pode levar à morte se não tratada efetivamente (FORBES e COOPER, 2013). A hiperglicemia persistente pode ainda levar ao desenvolvimento de complicações crônicas como disfunções visuais, renais, neurais, cardiovasculares, além de úlceras de membros inferiores (FORBES e COOPER, 2013; GUYTON e HALL, 2011).

Outra consequência da hiperglicemia constante é o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, levando ao estresse oxidativo que danifica macromoléculas celulares e fosfolipídeos de membrana através de sua citotoxicidade, e contribui para o desenvolvimento de complicações em diferentes tecidos do organismo (MAZZANTI et al., 2003; BAYNES, 1991). Estudos demonstram que o estresse oxidativo é uma das principais causas do desencadeamento de complicações diabéticas induzidas por hiperglicemia (VALKO et al., 2006).

3.2 Radicais livres

Os radicais livres são moléculas ou fragmentos moleculares resultantes do metabolismo fisiológico de mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático, que contém um ou mais elétrons livres nos orbitais atômicos ou moleculares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Possuem alta reatividade e, portanto, atraem elétrons de outros compostos a fim de estabilizarem-se, colaborando para a formação de um novo radical livre (MOOKO, 2022). Esta reação em cadeia, se não neutralizada, leva a danos celulares (VALKO et al., 2006; BALA et al., 2013).

A função fisiológica dos radicais livres produzidos em baixas concentrações está relacionada com defesa contra agentes infecciosos, sinalização celular e indução de resposta mitogênica (VALKO et al., 2006). Quando são produzidos em quantidade excessiva em um organismo com deficiência de antioxidantes, os radicais livres promovem danos biológicos, estabelecendo o estresse oxidativo (RIDNOUR et al., 2005).

3.2.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são assim denominadas por serem radicais livres derivadas do oxigênio (O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Os principais radicais livres de sistemas vivos são ERO (ZHANG et al., 2019). A particularidade de sua configuração eletrônica faz com que ele seja espontaneamente um radical. Durante a transdução de energia no metabolismo energético mitocondrial celular, alguns elétrons escapam para o O_2 prematuramente. A adição deste elétron ao O_2 forma o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que reage com outras moléculas para formar ERO secundárias (VALKO et al., 2006; KOVACIC et al., 2006).

As espécies reativas de nitrogênio (ERN) derivam do radical óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), produto da oxiredução da L-arginina em tecidos biológicos (GHAFOURIFAR e CADENAS, 2005) com função de sinalizador oxidativo na neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa, relaxamento do músculo liso e regulação imunológica (BERGENDI et al., 1999).

As ERO e ERN podem causar danos estruturais e funcionais às células lipídicas, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA), e estão relacionadas a doenças humanas como diabetes, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, cânceres, asma, artrite reumatoide, e ao processo de envelhecimento (VALKO et al., 2006; PHANIENDRA et al., 2015).

3.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e espécies reativas e as defesas antioxidantes. Condições de estresse oxidativo e estresse nitrosativo são promovidas pela produção excessiva de ERO e ERN, respectivamente (RIDNOUR et al., 2004; VALKO et al., 2006). A alta reatividade destes agentes permite que causem danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (DROGE, 2002).

Durante processos inflamatórios, o $\text{NO}\cdot$ e o $\text{O}_2\cdot^-$ podem reagir produzindo peroxinitrito (ONOO^-), agente oxidante capaz de causar danos moleculares e desregular a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CARR et al., 2000). Em situações de disfunção dos peroxissomos, ocorre liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no citosol celular, contribuindo também para o estresse oxidativo (VALKO et al., 2006).

3.2.1 Dano lipídico

As membranas celulares lipídicas podem ser alvos de degradação oxidativa, principalmente os ácidos graxos poliinsaturados de fosfolipídeos, por conterem duplas ligações com grupos metileno (CH_2) que possuem hidrogênios reativos (ENGERS, 2011). A peroxidação lipídica ocorre através de uma reação em cadeia iniciada por um radical livre, que retira um hidrogênio de CH_2 de ácidos graxos levando à formação de um radical livre lipídico centrado em carbono. Após sucessivas reações, formam-se os produtos citotóxicos malondialdeído e 4-hidroxil-nonenal, que causam danos ao DNA e proteínas (MARNETT, 1999).

As reações em cadeia durante a peroxidação lipídica promovem alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares, levando à perda da seletividade em trocas iônicas e liberação do conteúdo de organelas (ŁUCZAJ et al., 2017). Os produtos citotóxicos das reações em cadeia promovem a morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

3.2.2 Dano proteico

A oxidação mediada por ERO em diferentes aminoácidos resulta em diferentes produtos oxidativos, mas a presença de grupos carbonila é considerada biomarcadora de oxidação mediada por ERO (CHEVION et al., 2000). A degradação oxidativa proteica resulta na desnaturação, disfunção e perda de atividade enzimática, receptora e transportadora das proteínas (DALLE-DONNE et al., 2006).

3.2.3 Dano ao DNA

ERO e ERN podem causar degradação oxidativa do DNA nuclear e mitocondrial, sendo o último mais vulnerável às ERO por se localizarem próximos ao local de formação destes radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). As ERO reagem com bases púricas e pirimídicas e desoxirribose, promovendo danos como quebras de fita simples e dupla, produção de purinas modificadas, ligações cruzadas DNA-proteína. A 8-hidroxi-2'desoxiguanosina, principal produto da oxidação do DNA pelo H_2O_2 , é considerada biomarcadora de dano oxidativo ao DNA (BARJA, 2000), tendo seu aumento sido associado com a progressão da diabetes (FUJI et al., 2010).

O OONO⁻ pode interagir com a guanina formando o produto 8-nitroguanina, relacionado à carcinogênese: ao ser emparelhado com a adenina durante a síntese de DNA, promove transversões G-T (HIRAKU et al., 2010).

3.3 Antioxidantes

O sistema de defesa contra estresse oxidativo envolve mecanismos de regulação detox (BHAT et al., 2015), sendo eles prevenção, mecanismos de reparo, defesas físicas e defesas antioxidantes. Em condições normais, existe equilíbrio entre o nível intracelular de antioxidantes, promovendo a sobrevivência do organismo (VALKO et al., 2006).

O sistema de defesa antioxidante é dividido em enzimático e não enzimático. O não enzimático é composto por antioxidantes como ácido

ascórbico, tocoferol, glutathione, ácido lipóico, carotenoides e flavonóides. O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) (PHANIENDRA et al., 2015).

Os constituintes do sistema de defesa enzimático realizam atividade antioxidante preventiva, impedindo a produção de radicais livres (BARBOSA et al., 2010). A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 na presença do próton hidrogênio (H^+) (ACHARYA et al., 1991; ROSS e MOLDEUS, 1991). A GSH-Px catalisa a redução de H_2O_2 em água através da conversão da glutathione reduzida em glutathione oxidada, impedindo a produção de radical hidroxil ($OH^{\bullet}$). Posteriormente, a glutathione é reduzida sob ação enzimática da glutathione redutase, utilizando NADPH formado na via pentose fosfato como substrato (BARBOSA et al., 2010, VALKO et al., 2006). A CAT é uma proteína citoplasmática que também catalisa a redução do H_2O_2 em água (H_2O) e O_2 , prevenindo o acúmulo deste composto tóxico.

3.4 Plantas medicinais

O uso de plantas como agentes medicinais é antigo, sendo que há registros de sua utilização por povos mesopotâmicos em 2.600 a.C. (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). Muitos produtos naturais contribuíram para o desenvolvimento da medicina moderna e estudos com eles resultaram em inovações como antibióticos, agentes anticancerígenos, componentes anti-inflamatórios e analgésicos. Além disso, a variabilidade genética e a renovabilidade das plantas são fatores positivos para a procura de biomoléculas com atividade medicinal (SEN e SAMANTA, 2014).

Um relatório da Organização Mundial da Saúde (2004) divulgou que aproximadamente 80% da população mundial utilizava extratos vegetais ou ervas para tratamentos medicinais no ano de 2004. A segurança do uso de plantas medicinais e a possibilidade de redução de efeitos adversos foram fatores que levaram à sua popularidade nos últimos anos (NIAZIAN et al., 2017; HOWYZEH et al., 2018). Além disso, há comunidades onde as plantas medicinais constituem

um recurso mais acessível em relação a medicamentos alopáticos (MOLLAZADEHA et al., 2019).

Por se tratar de uma doença crônica, a DM é foco importante para pesquisa de novas fontes de tratamento (CECÍLIO et al., 2008). Diversos estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos farmacológicos de plantas e seus extratos no tratamento dos sintomas de DM, como extratos da família *Myrtaceae* (*Eucalyptus globulus*, *Eugenia jambolana* e *Syzygium alternifolium*), que apresentaram resultados positivos para atividade hipoglicemiante e antioxidante (NEGRI, 2005).

3.4.1 Família *Myrtaceae*

A família *Myrtaceae* inclui aproximadamente 6.000 espécies em 132 gêneros, com grande distribuição em regiões tropicais e de temperaturas quentes (CHRISTENHUSZ e BYNG, 2016). O gênero *Myrcia* (M.), por sua vez, compreende aproximadamente 770 espécies, sendo um dos maiores gêneros da família. Suas espécies estão distribuídas do México para o Uruguai, em diferentes biomas e em todas as regiões do Brasil, sendo que a maioria está distribuída na Mata Atlântica, Amazônia brasileira e cerrado com 254, 99 e 91 espécies, respectivamente (FONTANA et al., 2014; SOBRAL et al., 2016).

Espécies de *Myrcia* são utilizadas na medicina popular para muitas doenças como diabetes, aftas e enfermidades gástricas. Estudos têm demonstrado ação hipoglicemiante de extratos e substâncias isoladas de *M. multiflora* (YOSHIKAWA et al., 1998), e outros experimentos relataram que extratos de *M. salicifolia*, *M. sphaerocarpa* DC. e *M. speciosa* obtiveram bons resultados quando utilizados em formulações farmacêuticas para suprimir a hiperglicemia (CASCAES et al., 2015; VAN DEN BERG, 2010; SILVA et al., 2015).

Um grupo de espécies do gênero *Myrcia*, conhecidas no Brasil como “pedra-hume-caá”, “pedra-ume-caá” ou “insulina vegetal”, é tradicionalmente utilizado para tratamento de diabetes, através da infusão de suas folhas ou da planta inteira (SILVA et al., 2015; BASTING et al., 2014; JORGE et al., 2000, MEDEIROS et al., 2021).

Os compostos não voláteis isolados de espécies de *Myrcia* geralmente são flavonóides, derivados de acetofenona, taninos e triterpeno, descritos pela literatura com atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante e antimicrobiana, sendo que os dois primeiros compostos citados demonstraram atividades frente à aldose redutase e inibição da α -glicosidase, explicando em parte seu uso para o tratamento da DM (CASCAES et al., 2015).

3.4.2 *Myrcia pubipetala*

A espécie *Myrcia pubipetala* (sinonímia *Myrcia grandiflora* e *Myrcia fallax*) é conhecida popularmente como “guamirim” ou “araçá” (SOBRAL et al., 2013). Trata-se de uma espécie endêmica no Brasil, com ocorrência desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul. Há escassos estudos sobre a composição química ou farmacológica de suas folhas.

Limberger et al. (2004), realizaram uma análise química de óleos obtidos por hidrodestilação de folhas frescas de espécies de *Myrcia* provenientes do Rio Grande do Sul, incluindo *M. pubipetala* Miq. Todas as espécies demonstraram predominância de sesquiterpenos. A principal via de ciclização observada em *M. pubipetala* foi a do germacreno, sendo observada a presença da substância espatulenol em 32%. O espatulenol possui demonstrações na literatura de propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica contra algumas células tumorais (CHINOUE et al., 1994).

4 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo pré-clínico, quantitativo e experimental. Submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE com aprovação sob parecer CEUA número 001/2020 (Anexo 1). Os autores deste estudo declaram não haver conflitos de interesses.

4.1 Coleta das folhas de *Myrcia pubipetala*

A coleta da espécie *M. pubipetala* foi realizada no município de Blumenau, SC, em parceria com a Universidade Regional de Blumenau (FURB). A espécie foi identificada pelos botânicos André Luiz de Gasper e Marcos Sobral, e a exsicata foi catalogada no herbário Roberto Miguel Klein, da FURB.

4.2 Obtenção e fracionamento do extrato hidroalcoólico e fração aquosa

As folhas de *M. pubipetala* coletadas foram secas à temperatura ambiente e moídas em moinho de facas. A amostra pulverizada foi macerada em álcool etílico 70% para obtenção dos extratos brutos. O processo de maceração foi realizado durante três dias, procedendo-se a filtração e repetindo-se o procedimento mais uma vez. Os extratos resultantes das duas macerações foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida até secagem completa. O extrato bruto, após concentrado, foi ressuspenso em solução hidroalcoólica a 20% e particionado em solventes de polaridade crescente, originando a fração aquosa (FA).

O extrato hidroalcoólico (EHA) e a FA foram encaminhados aos testes de atividade de *M. pubipetala*. As amostras promissoras foram fracionadas para a busca de compostos ativos, sendo submetidas às técnicas de cromatografia em coluna, empregando como eluentes misturas de solventes de grau crescente de polaridade (geralmente misturas de hexano:acetato de etila e acetato de

etila:etanol). Os compostos foram isolados das amostras através dos procedimentos descritos acima e suas estruturas foram determinadas através de técnicas espectroscópicas como infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (HOSTETTMANN et al., 2008).

4.3 Caracterização química do EHA e da FA

4.3.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do reativo de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método descrito por Anagnostopoulou et al. (2006). Foram adicionados às soluções do extrato e fração na concentração de 1000 ppm em metanol, 5,0 mL de água destilada, 0,25 mL do reativo de Folin-Ciocalteu e 1,0 mL da solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Após 1 hora de repouso, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 725 nm. Como branco foi utilizada uma solução sem a presença da amostra, preparada conforme descrito acima. A concentração de fenóis totais foi estimada por interpolação com uma curva de calibração construída com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 25 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diluídas em metanol. O ajuste linear foi confirmado pelo coeficiente de determinação de equação da reta ($y = 0,0013x + 0,0074$, $R^2 = 0,9981$). O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em mg de ácido gálico por g de extrato ou fração seco (mgAG.g^{-1}).

4.3.2 Determinação do teor de flavonoides

A determinação do teor de flavonoides foi realizada conforme descrito por Woisky e Salatino (1998). Em uma alíquota de 0,5 mL de uma solução do extrato bruto e fração na concentração de 1000 ppm diluídos em etanol, foram adicionados 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de uma solução de cloreto de alumínio (AlCl_3 , 2 %). Após 1 hora, as absorbâncias das soluções foram determinadas em

espectrofotômetro em comprimento de onda de 415 nm, utilizando-se etanol como branco. Para o cálculo do teor de flavonóides no extrato bruto e fração, foi confeccionada uma curva de calibração utilizando como padrão o flavonoide quercetina nas concentrações de 6,25 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O ajuste linear foi confirmado pelo coeficiente de determinação da equação da reta ($y = 0,0021x - 0,029$, $R^2 = 0,9993$). O teor de flavonoides foi expresso em mg de quercetina por g de extrato ou fração seco (mgQUE.g^{-1}).

4.4 Ensaio *in vitro*

4.4.1 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

A determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre 2,2-difenilpicril-hidrazil (DPPH) foi baseada no método descrito por Cavin et al. (1998). Em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL das amostras diluídas em etanol, em concentrações de 7,81 até 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi adicionado 1 mL da solução DPPH 4% diluída em metanol. Deixou-se em temperatura ambiente em local escuro durante 30 minutos, e as absorbâncias das soluções foram determinadas por espectrofotometria em comprimento de onda de 517 nm. Foram realizadas uma solução em branco sem a amostra para eliminação da interferência, e o hidroxitolueno butilado (BHT) foi utilizado como padrão nas mesmas concentrações. O potencial de atividade sequestrante do radical DPPH (%) foi calculado da seguinte forma: $1 - (A_s/A_c) \times 100$, onde A_s é a absorbância na presença da amostra e A_c é a absorbância de controle. O valor de IC_{50} (μg de amostra mL^{-1}) é a concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH. O teste foi realizado em triplicata, sendo os resultados expressos em IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) na forma de média $\pm$ desvio padrão.

4.4.2 Ensaio de inibição *in vitro* das enzimas α -glicosidase, alfa-amilase e lipase

O ensaio de inibição da enzima α -glicosidase foi realizado conforme descrito por Kim et al. (2004) e Zhipeng et al. (2011). Todas as amostras foram diluídas em etanol na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em cada tubo de ensaio foi adicionada uma alíquota de 50 μL de solução de α -glicosidase (1U mL^{-1}), 570 μL de tampão fosfato de potássio pH 6,8 (0,1 mol/L) e 20 μL da solução de cada amostra. Depois da incubação a 37,5 °C por 20 minutos, 15 μL de p-nitrofenilglicopiranosídeo (pNPG, 5 mmol L^{-1}) foi adicionado como substrato e a reação teve início. A mistura foi incubada durante 30 minutos em banho a 37,5 °C, seguida da adição de 650 μL de solução de Na_2CO_3 1 mol L^{-1} para o término da reação. Aguardou-se mais 20 minutos. A quantidade de p-nitrofenol formada foi medida a um comprimento de onda de 410 nm em espectrofotômetro, para a estimativa da atividade enzimática. Como padrão foi utilizado uma solução de quercetina a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Um controle negativo, utilizando apenas solvente no lugar da amostra, foi realizado. Para cada amostra foi realizado um teste em branco, onde foi adicionado 20 μL da solução da amostra (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em 570 μL de tampão fosfato de potássio pH 6,8 (0,1 mol L^{-1}). O teste foi realizado em triplicata. O cálculo da atividade inibitória foi efetuado através da equação: $\text{Atividade inibitória (\%)} = 100 - (\text{Abs}_{\text{Am}} - \text{Abs}_{\text{Branco}}) / (\text{Abs}_{\text{Cneg}}) \times 100$, onde Abs_{Am} é a absorbância da amostra, $\text{Abs}_{\text{Branco}}$ é a absorbância do branco e Abs_{Cneg} é a absorbância do controle negativo.

O ensaio de inibição da alfa-amilase foi realizado conforme descrito por Kim et al. (2004) e Zhipeng et al. (2011). Todas as amostras foram diluídas em etanol na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em cada tubo de ensaio foi adicionada uma alíquota de 20 μL de solução de alfa-amilase (40U mL^{-1}), 500 μL de solução de amido (1% em tampão pH 6,9). As amostras foram incubadas em banho-maria a 37,5 °C por 5 minutos. Posteriormente, 500 μL do reagente ácido 3,5, dinitro-salicílico (DNS) foi adicionado às amostras e levado à fervura por 15 minutos. Após resfriado, foi realizada a leitura da absorbância por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm. Como padrão foi utilizado uma solução de acarbose a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Um controle negativo foi realizado, utilizando solvente no lugar da amostra. Para cada amostra foi realizado um teste em branco, onde foi adicionado 10 μL da solução da amostra (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em 500 μL de tampão fosfato de potássio pH 6,9 (20 mmol L^{-1}).

Uma solução de 1020 µL de tampão fosfato de potássio pH 6,9 (20 mmol L⁻¹), 10 µL do solvente e 500 µL do reagente DNS foi utilizada para zerar o equipamento. O teste foi realizado em triplicata. O cálculo da atividade inibitória foi efetuado através da equação: Atividade inibitória (%) = $100 - (Abs_{Am} - Abs_{Branco}) / (Abs_{Cneg}) \times 100$, onde Abs_{Am} é a absorbância da amostra, Abs_{Branco} é a absorbância do branco e Abs_{Cneg} é a absorbância do controle negativo.

O ensaio de inibição da lipase foi realizado conforme descrito por Slanc et al. (2009). Todas as amostras foram diluídas em etanol na concentração de 1000 µg mL⁻¹. Em cada tubo de ensaio foi adicionada uma alíquota de 120 µL de solução de lipase (5 mg mL⁻¹), 1,5 mL de tampão Tris pH 8,5 e 160 µL da solução de cada amostra. Após incubação em banho-maria a 37,5 °C por 5 minutos, foi adicionado 100 µL de solução de *p*-nitrofenilplamitato (PNP) a 3,3 mmol L⁻¹. Incubou-se novamente em banho-maria a 37,5 °C por 15 minutos. Posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405 nm. Como padrão foi utilizado uma solução de Orlistate a 200 µg/mL. No controle negativo foi utilizado solvente no lugar da amostra. Para cada amostra foi realizado um teste em branco, onde foi adicionado 160 µL da solução de amostra (1000 µg mL⁻¹) em 1,5 mL de tampão Tris pH 8,5. O teste foi realizado em triplicata. O cálculo da atividade inibitória foi efetuado através da equação: Atividade inibitória (%) = $100 - (Abs_{Am} - Abs_{Branco}) / (Abs_{Cneg}) \times 100$, onde Abs_{Am} é a absorbância da amostra, Abs_{Branco} é a absorbância do branco e Abs_{Cneg} é a absorbância do controle negativo.

4.4.3 Determinação da atividade antiglicante *in vitro*

A atividade antiglicante foi determinada através da via oxidativa, de acordo com Kiho et al. (2004). Todas as amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1000 µg mL⁻¹. Foi adicionada uma alíquota de 1,4 mL de uma solução de soro albumina bovina (10 mg mL⁻¹, preparada em tampão fosfato pH 7,4), contendo azida de sódio 3 mmol L⁻¹ e 1,4 mL de solução de glioxal (30 mmol L⁻¹, em tampão fosfato pH 7,4) e 300 µL da solução de cada amostra. A mistura foi incubada a 35 °C por 10 dias. Quercetina (1 mg mL⁻¹) foi

usada como controle positivo, e um controle negativo na ausência do inibidor também foi realizado. Cada solução foi mantida no escuro, em um tubo tampado, e a incubação foi realizada em tubos triplicados. A formação de produtos de glicação avançada foi avaliada pela fluorescência característica (comprimento da onda de excitação de 370 nm e comprimento de onda de emissão de 440 nm). A inibição da formação dos produtos de glicação foi calculada de acordo com a fórmula: Porcentagem de inibição da glicação oxidativa (%) = $1 - (Abs_{Am} - Abs_{Branco}) / (Abs_{Cneg}) \times 100$, onde Abs_{Am} é a absorbância da amostra, Abs_{Branco} é a absorbância do branco e Abs_{Cneg} é a absorbância do controle negativo.

4.5 Modelo animal

Foram utilizados ratos *Rattus norvegicus* variedade *albinus*, raça Wistar, sendo todos machos com 60 dias e peso de 280 a 320 g. Os animais foram provenientes do Biotério da FURB, tendo sido desmamados aos 21 dias de idade. Antes do início do processo de experimentação, foram acomodados (4 por gaiola) e aclimatados durante 7 dias para adaptação em um novo meio - onde foram mantidos em um ciclo de 12 horas claro/escuro à 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. As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (1996). Todos os procedimentos com os animais foram realizados única e exclusivamente após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa no uso de animais da Univille.

Após a acomodação e aclimatização dos ratos, os mesmos foram divididos nos seguintes grupos para experimentação: a) controle; b) DMII; c) controle + extrato; d) DMII + extrato ou fração. Sendo que os grupos controle + extrato ou

fração e DMII + extrato ou fração foram subdivididos para o tratamento com as concentrações de 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg e 150 mg/kg.

4.5.1 Indução da DMII

Após jejum de 12 horas, os ratos pertencentes aos grupos DMII e DMII + extrato ou fração receberam uma injeção por via intraperitoneal de nicotinamida (120 mg/kg) e, após 15 minutos, injeção por via intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg) dissolvida em 0,1 M de tampão citrato pH 4,5. A nicotinamida preserva as células β -pancreáticas em até 40 % da citotoxicidade da estreptozotocina, induzindo a DMII (Sheela et al., 2013). Após 72 horas, o nível glicêmico dos animais foi avaliado, e foram considerados diabéticos aqueles com glicemia em jejum superior a 200 mg/dL.

Os ratos pertencentes aos grupos controle e controle + extrato ou fração receberam uma injeção por via intraperitoneal de água (1 mL/kg).

4.5.2 Tratamento com EHA e FA

Os animais receberam o tratamento durante 15 dias consecutivos através de gavagem, obedecendo um intervalo de 24 horas entre um tratamento e outro. Conforme descrito acima, os animais foram divididos em grupos de acordo com o tratamento ao qual foram submetidos. Os grupos controle e DMII receberam água via gavagem uma vez ao dia. Os grupos controle + extrato ou fração e DMII + extrato ou fração receberam EHA e FA das folhas de *M. pubipetala* via gavagem, nas concentrações de 25, 50, 100 e 150 mg/kg. As doses do EHA e FA foram escolhidas com base nos estudos de Kar et al. (2003), Ravi et al. (2005) e Ravi et al. (2004).

Ao final do último tratamento, aguardou-se 12 horas e os animais foram eutanasiados por decapitação na ausência de anestesia. Foi realizada coleta de sangue total para dosagem de glicose, triglicerídeos e parâmetros de estresse

oxidativo, remoção de rins para avaliação de parâmetros de estresse oxidativo e remoção do pâncreas para análise histológica das ilhotas pancreáticas.

4.5.3 Preparo das amostras

O sangue total coletado em tubo com anticoagulante heparina foi centrifugado a 1.000 xg, e o plasma foi separado e congelado. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L cloreto de sódio). Os lisados foram preparados através da adição de 1 mL de água destilada para 100 μ L de eritrócitos lavados e congelados para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

O sangue total coletado em tubo sem anticoagulante foi centrifugado a 1.000 xg e o soro obtido foi separado e congelado.

Os rins foram removidos, descapsulados e mantidos em gelo com tampão salina (154 mM NaCl, 5 mM Tris-HEPES, pH 7,5). O homogeneizado (15 %) (p/v) foi preparado em tampão específico para cada técnica utilizando homogeneizador Potter-Elvehjem 5 pulsos.

4.5.4 Análise histológica do pâncreas

Após eutanásia dos animais, o pâncreas foi removido e fixado em formalina a 10%, e em seguida foi transferido para uma solução de etanol a 70%. O órgão foi desidratado em uma série crescente de banhos de álcool, xilol e preparado para inclusão em parafina para posterior microtomia com cerca de 6 μ m de espessura. Os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE) e analisados em microscopia - Olympus microscope (Olympus CX3).

Foram descritas características histopatológicas que podem indicar dano às ilhotas pancreáticas: presença de inflamação, congestão vascular, fibrose e degeneração vacuolar do núcleo e citoplasma (SHARMA et al., 2019). Cada característica foi graduada em uma escala de severidade que varia de 0 a 3 (0=ausente, 1=poucos/raros, 2=moderado, 3=intenso) adaptado de Zeni et al. (2013).

4.5.5 Dosagens bioquímicas

Para determinação de glicose e triglicerídeos séricos foi utilizado kit Glicose Liquiform e Triglicérides Liquiform (referência 133 e 87 da Labtest Diagnóstica S.A.®, Lagoa Santa, Brasil, respectivamente). As determinações foram realizadas por espectrofotometria em comprimento de onda de 505 nm.

Os homogeneizados preparados com tecido renal foram centrifugados a 3.000 xg a 4 °C durante 15 minutos para remoção de resíduos celulares, antes da determinação da atividade das enzimas antioxidantes, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), proteínas carboniladas e conteúdo total de sulfidrilas.

TBA-RS foi determinado de acordo com o método descrito por Ohkawa et al. (1979). Esta metodologia mensura o malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais livres hidroxil. O rim homogeneizado e o plasma foram misturados com ácido tricloroacético a 20% e ácido tiobarbitúrico a 0,8% e aquecidos em banho de água fervente durante 60 minutos. TBA-RS foi determinado pela absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 535 nm. Uma curva de calibração foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o das amostras. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteína.

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), que se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando o derivado trinitrobenzeno (TNB). Foram adicionados 50 µL de homogeneizado a 1 mL de tampão PBS pH 7,4 com EDTA 1 mM. Após, a reação foi iniciada pela adição de 30 µL de DTNB 10 mM e incubada em local escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos. A determinação foi realizada por espectrofotometria, em comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

A atividade da catalase (CAT) foi ensaiada através do método de Aebi (1984), que baseia-se no desaparecimento de H₂O₂. O meio para esta reação foi preparado com 20 mM de H₂O₂, 0,1 % de Triton X-100, 10 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0 e proteína 0,1-0,3 mg/mL. Utilizou-se 25 µL de amostra e 600

μL do tampão específico. A determinação da atividade enzimática foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 240 nm, onde a absorbância foi registrada a cada 10 segundos durante 1 minuto e 40 segundos. Uma unidade de CAT é definida como 1 μmol de H_2O_2 consumido por minuto e a atividade específica foi calculada como unidades de CAT/mg de proteína.

A atividade de glutathiona peroxidase (GSH-Px) foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando tertbutil-hidroperóxido como substrato. O meio de reação foi preparado com 2 mM de GSH, 0,15 U/mL de GSH redutase, 0,4 mM de azida, 0,5 mM de tertbutil-hidroperóxido e 0,1 mM de NADPH. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm durante 1 minuto e 30 segundos, após adição de 90 μL de amostra no meio contendo 800 μL de tampão, 20 μL de GSH, 30 μL de GSH redutase, 10 μL de azida e 10 μL de NADPH. Decorrido este tempo, foi adicionado 50 μL de tertbutil-hidroperóxido e a absorbância foi registrada durante mais 2 minutos. Uma unidade de GSH-Px é definida como 1 μmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica foi apresentada como unidades de GSH-Px/mg de proteína.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, conforme descrito por Marklund (1985). Foram adicionados 15 μL de amostra a 215 μL de uma mistura contendo 50 μM de tampão Tris pH 8,2, 1 μM de EDTA e 30 μM de CAT. A reação foi iniciada ao adicionar 20 μL de pirogalol. A absorbância foi registrada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos por espectrofotometria em comprimento de onda de 420 nm. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como referência. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogalol e a atividade específica foi apresentada como unidades/mg de proteína SOD.

O teor de carbonilas foi verificado através de um método descrito por Reznick e Packer (1994). Foram adicionados 200 μL de amostra a 400 μL de dinitrofenilhidrazina 10 mM (preparado em HCl 2 M), e mantidas no escuro durante 1 hora, sendo agitadas em vórtex a cada 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 μL de ácido tricloroacético a 20%. A mistura foi agitada em vórtex novamente e centrifugada a 14.000 xg durante 3 minutos, sendo descartado o sobrenadante. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol/acetato

de etila na proporção de 1:1, agitado e centrifugado a 14.000 xg durante 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em 600 µL de guanidina 6 M preparado em solução de fosfato de potássio 20 mM, pH 2,3. A mistura foi agitada em vórtex novamente e incubada a 60 °C durante 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 xg durante 3 minutos e o sobrenadante foi usado para medir a absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 370 nm. Os resultados foram relatados como conteúdo total de carbonilas (nmol/mg de proteína).

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu UV-visível UV 1800.

4.6 Análise estatística

Para os testes *in vitro*, os dados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 e expressos como média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram calculadas pela aplicação de análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido de um procedimento de múltipla comparação (Teste de Tukey). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Para o modelo *in vivo*, os resultados nos diferentes grupos foram representados como média $\pm$ desvio padrão, analisados através do Programa SPSS para Windows, versão 12 (SSPS, Chicago, IL, USA), utilizando 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 RESULTADOS

5.1 Artigo

BIOPROSPECTION AND HYPOGLYCEMIC, HYPOLIPEMIC AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *Myrcia pubipetala* IN TYPE II DIABETES

Gabriela Borgmann¹, Katherine Plautz¹, Larissa Delmonego¹, Alessandra Betina Gastaldi¹, Maria Augusta Schramm do Nascimento³, Eduardo Manoel Pereira³, Ana Helena Loos Moritz⁴, Bruna Gonçalves Lopes⁴, Débora Delwing-Dal Magro^{4,5}, Michele Debiasi Alberton⁴, Cláudia Almeida Coelho de Albuquerque⁵, Daniela Delwing-de Lima^{1,2}

¹Graduate Program in Health and Environment, University of Joinville Region – UNIVILLE, Paulo Malschitzki Street, 10 – North Industrial Zone, Zip Code 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

²Department of Medicine, University of Joinville Region – UNIVILLE, Paulo Malschitzki Street, 10 – North Industrial Zone, Zip Code 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

³Department of Pharmaceutical Sciences, University of Joinville Region – UNIVILLE, Paulo Malschitzki Street, 10 – North Industrial Zone, Zip Code 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

⁴Department of Pharmaceutical Sciences, Center for Health Sciences, Regional University of Blumenau, Antônio da Veiga Street, 140, Zip Code 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

⁵Department of Pharmaceutical Sciences, Center of Health Sciences, Regional University of Blumenau, Antônio da Veiga Street, 140, Zip Code 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

⁶Department of Natural Sciences, Center for Exact and Natural Sciences, Regional

University of Blumenau, Antônio da Veiga Street, 140, Zip Code 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

*Address for correspondence: Dra. Daniela-Delwing de Lima, Department of Medicine, University of Joinville Region, Paulo Malschitzki Street, 10 - North Industrial Zone, Zip Code 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: daniela.delwing@univille.br; danidelwing@hotmail.com

ABSTRACT

This study investigated the effects of the chronic administration of the hydroalcoholic extract (HAE) and the aqueous fraction (AF) of the leaves of *Myrcia pubipetala* (25, 50, 100 and 150 mg/kg) on the alterations incurred in an animal model of diabetes mellitus (DM) II. The effects of the HAE and AF on hyperglycemia, hypertriglyceridemia and oxidative stress parameters (thiobarbituric acid reactive substances [TBA-RS], protein carbonyl content, total sulfhydryl content and antioxidant enzymes catalase [CAT], superoxide dismutase [SOD] and glutathione peroxidase [GSH-Px]) were determined in the blood and kidneys of streptozotocin-nicotinamide-induced DMII Wistar rats. Histopathological damage to the pancreatic islets and the *in vitro* antioxidant, antiglycant and enzymatic inhibitory activities of HAE and AF were evaluated. The contents of phenolic and flavonoid compounds present in the HAE and AF were also determined. Streptozotocin-nicotinamide administration increased serum glucose and triglyceride levels and caused structural damage to the pancreatic islets, inducing beta cells necrosis and inflammatory infiltrate. The model also increased the oxidative stress parameters, TBA-RS and CAT activity, in the plasma and erythrocytes, and reduced total sulfhydryl content and GSH-Px activity. HAE and AF treatment partially reversed hyperglycemia and totally reversed hypertriglyceridemia in the rats and reduced CAT and GSH-Px activities in the kidneys. In the blood, HAE (100 and 150 mg/kg) partially reversed the increase in TBA-RS and the reduction in GSH-Px, and AF (150 mg/kg) totally reversed the increase in CAT activity and the reduction in GSH-Px activity. In the kidneys, both

HAE and AF (100 and 150 mg/kg) totally reversed the reductions in CAT and GSH-Px enzyme activities. The chemical characterization of HAE and AF demonstrated the presence of phenolic compounds and HAE revealed the presence of flavonoids. Both classes of compounds presented antioxidant activity. *In vitro* and *in vivo* tests demonstrated the antioxidant, hypoglycemic and hypolipidemic activities of HAE and AF, especially at the doses of 100 and 150 mg/kg. Further studies are needed to evaluate the toxicity and possible side effects of these extracts and standardize safe doses, to assess the possibility of complementary treatments of DMII patients with *M. pubipetala*.

Key words: Type II diabetes; Hyperglycemia; Hypertriglyceridemia; Oxidative stress; *Myrcia pubipetala*.

1 INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease of high prevalence. According to the International Diabetes Federation, approximately 536 million people had DM in the year of 2021, and 15.7 million of these patients were Brazilian (SUN et al., 2022). DM is part of the four non communicable chronic diseases (NCD) that are considered to be of great importance to world public health, and is included in goals for the 2030 Agenda for Sustainable Development with the aim of lowering NCD mortality (WHO, 2016).

DM mortality is associated with this disease's complications, particularly neuropathy, nephropathy, retinopathy and cardiovascular complications (PAPATHEODOROU et al., 2017), developed as a consequence of persistent hypoglycemia and due to oxidative stress, which is a feature of DM (LUC et al., 2019). One of the main effects of oxidative stress is alterations in insulin secretion, and its mechanism of action, which is already impaired in DM (IGHODARO, 2018; RORSMAN and BRAUN, 2013). *Diabetes mellitus* type II (DMII) is the most common form of DM and is characterized by the partial destruction of the pancreatic β -cells (COTRAN et al., 1994). Some risk factors are associated with higher chances of developing DMII, such as being overweight, obesity and a sedentary lifestyle (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021). Non-pharmacological treatment for DMII involves calorie restriction and the practice of physical activities, aiming to lower the production of free radicals and raise the efficiency of insulin (WEI et al., 2018). When this treatment is not enough to control blood glycemic levels and prevent complications, treatment protocols with hypoglycemic and/or insulin drugs are introduced into the treatment regime (WHO, 2021)

The global public cost for the treatment of DMII rose by 316% in the last 15 years. In 2021, approximately 966 billion dollars were spent on the prevention, diagnosis and treatment of this disease (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021). However, the search for alternative treatments continues, and studies are needed to test for the efficacy of new therapeutic approaches (BHALERAO et al., 2013; MOLLAOGLU and ACIYURT, 2013; AKILEN et al., 2014; HASHEMPUR, 2015).

Alternative treatments are defined as practices that do not belong to the traditional treatment protocols that are established for a disease (KESKIN and BILGE, 2014). Pre-clinical studies have shown that a wide variety of plant species may have pharmacological potential for the treatment of DMII (SUBRAMANIAN et al., 2008; REYES et al., 2006; TRIVEDI and RAWAL, 2001; RAFE, 2017). The Myrtaceae family is composed of 133 genus, where *Myrcia* is one of the most representative with around 760 species (WILSON et al., 2001; DE CERQUEIRA et al., 2009). Reports indicate the use of plants of this genus by Brazilian Indians as a treatment for chronic diseases, including DMII (RUSSO et al., 1990; HASHIMOTO, 1996). Recent studies have indicated that the extract of the genus *Myrcia* has hypoglycemic and antioxidant properties both “*in vitro*” and in animal studies of DMII and other diseases that cause oxidative stress, due to the flavonoid, triterpene and phenolic acid contents of these plants (VAREDA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2021; CASCAES et al., 2021; CASCAES et al., 2015; SHUSTER et al., 2022).

The species *Myrcia pubipetala* (*M. pubipetala*), popularly known as “guamirim” or “araçá” (SOBRAL et al., 2016), is endemic in Brazil, and can be found across the country from the state of Bahia to Rio Grande do Sul; however, there are few studies in the literature regarding the chemical composition or pharmacological properties of this plant. As such, the objectives of this study were to quantify the content of total phenolic and flavonoid compounds present in the hydroalcoholic extract (HAE) and in the aqueous fraction (AF) of leaves of *M. pubipetala* and to characterize the effects of the chronic administration of these HAE and AF extracts on DMII-induced alterations, namely hyperglycemia, hypertriglyceridemia and oxidative stress, in the blood and kidneys of 60-day old diabetic rats. The study also aimed to evaluate, *in vitro*, the antioxidant, antiglycation and enzymatic inhibitory activities of the HAE and AF extracts on the α -glucosidase, α -amylase and lipase enzymes and to investigate histopathological damage the in pancreatic islets of animals treated with these fractions.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant material

Leaves from *M. pubipetala* were collected in Blumenau, Santa Catarina state, Brazil (26° 53' 55.2" S, 49° 04' 41,3" W) and identified by Dr. André Luiz de Gasper from the Natural Sciences Department of Regional University of Blumenau – FURB and Dr. Marcos Sobral from the Federal University of Minas Gerais – UFMG. A voucher specimen was deposited in the Dr. Roberto Miguel Klein Herbarium of the same institution under number FURB 00607. After collection, the plant material was dried under room temperature and weighed.

2.1.1 Obtaining the crude extract of *Myrcia pubipetala*

The dried material was macerated in 70% ethyl alcohol for 3 days and filtered to yield hydroalcoholic crude extract (HAE). The maceration was repeated one more time. Solvent was evaporated in a rotary evaporator (60 °C) under reduced pressure. The crude extract was concentrated, resuspended in hydroalcoholic solution at 20% and defatted with ethyl acetate. The resulting fraction yielded the water fraction (AF).

2.2 Chemical characterization of the HAE and AF of *Myrcia pubipetala*

2.2.1 Total phenolic compound content determination

The total phenolic compound content was determined using Folin-Ciocalteu reagent, according to the method described by Anagnostopoulou et al. (2006). Five mL of distilled water, 0.25 mL of Folin-Ciocalteu and 1.0 mL of saturated sodium carbonate solution (Na_2CO_3) were added to the HAE and to the AF. After 1 hour, absorbances were determined in a spectrophotometer at 725 nm. As a

blank, we used a solution without the sample prepared as described above. The total phenol concentration was estimated by interpolation with a calibration curve constructed with standard solutions of gallic acid at concentrations of 25 to 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diluted in methanol. The linear fit was confirmed by the determination coefficient of the straight-line equation ($y = 0.0013x + 0.0074$, $R^2 = 0.9981$). The total phenolic compound content was expressed in mg of gallic acid per g of extract or fraction (mgAG.g^{-1}).

2.2.2 Flavonoid content determination

Flavonoid content determination was performed as described by Woisky and Salatino (1998). In an aliquot of 0.5 mL of a solution of the extract and fraction at a concentration of 1000 ppm diluted in ethanol, 2.5 mL of ethanol and 0.5 mL of aluminum chloride solution (AlCl_3 , 2 %) were added. After 1 hour, the absorbances of the solutions were determined in a spectrophotometer at 415 nm, using ethanol as a blank. To calculate the flavonoid content in the extract and in the fraction, a calibration curve was prepared using the flavonoid quercetin as standard at concentrations of 6.25 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The linear fit was confirmed by the coefficient of determination of the straight-line equation ($y = 0.0021x - 0.029$, $R^2 = 0.9993$). The flavonoid content was expressed in mg of quercetin per g of extract or dry fraction (mgQUE.g^{-1}).

2.3 *In vitro* assays

2.3.1 *In vitro* antioxidant activity determination

The antioxidant activity was determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical, based on the method described by Cavin et al. (1998). The test was performed in triplicate and the results were expressed as mean $\pm$ standard deviation of IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

2.3.2 Assays for measuring *in vitro* inhibition of α -glucosidase, α -amylase and lipase enzymes

The assays to determine inhibition of the α -glucosidase, α -amylase and lipase enzymes were performed as described by Kim et al. (2004) and Zhipeng et al. (2011). The inhibition of α -amylase assay was performed as described by Kim et al. (2004) and Zhipeng et al. (2011). The lipase inhibition assay was performed as described by Slanc et al. (2009). All tests were performed in triplicate.

2.3.3 Measurement of *in vitro* antiglycant activity

The anti-glycation activity of the fractions was determined through the oxidative pathway, as described by Kiho et al. (2004). The test was performed in triplicate.

2.4 Animal model

Male Wistar rats (280-320 g), obtained from the Central Animal House of the Regional University of Blumenau, Blumenau, Brazil, were used in the experiments. The animals were weaned at 21 days of age. Before the experiments, the animals were housed and acclimated for 7 days to allow adaptation to their new environment and were maintained on a 12 hour light/12 hour 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 11794, October 8, 2008, and the other norms applied to teaching and/or research, especially the Normative Resolutions of the National Council of Control and 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 001/2020.

2.5 Induction of DMII and treatment

For DMII induction, rats that had been fasted for 12 hours received an injection of streptozotocin (60 mg/kg; i.p.) dissolved in 0.1M citrate buffer (pH 4.5), 15 minutes after the administration of nicotinamide (120 mg/kg; i.p.). Nicotinamide preserves the β -pancreatic cells from 40% of the cytotoxicity of streptozotocin, inducing DMII (SHEELA et al., 2013). In control rats, alone was injected. After 72 hours, animals' glycemic levels were evaluated using a strip-operated blood glucose sensor G-TECH free light. The animals were considered diabetic when fasting blood glucose was over 200 mg/dL (SHEELA et al., 2013).

The rats were divided into groups, as follows: Control group: received water by intraperitoneal (i.p.) injection once and water orally (by gavage) once a day for 15 days; DMII group: received one i.p. injection of streptozotocin (60 mg/kg; i.p.) dissolved in 0.1M citrate buffer (pH 4.5), 15 minutes after nicotinamide administration (120 mg/kg; i.p.) and water by gavage once a day for 15 days; Control + extract/fraction groups: received an i.p. injection of water once and HAE or AF from *Myrcia pubipetala* (25, 50, 100 or 150 mg/kg) by gavage, once a day for 15 days; DMII + extract/fraction groups: received one i.p. injection of streptozotocin (60 mg/kg; i.p.) dissolved in 0.1M citrate buffer (pH 4.5), 15 minutes after nicotinamide administration (120 mg/kg; i.p.) and HAE or AF from *Myrcia pubipetala* (25, 50, 100 or 150 mg/kg) by gavage, once a day for 15 consecutive days for chronic treatment, with 24 hour intervals between administrations. After this period, the animals were sacrificed by decapitation in the absence of anesthesia, and blood, kidneys and pancreases were collected and removed for glucose, triglyceride, oxidative stress and histological analysis. The doses of HAE and AF (25, 50, 100 and 150 mg/kg) were chosen based on studies by Kar et al. (2003) and Ravi et al. (2004, 2005).

2.6 Serum preparation

Serum was prepared from total blood samples obtained from rats. Peripheral blood was collected rapidly and transferred to tubes without anticoagulant, centrifuged at 1 000 RPM for 10 minutes, and the serum was then separated and used for the analysis of biochemical parameters (LIMA et al., 2017).

2.7 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 µL washed erythrocytes and maintained frozen at -80 °C until determination of the antioxidant enzyme activities (LIMA et al., 2017).

For measurement of antioxidant enzyme activities, erythrocytes were frozen and thawed three times, and then centrifuged at 13 500 RPM for 10 minutes. The supernatant was diluted in order to contain approximately 0.5 mg/mL of protein (LIMA et al., 2017).

2.8 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 centrifuging at 800 RPM for 10 minutes at 4 °C for discarding nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was saved in aliquots and stored at -80 °C for further measurement of parameters of oxidative stress (LIMA et al., 2017).

2.9 Pancreatic histological analysis

After sacrificing the animals, the pancreases were removed and fixed in 10 % formalin for 24 hours and then transferred to 70 % ethanol solution. Subsequently, pancreases were passed through solutions with increasing concentrations of alcohol and xylene, and embedded in paraffin for routine histology procedures. Sections of 6 µm of pancreas were stained with hematoxylin and eosin (HE) and sections were analyzed under an Olympus microscope (Olympus CX3).

Histopathological characteristics that may indicate pancreatic islet damage were described as; presence of inflammation, vascular congestion, fibrosis and vacuolar degeneration of nucleus and cytoplasm (SHARMA et al., 2019). Each of these characteristics was graded on a severity scale of 0 to 3 (0=absent, 1=few/rare, 2=moderate, 3=intense), adapted from Zeni et al. (2013).

2.10 Biochemical studies

2.10.1 Dosage of glucose and triglycerides

Glucose and triglycerides were dosed using Glucose and Triglycerides Liquiform kits (Labtest Diagnóstica S.A.®, Lagoa Santa, Brazil). Absorbance was determined using a UV-vis Shimadzu spectrophotometer at 505 nm, following the manufacturer's package insert.

2.10.2 Catalase (CAT) assay

CAT activity was established by the method of Aebi (1984). This method is based on the disappearance of hydrogen peroxide (H₂O₂) in a reaction medium

composed of 25 μL of sample and 600 μL of 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 20 mM H_2O_2 . The absorbance was counted every 10 seconds for 1 minute and 40 seconds at 240 nm using a spectrophotometer. One CAT unit corresponds to 1 μmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg of protein.

2.10.3 Superoxide dismutase (SOD) assay

The activity of SOD was assayed by the method described by Marklund (1985), which uses a process that is highly dependent on superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$), a substrate for SOD. Fifteen μL of each sample were 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 were added and absorbance was measured every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm, using a spectrophotometer. Inhibition of the 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 of protein.

2.10.4 Glutathione peroxidase (GSH-Px) assay

The GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (1981), using tert-butyl hydroperoxide as substrate. The decomposition of NADPH was controlled in a spectrophotometer at 340 nm for 3 minutes and 30 seconds. Ninety μL of each sample were added to medium containing 800 μL of buffer, 20 μL of 2.0 mM GSH, 30 μL of 0.15 U/mL GSH reductase, 10 μL of 0.4 mM azide, and 10 μL of 0.1 mM NADPH. Absorbance was measured every 10 seconds for 1 minute and 30 seconds. Subsequently, 50 μL of 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide were added and the absorbance was read for 2 more minutes. One GSH-Px unit is characterized as 1 μmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is defined as GSH-Px units/mg of protein.

2.10.5 Total sulfhydryl content

The total sulfhydryl content was determined, according to the method of Aksenov and Markersbery (2001), which is based on the reduction of dithionitrobenzoic acid (DTNB) by thiols. The reaction generates a yellow derivate (TNB) that is measured spectrophotometrically at 412 nm. For the assay, 50 μ L of homogenate or plasma were 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. Analysis of a blank (DTNB absorbance) was also performed. The results were expressed as nmol of TNB/mg of protein.

2.10.6 Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS were determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979). This methodology for the analysis of TBA-RS measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, generated mainly by hydroxyl free radicals. Initially, plasma or 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 minutes. TBA-RS were measured by determining 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 nmol of MDA/mg of protein.

2.10.7 Protein carbonyl content

Protein carbonyl content was assayed by a method described by Reznick and Packer (1994), based on the reaction of protein carbonyls with

dinitrophenylhydrazine to form dinitrophenylhydrazone, a yellow compound that is measured spectrophotometrically at 370 nm. Two hundred μL of homogenate or plasma were added to plastic tubes containing 400 μL of 10 mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2M HCl). Samples were kept in the dark for 1 hour and vortexed every 15 minutes. Subsequently, 500 μL of 20 % trichloroacetic acid were added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14 000 RPM for 3 minutes and the supernatant obtained was discarded. The pellet was then washed with 1 mL ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v), vortexed and centrifuged at 14 000 RPM for 3 minutes. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 600 μL of 6M guanidine (prepared in a 20 mM potassium phosphate solution, pH 2.3), before vortexing and incubating at 60 °C for 15 minutes. Samples were then centrifuged at 14 000 RPM for 3 minutes and the supernatant was used to measure absorbance at 370 nm in a quartz cuvette. Results were reported as carbonyl content (nmol/mg of protein).

2.10.8 Protein determination

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

2.11 Statistical analysis

All data obtained from *in vitro* analyses were analyzed using GraphPad Prism version 5.0 and are expressed as means $\pm$ standard deviation. Statistically significant differences between groups were calculated by applying one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a multiple comparison procedure (Tukey test). P values < 0.05 were considered significant. Each experiment was performed in triplicate. Results of the histological analysis were tabulated and are expressed as means $\pm$ standard error, and statistically evaluated by ANOVA, considering $p < 0.05$ as significant.

The results for the different *in vivo* groups are represented as mean $\pm$ standard deviation, analyzed using SPSS for Windows, version 12 (SPSS, Chicago, IL, USA), using analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's *post-hoc* test, for comparing the means of the groups, with *p* values < 0.05 being considered significant.

3 RESULTS

3.1 Chemical characterization of the hydroalcoholic extract and aqueous fraction of *Myrcia (M.) pubipetala* and *in vitro* assays of antioxidant activity, inhibition of α -glucosidase, α -amylase and lipase enzyme activities, and antiglycant activity

The chemical characterization of the HAE and AF extracts demonstrated the presence of total phenolic compounds in both the HAE and the AF, as shown in Table 1. With regard to flavonoids, some flavonoid content was observed in the HAE, but no detectable flavonoid content was found in the AF.

Table 1. Total phenolic compounds (mg AG g⁻¹) and flavonoid content (mg QUE g⁻¹) in the HAE and AF of the *M. pubipetala* leaves.

Sample	Total phenolic content (mg AG g ⁻¹)*	Total flavonoid content (mg QUE g ⁻¹)*
HAE	48.10 $\pm$ 1.98 ^a	8.30 $\pm$ 0.74 ^a
AF	35.70 $\pm$ 8.05 ^b	0 $\pm$ 0 ^b

*mg AG g⁻¹ = Total phenolic content expressed in mg of gallic acid *per* g of extract or fraction. *mg QUE g⁻¹ = Total flavonoid content expressed in mg of quercetin *per* g of extract or fraction. Different letters mean statistically different values (*p* <0.05).

In vitro analysis of the HAE showed an elevated DPPH radical inhibition capacity, when compared to the radical inhibition capacity of AF, and even when compared to a positive control, as seen in Table 2. The HAE and AF extracts demonstrated some antiglycant activity, but this was lower than that of the positive control.

Table 2. DPPH radical inhibition capacity (expressed as IC_{50} , $\mu\text{g mL}^{-1}$) and antiglycant activity (%) of the HAE and AF of the leaves of *M. pubipetala*.

Sample	DPPH (IC_{50})*	% Antiglycant activity*
HAE	34.00 ± 2.64^a	48.08 ± 1.41^a
AF	135.70 ± 18.69^b	50.20 ± 0.40^a
Positive control	15.16 ± 0.90^a	83.88 ± 1.57^b

* IC_{50} = concentration required to inhibit 50% of the DPPH radical ($\mu\text{g mL}^{-1}$). *% inhibition equivalent to the concentration of 1 mg mL^{-1} . Different letters mean statistically different values ($p < 0.05$). Positive control: BHT for DPPH; quercetin for antiglycant assay.

The *in vitro* inhibition of enzymes (α -glucosidase, α -amylase and lipase) by the HAE and AF extracts was also investigated. Table 3 shows that both HAE and AF present elevated capacities for α -glucosidase inhibition (98.87 ± 0.90 and 100.88 ± 0.85 %, respectively) when compared to the positive control (64.76 ± 0.10). The α -amylase inhibition capacity of the HAE was higher than that of AF in our assays (68.14 ± 7.80 and 47.40 ± 3.14 %, respectively). With regard to the lipase enzyme, the HAE and AF extracts demonstrated lower inhibition capacities (24.41 ± 5.23 and 14.63 ± 0.87 , respectively), when compared to the positive control (70.15 ± 1.53).

Table 3. Inhibition of the activities of the enzymes, α -glucosidase, α -amylase and lipase, by the HAE and the AF of *M. pubipetala* leaves.

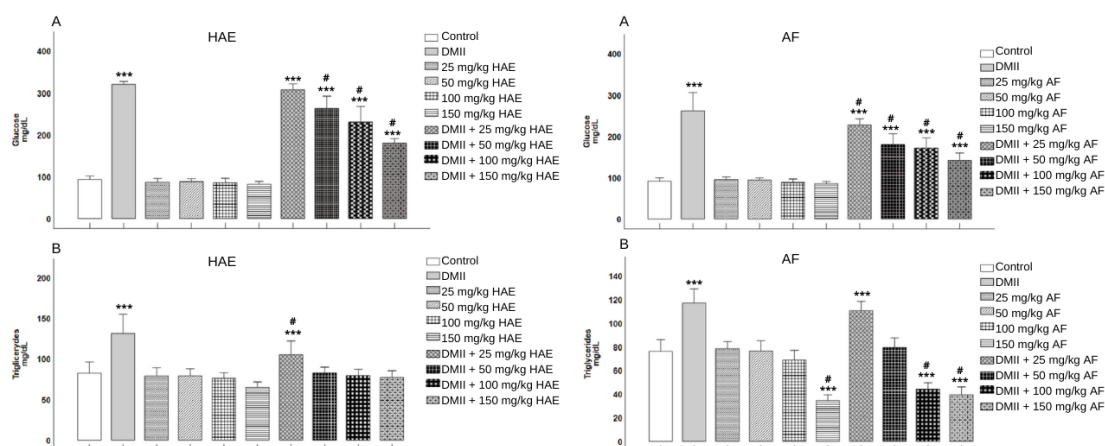
Sample	% α -Glucosidase inhibition*	% α -Amylase inhibition*	% Lipase inhibition*
HAE	98.87 ± 0.90^a	68.14 ± 7.80^a	24.41 ± 5.23^a
AF	100.88 ± 0.85^a	47.40 ± 3.14^b	14.63 ± 0.87^a
Positive control	64.76 ± 0.10^b	---	70.15 ± 1.53^b

*Different letters mean statistically different values ($p < 0.05$). *% inhibition equivalent to the concentration of 1 mg mL^{-1} . Positive control: quercetin for α -glucosidase; orlistat for lipase.

3.2 Effects of the chronic administration of the hydroalcoholic extract and aqueous fraction of *Myrcia (M.) pubipetala* on glucose and triglycerides levels in streptozotocin-nicotinamide-induced type II diabetic rats

We investigated the effects of the chronic administration of the HAE and AF (25, 50, 100 and 150 mg/kg) extracts obtained from the leaves of *M. pubipetala* on glucose and triglyceride levels in the serum of type-2 diabetic rats. Figure 1 shows that streptozotocin-nicotinamide administration significantly enhanced glucose (A) ($F(9,58)=231.322$; $p<0.001$) and $F(9,60)=61.363$; $p<0.001$) and triglycerides (B) levels ($F(9,58)=14.597$; $p<0.001$ and $F(9,60)=71.490$; $p<0.001$), respectively, in the serum of rats, when compared to the control groups. The chronic administration of HAE (50, 100 and 150 mg/kg) and AF (25, 50, 100 and 150 mg/kg) partially reversed, in a dose-dependent manner, the hyperglycemia induced by streptozotocin-nicotinamide administration. With regard to the hypertriglyceridemia induced by the DMII animal model, HAE partially reversed (25 mg/kg) and totally reversed (50, 100 and 150 mg/kg) triglycerides. AF, at a dose of 50 mg/kg, totally reversed hypertriglyceridemia and, at 100 and 150 mg/kg, reversed and reduced triglyceride levels. In addition, the *post hoc* analysis showed that chronic administration of HAE and AF at doses of 25, 50, 100 and 150 mg/kg per se did not alter glucose levels. With regard to triglyceride levels, only AF at a dose of 150 mg/kg reduced triglycerides per se.

Figure 1. Effects of the HAE and FA (25, 50, 100 or 150 mg/kg) extracts on glucose and triglyceride levels in type II diabetic rats.



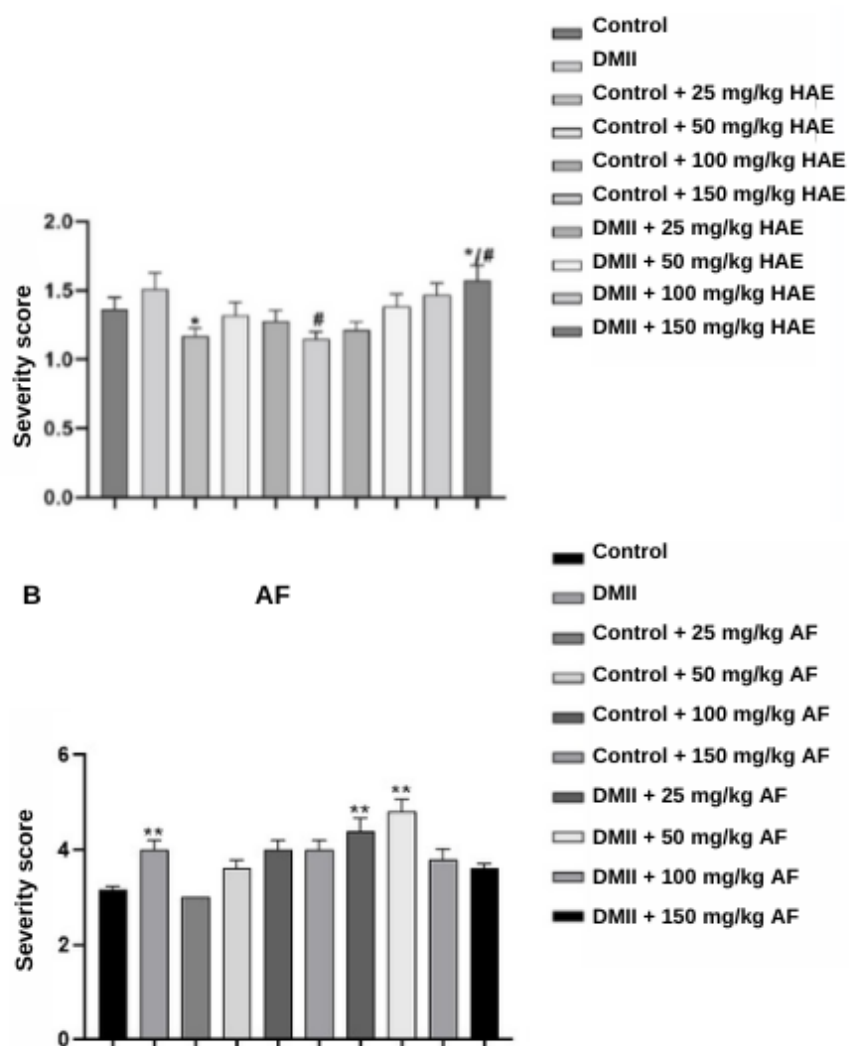
HAE: (A) Glucose and (B) triglyceride levels in the serum of 60-day-old Wistar rats. AF: (A) Glucose and (B) triglyceride levels in the serum of 60-day-old Wistar rats. Results are expressed as means $\pm$ SD (ANOVA and Duncan's multiple range test). *** $p < 0.001$, compared to control; #: partially reversed.

3.3 Effects of the chronic administration of the hydroalcoholic extract and aqueous fraction of *Myrcia (M.) pubipetala* on the histological analysis of pancreases from streptozotocin-nicotinamide-induced type-2 diabetic rats

The analysis of the pancreatic islets showed differences in the morphological aspects analyzed. Severity scores were higher in the DMII induced group, as seen in Figure 2. Structural observations revealed necrosis of beta cells and infiltrates of lymphocytes and macrophages. Significant differences were observed between the non-diabetic and diabetic groups that were treated with 150 mg/kg of the HAE.

With regard to the AF, histopathological analysis comparing the non-diabetic group with the diabetic group (Figure 2B) showed an increase in severity scores. Structural observations revealed necrosis of beta cells and inflammatory infiltrates of lymphocytes and macrophages. AF (25 mg/kg) per se demonstrated a protective effect against cellular alterations. This characteristic wasn't observed for AF at concentrations of 50, 100 and 150 mg/kg, when compared to the diabetic group. In the diabetic groups treated with AF, at doses of 100 and 150 mg/kg, results showed decreased cell damage caused by DMII, and mean severity scores were similar to those of the control group. AF, when used at 25 and 50 mg/kg, did not prevent cell damage in the pancreatic islets of diabetic rats.

Figure 2. Severity scores observed in the pancreatic islets of rats from the control group, the DMII-induced group, and the groups treated with the HAE or AF of *Myrcia (M.) pubipetala*.



(A) HAE, (B) AF. Results are expressed as means $\pm$ SE (ANOVA). * $p < 0.001$, compared to control.

The architecture of the pancreases of non-diabetic rats that were not treated with HAE generally appeared as normal with rare incidences of vascular congestion. In comparison, histopathological analysis of the pancreases of non-diabetic rats treated with HAE 150 mg/kg and 25 mg/kg also appeared normal, or even with fewer abnormalities. In the pancreases of non-diabetic rats treated with 50 mg/kg and 100 mg/kg HAE, a higher degree of inflammation was observed, when compared to the groups of non-diabetic rats that were also treated with HAE.

Histopathological analysis of the pancreases of untreated diabetic rats showed cellular disorganization, when compared to the other groups, where

several pancreatic cells with vacuolated cytoplasm were observed, as well as tissue fibrosis. Pancreases of diabetic rats treated with 150 mg/kg and 100 mg/kg HAE showed more cellular vacuolation and congestion than those treated with 25 mg/kg and 50 mg/kg HAE, suggesting protection against the effects of DMII at these doses.

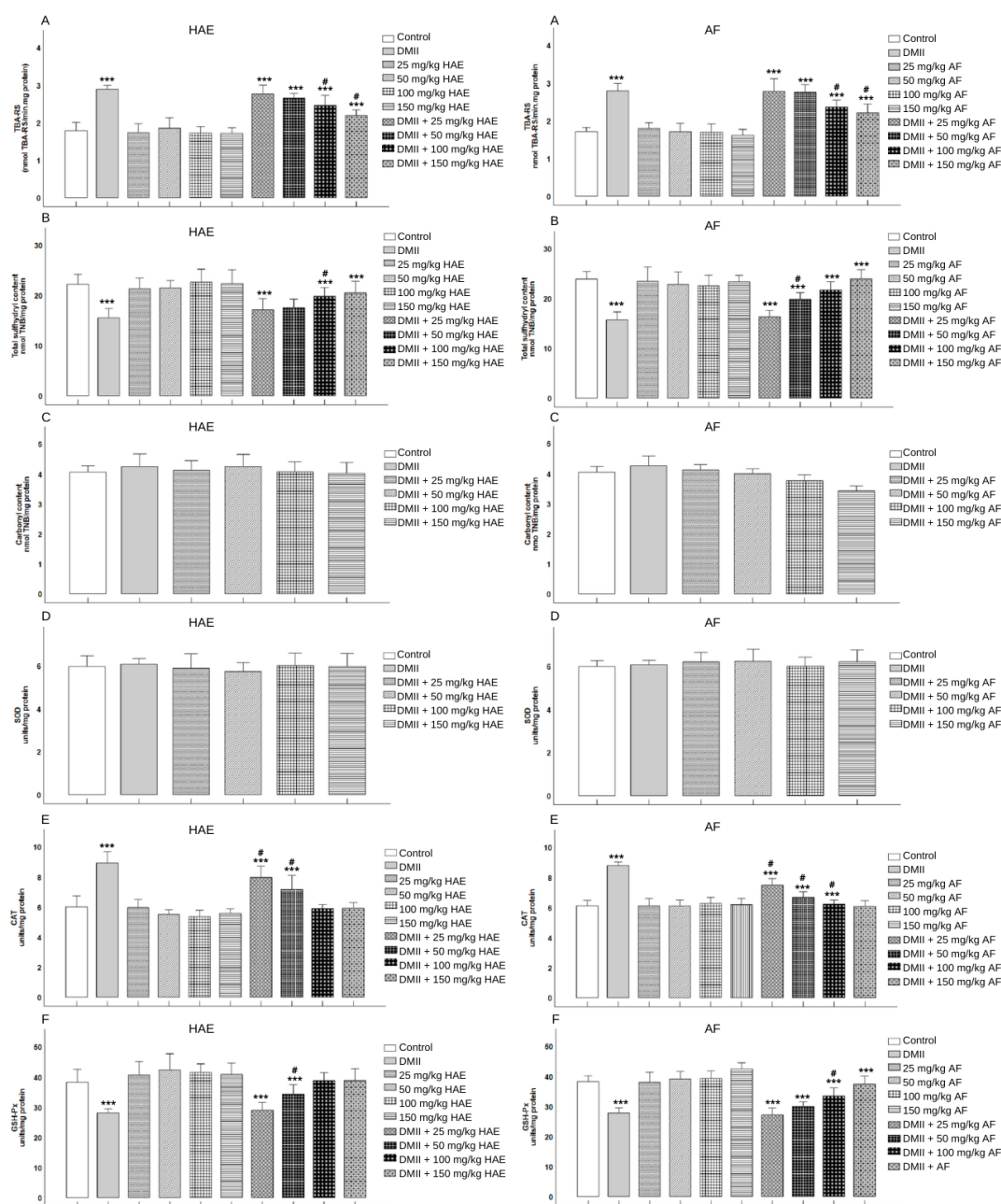
3.4 Effects of the chronic administration of the hydroalcoholic extract and aqueous fraction of *Myrcia (M.) pubipetala* on alterations in blood oxidative stress parameters in streptozotocin-nicotinamide induced type II diabetic rats

We next investigated the effects of the chronic administration of HAE or AF (25, 50, 100 and 150 mg/kg) on the alterations in TBA-RS, total sulfhydryl content, protein carbonyl content and antioxidant enzyme activities that were caused by type-2 diabetes in the blood of rats. As can be seen in Figure 3, the streptozotocin-nicotinamide DMII model increased TBA-RS (A; $F(9,58)=33.468$; $p<0.001$ and $F(9,60)=33.634$; $p<0.001$), reduced total sulfhydryl content (B; $F(9,58)=8.408$; $p<0.001$ and $F(9,60)=15.895$; $p<0.001$), did not alter protein carbonyl content (C; $F(5,36)=0.429$; $p>0.05$ and $F(5,36)=12.172$; $p<0.001$) or SOD activity (D; $F(5,36)=0.313$; $p>0.05$ and $F(5,36)=0.375$; $p>0.05$), increased CAT activity (E; $F(9,58)=24.977$; $p<0.001$ and $F(9,60)=31.444$; $p<0.001$), and reduced GSH-Px activity (F; $F(9,58)=11.442$; $p<0.001$ and $F(9,60)=29.912$; $p<0.001$). *Post hoc* analysis showed that HAE and AF *per se* did not alter the TBA-RS levels, total sulfhydryl content, SOD and CAT activities, when compared to the control groups. HAE also did not alter protein carbonyl content and GSH-Px activity. Moreover, AF at doses of 100 and 150 mg/kg reduced, *per se*, protein carbonyl content and, at a dose of 150 mg/kg, increased GSH-Px activity. The chronic administration of HAE at doses of 25 and 50 mg/kg did not reverse the increase in TBA-RS levels, but partially reversed this increase at 100 and 150 mg/kg (Figure 5A). HAE partially reversed and totally reversed (at 100 mg/kg and 150 mg/kg, respectively) the reduction in plasma sulfhydryl content (Figure 3B) in rats. With regard to the antioxidant enzyme, CAT (Figure 3E), chronic administration of HAE partially reversed and totally reversed (at doses of 25 and 50 mg/kg plasma 100 and 150

mg/kg, respectively) the increase in enzyme activity. The HAE at a dose of 25 mg/kg did not reverse, while 50 mg/kg partially reversed and 100 and 150 mg/kg totally reversed the reduction in GSH-Px enzyme activity (Figure 3F) in type II diabetic rats.

Chronic administration of AF did not reverse and partially reversed (at doses of 25 and 50 mg/kg and of 100 and 150 mg/kg, respectively) the increases in TBA-RS levels (Figure 3A). At a dose of 25 mg/kg, AF did not reverse the reduction in plasma sulfhydryl content in type-2 diabetic rats, 50 mg/kg AF partially reversed and 100 and 150 mg/kg AF totally reversed this reduction (Figure 3B). With regard to the antioxidant enzyme, CAT (Figure 3E), chronic administration of AF, at doses of 25, 50 and 100 mg/kg, partially reversed and, at 150 mg/kg, totally reversed the increase in activity. The doses of 25 and 50 mg/kg AF did not reverse the reduction in GSH-Px enzyme activity, but 100 mg/kg AF partially reversed the reduction and 150 mg/kg totally reversed the reduction, when compared to the diabetic group (Figure 3F).

Figure 3. Effects of HAE and FA (25, 50, 100 or 150 mg/kg) on blood oxidative stress parameters in DMII rats.

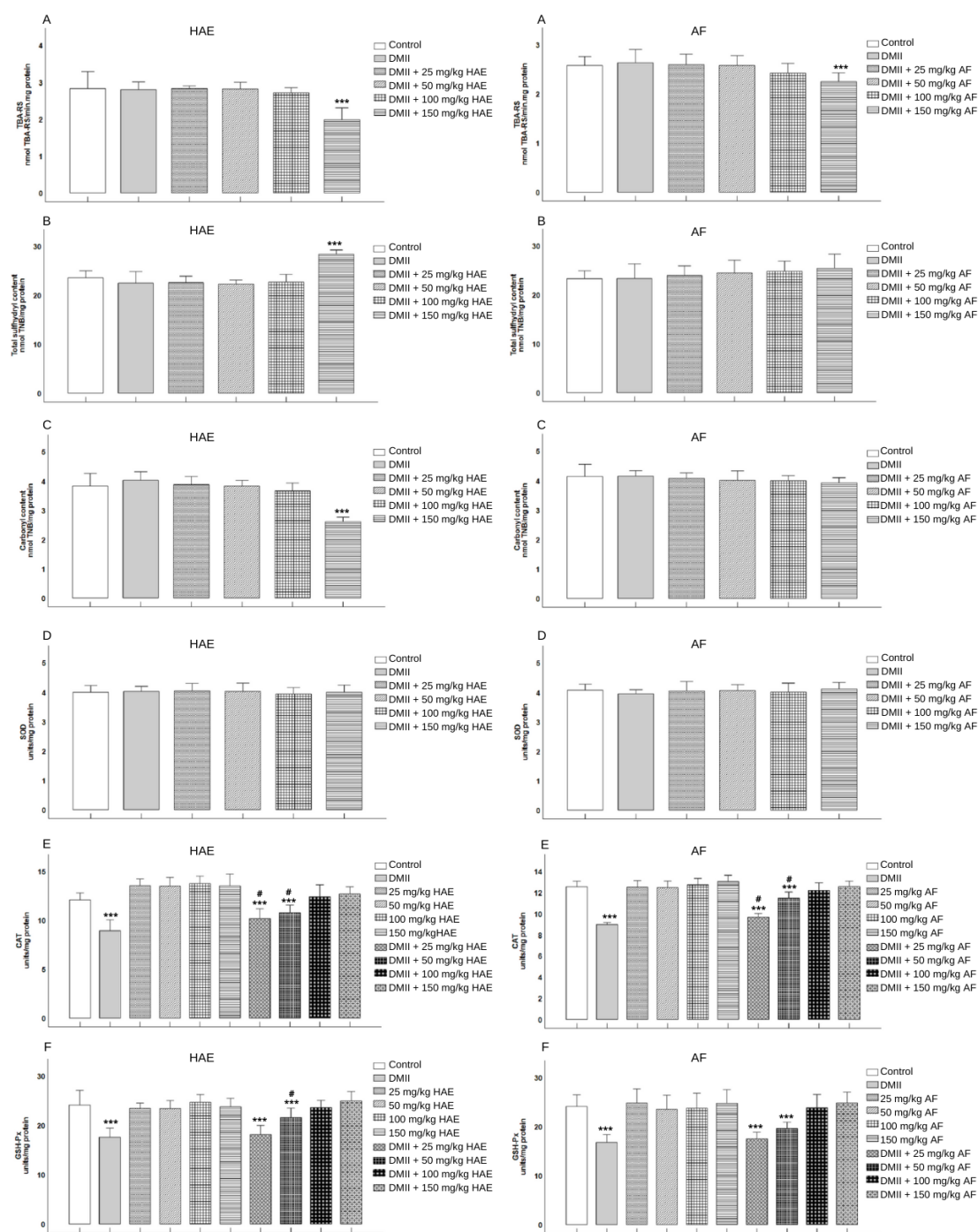


HAE: (A) TBA-RS, (B) total sulfhydryl content, (C) protein carbonyl content, (D) SOD, (E) CAT and (F) GSH-Px in the blood of 60-day-old Wistar rats. AF: (A) TBA-RS, (B) total sulfhydryl content, (C) protein carbonyl content, (D) SOD, (E) CAT and (F) GSH-Px activities in the blood of 60-day-old Wistar rats. Results are expressed as means $\pm$ SD (ANOVA and Duncan's multiple range test). ***p < 0.001, compared to control; #: partially reversed.

3.5 Effects of the chronic administration of HAE and AF from *M. pubipetala* on kidney oxidative stress parameters in streptozotocin-nicotinamide induced type II diabetic rats

We also investigated the effects of the chronic administration of HAE and AF (25, 50, 100 and 150 mg/kg) on the alterations in oxidative stress parameters induced by type-2 diabetes in the kidneys of rats. Figure 4 shows that the streptozotocin-nicotinamide DMII model did not alter TBA-RS (A; $F(5,30)=10.728$; $p<0.001$ and $F(5,36)=2.936$; $p>0.05$), total sulfhydryl content (B; $F(5,30)=16.485$; $p<0.001$ and $F(5,36)=0.728$; $p>0.05$), protein carbonyl content (C; $F(5,30)=21.771$; $p<0.001$ and $F(5,36)=0.709$; $p>0.05$) or SOD activity (D; $F(5,30)=0.144$; $p>0.05$ and $F(5,36)=0.330$; $p>0.05$), respectively, in the kidneys of rats. In contrast, CAT (E; $F(9,50)=20.821$; $p<0.001$ and $F(9,60)=37.582$; $p<0.001$), and GSH-Px (F; $F(9,50)=13.333$; $p<0.001$ and $F(9,60)=10.235$; $p<0.001$) activities were decreased by the model. *Post hoc* analysis showed that HAE (25, 50, 100 and 150 mg/kg) *per se* did not alter the activities of the antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px), when compared to the control groups, while HAE at a dose of 150 mg/kg reduced the TBA-RS and protein carbonyl content and increased the total sulfhydryl content. In contrast, AF *per se* at a dose of 150 mg/kg reduced TBA-RS alone and did not alter the other parameters. Chronic administration of HAE or AF, at doses of 25 and 50 mg/kg partially reversed and, at 100 and 150 mg/kg, reversed the reduction in the CAT activity (Figure 6E). The HAE at a dose of 25 mg/kg did not reverse the reduction in the GSH-Px activity, but at 50 mg/kg the HAE partially reversed and, at 100 and 150 mg/kg, reversed the reduced GSH-Px activity (Figure 6F), when compared to the control groups. Additionally, chronic administration of AF, at doses of 25 and 50 mg/kg, did not reverse the reduction in the GSH-Px activity caused by DMII, but 100 and 150 mg/kg AF totally reversed this decrease (Figure 6F).

Figure 4. Effects of HAE and FA (25, 50, 100 or 150 mg/kg) on kidney oxidative stress parameters in DMII rats.



HAE: (A) TBA-RS, (B) total sulfhydryl content, (C) protein carbonyl content, (D) SOD, (E) CAT and (F) GSH-Px in the blood of 60-day-old Wistar rats. AF: (A) TBA-RS, (B) total sulfhydryl content, (C) protein carbonyl content, (D) SOD, (E) CAT and (F) GSH-Px in the kidneys of 60-day-old Wistar rats. Results are expressed as means $\pm$ SD (ANOVA and Duncan's multiple range test). *** p <0.001, compared to control; #: partially reversed.

4 DISCUSSION

The main clinical characteristic of DM is hyperglycemia. In DMII, this event is caused by beta pancreatic cells. Persistent hyperglycemia leads to complications, such as visual, renal, neural and cardiovascular disorders (FORBES & COOPER, 2013). Oxidative stress has a fundamental role in the development of these complications by increasing the production of oxygen free radicals and decreasing antioxidant enzymes, such as SOD, CAT and GSH-Px (VALKO et al., 2006). As such, it is important to study the actions of potential new treatments on DMII-induced hyperglycemia and consequent oxidative stress. The administration of streptozotocin, a nitrosourea antineoplastic, simulates DMII by inducing DNA damage in pancreatic islets. Consequently, there is a greater deposition of connective tissue that is rich in collagen fibers (ZAFAR et al., 2009), leading to morphological alterations of the pancreatic islets, as can be seen in the histological analysis of our study, which shows pancreatic cells with non-stained cytoplasmic vacuolization and tissue fibrosis (BALAMASH et al., 2018). The inflammatory appearance of the damaged tissue suggests that streptozotocin initiates a cell-mediated immune reaction directed at beta cells (ROSSINI et al., 1977; SILVA et al., 2011; FERREIRA, 2017). According to previous studies (LENZEL, 2008; DAMACENO et al., 2015), higher severity scores in the pancreatic islets are expected in diabetic groups, along with microscopically visualized morphological changes, such as high numbers of inflammatory cells, vascular congestion and fibrosis, indicating cell injury (RODRIGUEZ-CALVO et al., 2018). In diabetic groups treated with the AF of *M. pubipetala* leaves, at doses of 100 and 150 mg/kg, the AF was able to reverse the cell damage that was caused during DMII, leading to mean severity scores that were similar to those of the control group.

The destruction of beta cells leads to metabolic alterations and affects the production and secretion of insulin, disturbing cellular homeostasis and normoglycemia (LEUNG, 2010; SCHUIT et al., 2001). Our results showed that the administration of streptozotocin and nicotinamide increased glucose and triglyceride levels in the serum of rats by damaging pancreatic beta cells, as described above, causing DMII. Hypertriglyceridemia is also a characteristic of

diabetes (SUBRAMANIAN & CHAIT, 2012), justifying the use of this model in our study. The chronic administration of the HAE of *M. pubipetala* leaves, at doses of 50, 100 and 150 mg/kg, partially reversed hyperglycemia, while the AF, at doses of 25, 50, 100 and 150 mg/kg, also partially reduced glucose levels, leading us to believe that a higher dose would totally reverse the elevated glucose levels induced by streptozotocin-nicotinamide administration. These results may be mediated by the elevated capacity of the HAE and AF extracts, as shown *in vitro*, to inhibit α -glucosidase and α -amylase, and to inhibit the antiglycant activity in diabetic mice.

Species from the *Myrcia* genus have long been used in folk medicine, usually in the form of infusions. The most cited traditional use of the *Myrcia* species refers to a small group of *Myrtaceae*, known in Brazil as “pedra-hume-caá”, “pedra-ume-caá” or “vegetable insulin”. The leaves or infusions of whole plants of these species are popularly used to treat diabetes (SILVA et al., 2015). Figueiredo-González et al. (2016) showed that the extracts of the species *M. salicifolia*, *M. sphaerocapa* and *M. speciosa* inhibited the α -glucosidase enzyme between 90 to 500 times more than the positive control, acarbose. Furthermore, our results are in accordance with those of the study of Kumar et al. (2020), which reported the antihyperglycemic activity of the methanolic extract of the stem of *Callistemon lanceolatus*, from the *Myrtaceae* family, in hyperglycemic rats. Vinagre et al. (2010) also explored the hypoglycemic potential of a leaf decoction of *Campomanesia xanthocarpa*, from the *Myrtaceae* family, in diabetic rats; this extract exhibited a 26% reduction in blood glucose levels, in comparison to the control group. Other plant extracts of the *Myrtaceae* family, such as *Eucalyptus globulus*, *Eugenia jambolana*, *Syzygium alternifolium*, *Myrcia splendens* (MEDEIROS et al., 2021), have also been reported as interesting alternatives with hypoglycemic and protecting functions (NEGRI, 2005).

The hypertriglyceridemia induced by the DMII animal model was improved after chronic administration of the extract and fraction: HAE at dose of 25 mg/kg partially reversed hypertriglyceridemia, and the doses of 50, 100 and 150 totally reversed hypertriglyceridemia. The AF, at a dose of 50 mg/kg, totally reversed hypertriglyceridemia, while the doses of 100 and 150 mg/kg AF reversed and reduced triglycerides. Even in the non-diabetic groups, 150 mg/kg AF reduced

triglycerides levels. Cardoso et al. (2018) found that fruit extracts of *Eugenia uniflora* from the *Myrtaceae* family prevented the increase in triglycerides in an animal model of insulin resistance that was induced by dexamethasone. However, the pancreas sections of diabetic rats treated with HAE, at 100 and 150 mg/kg, presented more cytoplasm vacuolization and congestion than the diabetic rats treated with HAE at 25 and 50 mg/kg, suggesting protection by these doses against the prejudicial effect of DMII. In contrast, a study by Nelson-Dooley et al. (2005) on the protective effects of *Myrcia pubipetala* against DMII, showed that the administration of HAE at 150 mg/kg in diabetic rats demonstrated more pancreas destruction. Nevertheless, Ribeiro et al. (2022) reported that the genus *Myrcia* demonstrates very important pharmacological properties, such as antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, larvicidal, enzymatic inhibitor, antiparasitic, antiproliferative, antifungal, antibacterial, hypoglycemic, hepatoprotective, anti-obesity and antinociceptive properties.

A large number of studies have indicated that DMII leads to an increase in free radicals and a decrease of antioxidant enzymes. The hyperglycemia-mediated increase in the protein glycosylation mechanism is involved in the overproduction of free radicals (DINIS et al., 1994). Increased glycation and accumulation of advanced glycation products (AGEs) in tissues have been implicated in diabetic complications, as they can alter enzymatic activity, decrease ligand binding, modify protein half-life, and alter immunogenicity. Free radicals, derived from glycation, can cause fragmentation of proteins and oxidation of nucleic acids and lipids. The amino groups of the adenine and guanine bases in DNA are also susceptible to glycation and the formation of AGEs, probably mediated by reactive intracellular sugars (TOMINAGA et al., 2020). According to Baynes (2002), free radicals derived from glycation can cause fragmentation of proteins and oxidation of nucleic acids and lipids. AGEs can also form in phospholipids and induce lipid peroxidation by a direct reaction between glucose and the amino groups in phospholipids. According to our results, the HAE and AF samples tested showed antiglycant activity; similarly, a study carried out with the dry extract of *M. multiflora* leaves showed inhibition of glycation by the oxidative pathway (OLIVEIRA et al., 2021).

Our results show that streptozotocin-nicotinamide-induced DMII increased TBA-RS levels and reduced the total sulfhydryl content in plasma, but did not alter TBA-RS, total sulfhydryl or the protein carbonyl content in the kidneys. The elevated levels of TBA-RS in the plasma were partially reversed after chronic administration of both HAE and AF at doses of 100 and 150 mg/kg, and the decreased total sulfhydryl content was also partially reversed after treatment with HAE at doses of 100 and 150 mg/kg and AF at doses of 50, 100 and 150 mg/kg. Since TBA-RS is an indication of lipid oxidation mediated by malondialdehyde formation, results suggest that the DMII animal model produced damage to the cell structure and permeability, reducing its selectivity for ionic transport and signaling, and consequently resulting in the release of hydrolytic enzymes and the formation of cytotoxic products that can cause cell death (ŁUCZAJ et al., 2017; AKSENOV & MARKSBERRY, 2011).

With regard to antioxidant enzymes, both in the erythrocytes and in the kidney of DMII induced rats, there was reduction in GSH-Px. The DMII animal model also decreased CAT in the kidney and increased CAT in the erythrocytes. The chronic administration of both HAE and AF of *M. pubipetala* leaves at doses of 150 mg/kg totally reversed the changes in antioxidant enzyme caused by the streptozotocin-nicotinamide DMII model, in the erythrocytes and kidney. HAE (100 mg/kg) also totally reversed the increase in CAT and the decrease in GSH-Px in the erythrocytes. GSH-Px and CAT prevent the production of hydroxyl radicals (OH•) by catalyzing the reduction of H₂O₂ to water (BARBOSA et al., 2010, VALKO et al., 2006). The decreases in antioxidant enzymes in the kidney and erythrocytes may lead to an increase of superoxide and H₂O₂ levels in the organism, resulting in lipid peroxidation by hydroxyl radicals. The increase in TBA-RS in the plasma indicates the cell damage promoted by this oxidative stress pathway. A similar study by Medeiros et al. (2021) also demonstrated the antioxidant activity of the dichloromethane extract of *Myrcia splendens* leaves in a DMII animal model. The AF and HAE extracts also showed antioxidant activity *in vitro* in the DPPH radical inhibition capacity assay.

The chemical characterization of HAE and AF revealed a phenolic compound content. HAE also presented some flavonoid content. This chemical composition profile has already been reported in literature for other extracts and

fractions of the genus *Myrcia* (PAGANELLI et al., 2020; SANTOS et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2021; CASCAES et al., 2021; SALDANHA et al., 2013). According to Hung (2014), the consumption of whole grains that are rich in phenolic compounds has significant health benefits for the prevention of chronic diseases such as diabetes. Data from the literature show the antioxidant potential of phenolic compounds (RUSSO et al., 2017; OLIVIERO et al., 2018; OLIVARES-VICENTE et al., 2018), justifying the interest in the research of these compounds. Studies show the antioxidant potential of flavonoids and their efficacy in the complementary treatment and prevention of diabetes (KUMAR & PANDEY, 2013; HOSSAIN et al., 2016; SPAGNUOLO et al., 2018). The presence of phenolic compounds and flavonoids in *M. pubipetala* leaves could explain the *in vitro* and *in vivo* antioxidant efficacy observed for the extracts of these leaves. The antioxidant activities of phenolic compounds and flavonoids have been described in the literature in chronic diseases, such as DMII, due to their free radical scavenging mechanism (KUMAR et al., 2013). Furthermore, phenolic compounds have the ideal structure to be enzyme inhibitors due to their ability to act as hydrogen donors and acceptors, in hydrophobic environments, and their flexible backbones that can adapt to the active site of enzymes, such as α -glucosidase and α -amylase (RASOULI et al., 2017). The docking analysis of several compounds identified from *S. polyanthum* leaves, and the α -glucosidase 3D crystal structure (SYABANA et al. 2022), indicated that phenolic compounds can act as competitive inhibitors of α -glucosidase, in a similar manner to acarbose. Phenolic acids and flavonoids are common plant compounds and covalently bind to and alter the activity of α -amylase, due to their ability to form quinones or lactones that react with the nucleophilic groups of enzymes (OYEDEMI et al., 2017).

In conclusion, the results of our study indicate that the HAE and AF from *M. pubipetala* leaves have hypoglycemic, hypolipemiant and antioxidant activities in the streptozotocin-nicotinamide induced DMII animal model, especially at doses of 100 mg/kg and 150 mg/kg. Further studies are needed to standardize safe doses, toxicity and the possible side effects of these extracts, in order to assess the possibility of the complementary treatment of DMII patients with *M. pubipetala*.

Conflict of interest

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

Acknowledgements

This work was supported by grants from Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) and Programa Institucional de Apoio à Formação Científica na Pós-Graduação *stricto sensu* - PIC PG from Univille. The authors would like to thank Universidade Regional de Blumenau (FURB).

5 REFERENCES

- AEBI H. 1984. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126.
- AKILEN R, PIMLOTT Z, TSIAMI A, ROBINSON N. 2014. The use of complementary and alternative medicine by individuals with features of metabolic syndrome. **Journal of Integrative Medicine**, v. 12, n. 3, p. 171-174.
- 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**, v. 302, p. 141-145.
- BALAMASH KS, ALKREATHY HM, GAHDALI EHA, KHOJA SO, AHMAD A. 2018. Comparative Biochemical and Histopathological Studies on the Efficacy of Metformin and Virgin Olive Oil against Streptozotocin-Induced Diabetes in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Diabetes Research**, v. 2018, ID 4692197.
- BARBOSA KBF, COSTA NMB, ALFENAS RCG, DE PAULA O, MINIM PR, BRESSAN J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643.
- BAYNES JW. 2002. The Maillard Hypothesis on Aging: time to focus on DNA. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 959, n. 1, p. 360-367.
- BHALERAO MS, BOLSHETE PM, SWAR BD, BANGERA TA, KOLHE VR, TAMBE MK, WADE MP, BHOWATE SD, SONJE UB, GOGTAY NJ, THATTE UM. 2013. Use of and satisfaction with complementary and alternative medicine in four chronic diseases: a cross-sectional study from India. **The National Medical Journal of India**, v. 26, n. 2, p. 75-78.
- CARDOSO JS, OLIVEIRA PS, BONA NP, VASCONCELLOS FA, BALDISSARELLI J, VIZZOTTO M, SOARES MSP, RAMOS VP, SPANEVELLO RM, LENCINA CL, TAVARES RG, STEFANELLO FM. 2018. Antioxidant, antihyperglycemic, and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruit extracts in an animal model of insulin resistance. **Communications in Free Radical Research**, v. 23, n. 1, p. 41-46.
- CASCAES MM, GUILHON GMSP, ZOGHBI MG, ANDRADE EHA, SANTOS LS, DA SILVA JKR, TROVATTI AP, ARAÚJO IS. 2021. **Natural Product Research**, v. 10, p. 1717-1721.
- DAMACENO DS, CARVALHO LMG, GUARNIERI MAP, HI EMB, GONZALEZ FG, MARCELINO JA, GOUVINHAS MP. 2016. Análise Morfológica do Pâncreas de Ratos Wistar com Diabetes Tipo 1 e Tratados com Extratos de *Agaricus blazei*, *Ganoderma lucidum* e *Smallanthus sonchifolia*. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 13, n. 30, p. 156.
- DE CERQUEIRA MD, DE MARQUES EJ, MARTINS D, ROQUE NF, CRUZ FG, GUEDES MLDS. 2009. Seasonal variation of the composition of essential oil from *Myrcia salzmannii* berg. (myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1544-1548.

DINIS TCP, MADEIRA VMC, ALMEIDA LM. 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 315, p. 161-169.

FERREIRA RC. 2017. Avaliação comparativa entre dois modelos de indução química de *Diabetes mellitus* tipo 1 em ratos Wistar. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

FIGUEIREDO-GONZÁLEZ M, GROSSO C, VALENTÃO P, ANDRADE PB. 2016. α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from *Myrcia spp.*: a stronger alternative to acarbose?. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 118, p. 322-327.

FORBES JM, COOPER ME. 2013. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137-188.

HASHEMPUR MH, HEYDARI M, MOSAVAL SH, HEYDARI ST, SHAMS M. 2015. Complementary and alternative medicine use in Iranian patients with diabetes mellitus. **Journal of Integrative Medicine**, v. 13, n. 5, p. 319-325.

HASHIMOTO G. 1996. Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants. Kamakura: Aboc-Sha.

HOSSAIN MK, DAYEM AA, HAN J, YIN Y, KIM K, SAHA SK. 2016. Molecular mechanisms of anti-obesity and antidiabetic properties of flavonoids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 569.

HUNG PV. 2014. Phenolic Compounds of Cereals and Their Antioxidant Capacity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 25-35.

IGHODARO OM. 2018. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 656-662.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. 2021. IDF Diabetes Atlas. 10th Edition, IDF, Brussels. <http://www.diabetesatlas.org>

KAR A, CHOUDHARY BK, BANDYOPADHYAY NG. 2013. Comparative evaluation of hypoglycemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 105-108.

KESKIN A, BILGE U. 2014. Mental disorders frequency alternative and complementary medicine usage among patients with hypertension and type 2 diabetes mellitus. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 17, n. 6, p. 717-722.

KIHO T, USUI S, HIRANO K, AIZAWA K, INAKUMA T. 2004. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 200-205.

KUMAR R, GUPTA A, SINGH AK, BISHAYEE A, PANDEY AK. 2020. The Antioxidant and Antihyperglycemic Activities of Bottlebrush Plant (*Callistemon lanceolatus*) Stem Extracts. **Medicines**, v. 7, n. 3, p. 1-16.

KUMAR S, PANDEY AK. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **Scientific World Journal**, 162750.

KYSELOVA Z, STEFEK M, BAUER V. 2004. Pharmacological prevention of diabetic cataract. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 18, n. 2, p. 129-140.

LENZEL S. 2008. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. **Magazine Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226.

ŁUCZAJ W, GEGOTEK A, SKRZYDLEWSKA E. 2017. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p. 87-101.

MOLLAOGLU M, ACIYURT A. 2013. Use of complementary and alternative medicine among patients with chronic diseases. **Acta Clinica Croatica**, v. 52, n. 2, p. 181-188.

LEUNG PS. 2010. Physiology of the pancreas. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 690, p. 13-27.

LIMA DD, SASSO S, DALMEDICO L, DAL MAGRO DD, PEREIRA EM, WYSE ATS. 2017. Argininic acid alters markers of cellular oxidative damage in vitro: Protective role of antioxidants. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 69, p. 605-611.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275.

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

MEDEIROS S, MAIA TP, LIMA AB, PSCHIEDT LC, DELMONEGO L, VINCENZI KL, CUSTODIO BV, DAL MAGRO DD, BARAUNA SC, ALBERTON MD, PEREIRA EM, DELWING-DE LIMA D. 2021. Hypolipidemic, hypoglycemic and antioxidant effects of *Myrcia splendens* (Sw) DC in an animal type 2 diabetes model induced by streptozotocin. **Latin American bulletin of medicinal and aromatic plants**, v. 20, n. 2, p. 132-146.

NEGRI G. 2005. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 121-141.

NELSON-DOOLEY C, DELLA-FERA MA, HAMRICK M, BAILE CA. 2005. Novel treatments for obesity and osteoporosis: targeting apoptotic pathways in adipocytes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 2215-2225.

OHKAWA H, OHISHI N, YAH I K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358.

OLIVARES-VICENTE M, BARRAJON-CATALAN E, HERRANZ-LOPEZ M, SEGURA-CARRETERO A, JOVEN J, ENCINAR JA, MICOL V. 2018. Plant Derived Polyphenols in Human Health: Biological Activity, Metabolites and Putative Molecular Targets. **Current Drug Metabolism**, v. 19, p. 351-369.

OLIVEIRA ESC, PONTES FLD, ACHO LDR, DO ROSÁRIO AS, DA SILVA BJP, BEZERRA JA, CAMPOS FR, LIMA ES, MACHADO MB. 2021. qNMR quantification of phenolic compounds in dry extract of *Myrcia multiflora* leaves and its antioxidant, anti-AGE, and enzymatic inhibition activities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 201.

OLIVIERO F, SCANU A, ZAMUDIO-CUEVAS Y, PUNZI L, SPINELLA P. 2018. Anti-Inflammatory Effects of Polyphenols in Arthritis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 1653-1659.

OYEDEMI SO, IJEH II, OHANYEREM PE, COOPOOSAMY RM, AIYEGORO OA. 2017. Alpha-Amylase Inhibition and Antioxidative Capacity of Some Antidiabetic Plants Used by the Traditional Healers in Southeastern Nigeria. **Scientific World Journal**, v. 2017

PAGANELLI CJ, SIEBERT DA, VITALI L, MICKE GA, ALBERTON MD. 2020. Quantitative analysis of phenolic compounds in crude extracts of *Myrcia splendens* leaves by HPLC-ESI-MS/MS. **Pharmacognosy**, v. 71.

PAPATHEODOROU K, BANACH M, BEKIARI E, RIZZO M, EDMONDS M. 2018. Complications of Diabetes 2017. **Journal of Diabetes Research**, v. 2018.

RAFE R. 2017. A review of five traditionally used anti-diabetic plants of Bangladesh and their pharmacological activities Q2 Md. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 10, p. 933-939.

RASOULI H, HOSSEINI-GHAZVINI SMB, ADIBI H, KHODARAHMI R. 2017. Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. **Food Funct**, v. 8, p. 1942-1954.

RAVI K, RAJASEKARAN S, SUBRAMANIAN S. 2005. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 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**, v. 75, p. 2717-2731.

REYES BA, BAUTISTA ND, TANQUILUT NC, ANUNCIADO RV, LEUNG AB, SANCHEZ GC, MAGTOTO RL, CASTRONUEVO P, TSUKAMURA H, MAEDA KI.

2006. Anti-diabetic potentials of *Momordica charantia* and *Andrographis paniculata* and their effects on estrous cyclicity of alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 196-200.

REZNICK AZ, PACKER L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 223, p. 57-63.

RIBEIRO CL, PAULA JAM, PEIXOTO JC. 2022. Propriedades farmacológicas de espécies dos gêneros: *Myrcia*, *Eugenia* e *Psidium* – Myrtaceae típicas do Cerrado: Uma revisão de escopo. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8.

RODRIGUEZ-CALVO T, RICHARDSON SJ, PUGLIESE A. 2018. Pancreas Pathology During the Natural History of Type 1 Diabetes. **Current Diabetes Report**, v. 18, p. 124.

RORSMAN P, BRAUN M. 2013. Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 155-179.

ROSSINI AA, LIKE AA, DULIN EW, CAHILL FG. 1977. Pancreatic Beta Cell Toxicity by Streptozotocin Anomers. **Diabetes**, v. 26, p. 1120-1124.

RUSSO EM, REICHELT AA, DE-SÁ JR, FURLANETTO RP, MOISÉS RC, KASAMATSU TS, CHACRA AR. 1990. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 1, p. 11-20.

RUSSO GL, TEDESCO I, SPAGNUOLO C, RUSSO M. 2017. Antioxidant Polyphenols in Cancer Treatment: Friend, Foe or Foil? **Seminars in Cancer Biology**, v. 46, p. 1-13.

SALDANHA LL, VILEGAS W, DOKKEDAL AL. 2013. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8402-8416.

SANTOS C, GALAVERNA RS, ANGOLINI CFF, NUNES VVA, DE ALMEIDA LFR, RUIZ ALTG, DE CARVALHO JE, DUARTE RMT, DUARTE MCT, EBERLIN MN. 2018. Antioxidative, antiproliferative and antimicrobial activities of phenolic compounds from three *Myrcia* species. **Molecules**, v. 23, n. 5.

SCHUIT FC, HUYPENS P, HEIMBERG H, PIPELEERS DG. 2001. Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. **Diabetes**, p. 50, p. 1-11.

SHARMA RK, YANG T, OLIVEIRA AC, LOBATON GO, AQUINO V, KIM S, RICHARDS EM, PEPINE CJ, SUMNERS C, RAIZADA MK. 2019. Microglial Cells Impact Gut Microbiota and Gut Pathology in Angiotensin II-Induced Hypertension. **Circulation Research**, v. 124, n. 5, p. 727-736.

SHEELA N, JOSE MA, SATHYAMURTHY D, KUMBAR BN. 2013. Effect of silymarin on streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic nephropathy in rats. **Iran Journal of Kidney Diseases**, v. 7, p. 117-123.

SHUSTER AL, ROCHA FE, WAYSZCEYK S, DE LIMA DD, BARAUNA SC, LOPES BG, ALBERTON MD, DAL MAGRO DD. 2022. Protective effect of *Myrcia pubipetala* Miq. against the alterations in oxidative stress parameters in an animal model of depression induced by corticosterone. **Brain Research**, v. 1, p. 1774-1477.

SILVA FKS, ROSÁRIO AS, SECCO RS, ZOGHBI MGB. 2015. Levantamento das espécies conhecidas como pedra-ume-caá (*Myrtaceae*), com ênfase nas comercializadas na cidade de Belém, Pará, Brasil. **Biota Amazônica**, v. 5, p. 7-15.

SILVA, F.K.S. et al. Levantamento das Espécies Conhecidas como Pedra-Ume-Caá (*Myrtaceae*), com Ênfase nas Comercializadas na Cidade de Belém, Pará, Brasil. **Biota Amazônia**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 7-15, 30 mar. 2015. Revista Biota Amazônia. <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v5n1p7-15>.

SILVA M, LIMA WG, SILVA ME, PEDROSA ML. 2011. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 1, p. 46-53.

SOBRAL M, MAZINE FF, LEONI L, SOUZA MC, MELO EAD. 2016. Five new southeastern Brazilian Myrtaceae. **Phytotaxa**, v. 253, n. 1.

SPAGNUOLO C, MOCCIA S, RUSSO GL. 2018. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, p. 105-115.

SUBRAMANIAN R, ASMAWI MZ, SADIKUN A. 2008. In vitro alphasglucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, n. 2, p. 391-398.

SUBRAMANIAN S, CHAIT A. 2012. Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 5, p. 819-825.

SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, PINKEPANK M, OGURTSOVA K, DUNCAN BB, STEIN C, BASIT A, CHAN JCN, MBANYA JC, PAVKOV ME, RAMACHANDARAN A, WILD SH, JAMES S, HERMAN WH, ZHANG P, BOMMER C, KUO S, BOYKO EJ, MAGLIANO DJ. 2022. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 183, p. 109-119.

SYABANA MA, YULIANA ND, BATUBARA I, FARDIAZ D. 2022. α -glucosidase inhibitors from *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp leaves as revealed by

metabolomics and in silico approaches. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 282, p. 114618.

TOMINAGA Y, HIKARI S, HIRABAYASHI K, IKEDA T, HOSHI Y, NAGAI R. 2020. *Drosera tokaiensis* extract containing multiple phenolic compounds inhibits the formation of advanced glycation end-products. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, v. 693, p. 108586.

TRIVEDI NP, RAWAL UM. 2001. Hepatoprotective and antioxidant property of *Andrographis paniculata* (Nees) in BHC induced liver damage in mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, n. 1, p. 41-46.

VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M, MAZUR M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40.

VAREDA PMP, SALDANHA LL, CAMAFORTE NAP, VIOLATO NM, DOKKEDAL AL, BOSQUEIRO JR. 2014. *Myrcia bella* Leaf Extract Presents Hypoglycemic Activity via PI3k/Akt Insulin Signaling Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**.

VINAGRE A, RONNAU A, PEREIRA S, DA SILVEIRA L, WILLAND E, SUYENAGA E. 2010. Anti-diabetic effect of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 46, 170-177.

WEI J, WANG Q, ZHENG H, WEI F. 2018. Research Progress on Non-Drug Treatment for Blood Glucose Control of Type 2 Diabetes Mellitus. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, vol. 24, n. 10, p. 723-727.

WENDEL A. 1981. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-333.

WHO. 2016. Global report on diabetes. Switzerland: World Health Organization.

WILSON PG, O'BRIEN MM, GADEK PA, QUINN CJ. 2001. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 11, p. 2013-2025.

ZAFAR M, NAEEM-UL-HASSAN NS, AHMED M, KAIMKHANI ZA. 2009. Altered kidney morphology and enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Morphology**, v. 27, n. 3, p. 783-790.

REFERÊNCIAS

ACHARYA, J.; PUNCHARD, N.A.; TAYLOR, J.A.; THOMPSON, R.P.H.; PEARSON, T.C. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. **European Journal of Haematology**, v. 47, p. 287-291, 1991.

AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AKILEN, R.; PIMLOTT, Z.; TSIAMI, A.; ROBINSON, N. The use of complementary and alternative medicine by individuals with features of metabolic syndrome. **Journal of Integrative Medicine**, v. 12, n. 3, p. 171-174, 2014.

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**, v. 302, p. 141-145, 2001.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. **Diabetes Care**, v. 41, n. 1, p. 13-27, 2018.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. **Diabetes Care**, v. 43, n. 1, p. 98, 2020.

ANAGNOSTOPOULOU, M.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIOU, V.P.; ASSIMOPOULOU, A.N.; BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, v. 94, p. 19-25, 2006.

ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S.; MICHELS, A.W. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 383, n. 9911, p. 69-82, 2014.

BARJA, G. The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. **Aging**, v. 12, n. 5, p. 342-355, 2000.

BAYNES, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, p. 405-412, 1991.

BERNARD, C. Du suc pancréatique et de son rôle dans les phénomènes de la digestion. **C R Soc Acad Sci**, p. 99-119, 1849.

BHALERAO, M.S.; BOLSHETE, P.M.; SWAR, B.D.; BANGERA, T.A.; KOLHE, V.R.; TAMBE, M.K.; WADE, M.P.; BHOWATE, S.D.; SONJE, U.B.; GOGTAY, N.J.; THATTE, U.M. Use of and satisfaction with complementary and alternative medicine in four chronic diseases: a cross-sectional study from India. **The National Medical Journal of India**, v. 26, n. 2, p. 75-78, 2013.

BHAT, A.H.; DAR, K.B.; ANEES, S.; ZARGAR, M.A.; MASOOD, A.; SOFI, M.A.; GANIE, S.A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative

diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101-110, 2015.

BUTTERFIELD, D.A.; KOPPAL, T.; HOWARD, B.; SUBRAMANIAM, R.; HALL, N.; HENSLEY, K.; YATIN, S.; ALLEN, K.; AKSENOV, M.; AKSENOVA, M.; CARNEY, J. Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 854, p. 448-462, 1998.

CASCAES, M.M.; GUILHON, G.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.; SANTOS, L.S. Constituents and pharmacological activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A review of an aromatic and medicinal group of plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23881-23904, 2015.

CASCAES, M.M.; GUILHON, G.; ZOGHBI, M.G.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, L.S.; DA SILVA, J.K.R.; TROVATTI, A.P.; ARAÚJO, I.S. **Natural Product Research**, v. 10, p. 1717-1721, 2021.

CAVIN, A.; HOSTETTMANN, L.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. **Planta Medica**, v. 64, p. 393-396, 1998.

CECÍLIO, A.B.; RESENDE, L.B.; COSTA, A.C.; COTTA, M.M.; GIACOMINI, L.F.; GOMES, L.C.; SILVA, L.A.; VAZ, C.P.Q.; OLIVEIRA, F.Q. Espécies vegetais indicadas no tratamento do diabetes. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 3, p. 23-28, 2008.

CHENG, A.Y.Y.; FANTUS, I.G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 *Diabetes mellitus*. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 2, p. 213-226, 2005.

CHERUBINI, V.; GRIMSMANN, J.M.; ÅKESSON, K.; BIRKEBÆK, N.H.; CINEK, O.; DOVČ, K.; GESUITA, R.; GREGORY, J.W.; HANAS, R.; HOFER, S.E.; HOLL, R.W.; JEFFERIES, C.; JONER, G.; KING, B.R.; MAYER-DAVIS, E.J.; PEÑA, A.S.; SVENSSON, J.; WARNER, J.T.; BRATINA, N.; DABELEA, D. Temporal trends in diabetic ketoacidosis at diagnosis of paediatric type 1 diabetes between 2006 and 2016: results from 13 countries in three continents. **Diabetologia**, v. 63, n. 8, p. 1530-1541, 2020.

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

CHEVREUL, M.E. Note sur le sucre de diabète. **Annales de Chimie**, v. 95, p. 319-320, 1815.

CHINO, I.B.; ROUSSIS, V.; PERDETZOGLOU, D.; TZAKOU, O.; LOUKIS, A. **Planta Medica**, v. 63, n. 2, p. 181-183, 1997.

CHRISTENHUSZ, M.J.M.; BYNG, J.W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, p. 201-217, 2016.

COTRAN, S.R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Pâncreas. In: Patologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 17, 1994.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601-623, 2006.

DAS, A.K.; SHAH, S. History of diabetes: from ants to analogs. **Journal of the Association of India**, v. 59, p. 6-7, 2011.

DE CERQUEIRA, M.D.; DE MARQUES, E.J.; MARTINS, D.; ROQUE, N.F.; CRUZ, F.G.; GUEDES, M.L.D.S. Seasonal variation of the composition of essential oil from *Myrcia salzmannii* berg. (myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

DOBSON, M. Experiments and observations on the urine in diabetes. **Medical Observations and Inquiries**, v. 5, p. 298-316, 1776.

DROGE, W. Review Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

ENGERS, V.K.; BEHLING, C.S.; FRIZZO, M.N. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. **Revista Contexto e Saúde**, v. 10, n. 20, p. 93-102, 2011.

EPHÈSE, R. De renum et vesicae morbis. Paris: Baillière, 1879.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FORBES, J.M.; COOPER, M.E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137-188, 2013.

FUJI, H.; KONO, K.; NAKAI, K.; GOTO, S.; KOMABA, H.; HAMADA, Y.; SHINOHARA, M.; KITAZAWA, R.; KATAZAWA, S.; FUKAGAWA, M. Oxidative and nitrosative stress and progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. **American Journal of Nephrology**, v. 31, p. 342-352, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press, 823 p, 2015.

HASHEMPUR, M.H.; HEYDARI, M.; MOSAVAL, S.H.; HEYDARI, S.T.; SHAMS, M. Complementary and alternative medicine use in Iranian patients with diabetes mellitus. **Journal of Integrative Medicine**, v. 13, n. 5, p. 319-325, 2015.

HASHIMOTO, G. Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants. Kamakura: Aboc-Sha, 1996.

HIRAKU, Y.; KAWANISHI, S.; ICHINOSE, T.; MURATA, M. The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1203, p. 15-22, 2010.

HOSTETTMANN, K.; GUPTA, M.P.; MARSTON, A.; FERREIRA-QUIROZ, E. Handbook of Strategies for the isolation of bioactive natural products. Bogotá: CYTED/Convenio Andrés Bello, 120 p, 2008.

HOWYZEH, M.S.; NOORI, S.A.S.; SHARIATI, V.; NIAZIAN, M. Essential Oil Chemotype of Iranian Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, p. 273-276, 2017.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas. 10th Edition, IDF, Brussels, 2021.

IGHODARO, O.M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes *mellitus*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 656-662, 2018.

JORGE, L.I.F.; AGUIAR, J.P.L.; SILVA, M.L.P. Anatomia foliar de pedra-ume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia puniceifolia* - Myrtaceae). **Acta Amazonica**, v. 30, p. 49-57, 2000.

KAHN, C.R.; WEIR, G.C.; KING, G.L.; JACOBSON, A.M.; MOSES, A.C.; SMITH, R.J. Joslin: Diabetes Melito. Brasil: Artmed, p. 15-30, 2009.

KAR, A.; CHOUDHARY, B.K.; BANDYOPADHYAY, N.G. Comparative evaluation of hypoglycemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 105-108, 2013.

KESKIN, A.; BILGE, U. Mental disorders frequency alternative and complementary medicine usage among patients with hypertension and type 2 diabetes mellitus. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 17, n. 6, p. 717-722, 2014.

KIHO, T.; USUI, S.; HIRANO, K.; AIZAWA, K.; INAKUMA, T. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 200-205, 2004.

LAIOS, K.; KARAMANOU, M.; SARIDAKI, Z.; ANDROUTSOS, G. Aretaeus of Cappadocia and the first description of diabetes. **Hormones**, v. 11, n. 1, p. 109-113, 2012.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Integração e regulação hormonal do metabolismo dos mamíferos. In: Princípios de bioquímica. São Paulo: Sarvier, cap. 22, 2002.

LI, L.; WAN, X.; ZHAO, G. Meta-analysis of the risk of cataract in type 2 diabetes. **BMC Ophthalmology**, v. 14., n. 1, p. 94, 2014.

LIMA, D.D.; SASSO, S.; DALMEDICO, L.; DAL MAGRO, D.D.; PEREIRA, E.M.; WYSE, A.T.S. Argininic acid alters markers of cellular oxidative damage in vitro:

Protective role of antioxidants. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 69, p. 605-611, 2017.

LIMBERGER, R.P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J.M. Essential oils from *Myrcia* species native to Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

ŁUCZAJ, W.; GEGOTEK, A.; SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p. 87-101, 2017.

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

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 424, n. 1-2, p. 83-95, 1999.

MAZZANTI, C.M.; SCHOSSLER, D.R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; BALZ, D.; MIRON, V.; MORSCH, A.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M.; CECIM, M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, p. 1061-1065, 2003.

MEDEIROS, S.; MAIA, T.P.; LIMA, A.B.; PSCHIEDT, L.C.; DELMONEGO, L.; VINCENZI, K.L.; CUSTODIO, B.V.; DAL MAGRO, D.D.; BARAUNA, S.C.; ALBERTON, M.D.; PEREIRA, E.M.; DELWING-DE LIMA, D. Hypolipidemic, hypoglycemic and antioxidant effects of *Myrcia splendens* (Sw) DC in an animal type 2 diabetes model induced by streptozotocin. **Latin American bulletin of medicinal and aromatic plants**, v. 20, n. 2, p. 132-146, 2021.

MELLO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, p. 273-275, 1983.

MILECH, A. et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016). São Paulo: A.C. Farmacêutica, p. 7-9, 2016.

MOLLAOGLU, M.; ACIYURT, A. Use of complementary and alternative medicine among patients with chronic diseases. **Acta Clinica Croatica**, v. 52, n. 2, p. 181-188, 2013.

MOLLAZADEHA, H.; MAHDIAN, D.; HOSSEINZADEHE, H. Medicinal plants in treatment of hypertriglyceridemia: A review based on their mechanisms and effectiveness. **Phytomedicine**, v. 53, p. 43-52, 2019.

NATHAN, D.M.; BUSE, J.B.; DAVIDSON, M.B.; FERRANNINI, E.; HOLMAN, R.R.; SHERWIN, R.; ZINMAN, B.; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, EUROPEAN

ASSOCIATION FOR STUDY OF DIABETES. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 2, p. 193-203, 2009.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 121-141, 2005.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAH, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, E.S.C.; PONTES, F.L.D.; ACHO, L.D.R.; DO ROSÁRIO, A.S.; DA SILVA, B.J.P.; BEZERRA, J.A.; CAMPOS, F.R.; LIMA, E.S.; MACHADO, M.B. qNMR quantification of phenolic compounds in dry extract of *Myrcia multiflora* leaves and its antioxidant, anti-AGE, and enzymatic inhibition activities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 201, 2021.

PAPASPYROS, N.S. The history of diabetes mellitus. London: Robert Stockwell Ltd, 1952.

PAPATHEODOROU, K.; BANACH, M.; BEKIARI, E.; RIZZO, M.; EDMONDS, M. Complications of Diabetes 2017. **Journal of Diabetes Research**, v. 2018, 2018.

PEUMERY, J.J. Histoire illustrée du diabète. Paris: Les Éditions Roger Dacosta, p. 19-25, 1987.

PORTER, R. The greatest benefit to mankind, a medical history of humanity. New York: WW Norton, p. 71, 1997.

RACHDAOUI, N. Insulin: The Friend and the Foe in the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 5, 2020.

RAFE, R. A review of five traditionally used anti-diabetic plants of Bangladesh and their pharmacological activities Q2 Md. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 10, p. 933-939, 2017.

RAMOS, L.; ARNAUD, E.; FERREIRA, P. Fatores Emocionais, Qualidade De Vida e Adesão Ao Tratamento Em Adultos Com Diabetes Tipo 2. **Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano**, v. 21, n. 3, 2011.

RAVI, K.; RAJASEKARAN, S.; SUBRAMANIAN, S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 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**, v. 75, p. 2717-2731, 2004.

REYES, B.A.; BAUTISTA, N.D.; TANQUILUT, N.C.; ANUNCIADO, R.V.; LEUNG, A.B.; SANCHEZ, G.C.; MAGTOTO, R.L.; CASTRONUEVO, P.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K.I. Anti-diabetic potentials of *Momordica charantia* and *Andrographis paniculata* and their effects on estrous cyclicity of alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 196-200, 2006.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 223, p. 57-63, 1994.

RORSMAN, P.; BRAUN, M. Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 155-179, 2013.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. *In* Membrane lipid oxidation. United States: CRC Press, 1991.

RUSSO, E.M.; REICHELT, A.A.; DE-SÁ, J.R.; FURLANETTO, R.P.; MOISÉS, R.C.; KASAMATSU, T.S.; CHACRA, A.R. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 1, p. 11-20, 1990.

SCOTT, M.D.; LUBIN, B.H.; ZUO, L.; KUYPERS, F.A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 118, p. 7-16, 1991.

SHAFRIR, E. History and perspective of diabetes illustrated by postage stamps. United States: Freund Publishing House Ltd, 1999.

SHARMA, R.K.; YANG, T.; OLIVEIRA, A.C.; LOBATON, G.O.; AQUINO, V.; KIM, S.; RICHARDS, E.M.; PEPINE, C.J.; SUMNERS, C.; RAIZADA, M.K. Microglial Cells Impact Gut Microbiota and Gut Pathology in Angiotensin II-Induced Hypertension. **Circulation Research**, v. 124, n. 5, p. 727-736, 2019.

SHEELA, N.; JOSE, M.A.; SATHYAMURTHY, D.; KUMBAR, B.N. Effect of silymarin on streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic nephropathy in rats. **Iran Journal of Kidney Diseases**, v. 7, p. 117-123, 2013.

SHUSTER, A.L.; ROCHA, F.E.; WAYSZCEYK, S.; DE LIMA, D.D.; BARAUNA, S.C.; LOPES, B.G.; ALBERTON, M.D.; DAL MAGRO, D.D. Protective effect of *Myrcia pubipetala* Miq. against the alterations in oxidative stress parameters in an animal model of depression induced by corticosterone. **Brain Research**, v. 1, p. 1774-1477, 2022.

SIEMS, W.G.; GRUNE, T.; ESTERBAUER, H. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. **Life Sciences**, v. 57, n. 8, p. 785-789, 1995.

SILVA, F.K.S.; ROSÁRIO, A.S.; SECCO, R.S.; ZOGHBI, M.G.B. Levantamento das espécies conhecidas como pedra-ume-caá (Myrtaceae), com ênfase nas comercializadas na cidade de Belém, Pará, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 5, p. 7-15, 2015.

SOBRAL, M.; MAZINE, F.F.; LEONI, L.; SOUZA, M.C.; MELO, E.A.D. Five new southeastern Brazilian Myrtaceae. **Phytotaxa**, v. 253, n. 1, 2016.

SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M.Z.; SADIKUN, A. In vitro alphasglucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, n. 2, p. 391-398, 2008.

SUN, H.; SAEEDI, P.; KARURANGA, S.; PINKEPANK, M.; OGURTSOVA, K.; DUNCAN, B.B.; STEIN, C.; BASIT, A.; CHAN, J.C.N.; MBANYA, J.C.; PAVKOV, M.E.; RAMACHANDARAN, A.; WILD, S.H.; JAMES, S.; HERMAN, W.H.; ZHANG, P.; BOMMER, C.; KUO, S.; BOYKO, E.J.; MAGLIANO, D.J. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 183, p. 109-119, 2022.

TRIVEDI, N.P.; RAWAL, U.M. Hepatoprotective and antioxidant property of *Andrographis paniculata* (Nees) in BHC induced liver damage in mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, n. 1, p. 41-46, 2001.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN DEN BERG, M.E. Plantas Medicinais na Amazônia: Contribuição ao Seu Conhecimento Sistemático. Brasil: Museu Paraense Emílio Goeldi, Coleção Adolpho Ducke, p. 220, 2010.

VAREDA, P.M.P.; SALDANHA, L.L.; CAMAFORTE, N.A.P.; VIOLATO, N.M.; DOKKEDAL, A.L.; BOSQUEIRO, J.R. *Myrcia bella* Leaf Extract Presents Hypoglycemic Activity via PI3k/Akt Insulin Signaling Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-333, 1981.

WEI, J.; WANG, Q.; ZHENG, H.; WEI, F. Research Progress on Non-Drug Treatment for Blood Glucose Control of Type 2 Diabetes Mellitus. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, vol. 24, n. 10, p. 723-727, 2018.

WHO. Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes. Switzerland: World Health Organization, 2020.

WHO. WHO Guidelines on Safety Monitoring of Herbal Medicines in Pharmacovigilance Systems. Switzerland: World Health Organization, 2014.

WHO. Global report on diabetes. Switzerland: World Health Organization, 2016.

WILSON, P.G.; O'BRIEN, M.M.; GADEK, P.A.; QUINN, C.J. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 11, p. 2013-2025, 2001.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99-105, 1998.

YERMILOV, V.; RUBIO, J.; OHSHIMA, H. Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. **FEBS Letters**, v. 3376, n. 3, p. 207-210, 1995.

YOON, J.W.; JUN, H.S. Insulindependent diabetes mellitus. In Encyclopedia of Immunology. London: Academic Press, p. 1390-1398, 1998.

YOUNG-HYMAN, D.; DE GROOT, M.; HILL-BRIGGS, F.; GONZALEZ, J.S.; HOOD, K.; PEYROT, M. Psychosocial care for people with diabetes: A position statement of the American diabetes association. **Diabetes Care**, v. 39, p. 2126-2140, 2016.

ZHANG, L.; WANG, X.; CUETO, R.; EFFI, C.; ZHANG, Y.; TAN, H.; QIN, X.; JI, Y.; YANG, X.; WANG, H. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. **Redox Biology**, v. 26, p. 101284, 2019.

ZHIPENG, Y.; YIN, Y.; ZHAO, W.; YU, Y.; LIU, B.; LIU, J.; CHEN, F. Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1376-1382, 2011.

ANEXO 1 – OFÍCIO N.º 001/2020 – PRPPG/CEP-CEUA

Joinville, 30 de novembro de 2020

OFÍCIO N.º 002/2020 – PRPPG/CEP

Para Pesquisadora Daniela Delwing de Lima
Projeto de pesquisa vinculado à Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Assunto: Parecer Processo de nº 01/2020

O projeto de Pesquisa intitulado “**BIOPROSPECÇÃO E POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE, HIPOLIPEMIANTE E ANTIOXIDANTE DE *Myrcia pubipetala* NA DIABETES TIPO I E TIPO II**”, de sua responsabilidade, foi considerado **APROVADO** de acordo com o Parecer Consubstanciado, de 27/11/2020 em anexo e emitido em 30/11/2020.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais – CEUA/UNIVILLE, de acordo com as atribuições definidas na Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, Resolução 19/07 CEP/UNIVILLE e demais normas, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa CEUA nº 01/2020, protocolado em 22/09/2020.

Atenciosamente,



Marcia Luciane Lange Silveira
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Univille

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO

1) Dados Gerais

Protocolo nº: 001/2020

Data de entrada no Comitê: 22/09/2020

Comitê: () Humanas (X) Animais

Área Temática Especial: (X) Não

() Sim. Qual? Não se aplica.

Projeto de Dissertação vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

Fonte Financiadora: Carta convite

2) Título

BIOPROSPECÇÃO E POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE, HIPOLIPEMIANTE E ANTIOXIDANTE DE *Myrcia pubipetala* NA DIABETES TIPO I E TIPO II

3) Responsável

Daniela Delwing de Lima

4) Participantes

Débora Delwing Dal Magro

Eduardo Manoel Pereira

Alunos (dois) de Iniciação Científica (a serem selecionados)

Aluno do mestrado em Saúde e Meio Ambiente (a ser selecionado)

5) Sumário e Análise Crítica

O referido trabalho se propõe a verificar os efeitos da administração crônica dos extratos hidroalcoólico (EHA) e fração acetato de etila (FAE) obtidos das folhas da *Myrcia pubipetala* sobre as alterações provocadas pela DM tipo 1 e tipo 2, induzida pela aloxana e pela estreptozotocina, respectivamente, no estresse oxidativo, hiperglicemia e hipertrigliceridemia em sangue e rins e nas alterações imunohistoquímicas do pâncreas de ratos.

Em parecer anterior foram indicadas pendências, as quais foram respondidas pela pesquisadora e analisadas por este Comitê, conforme segue:

- a) Solicita-se explicação em relação a escolha do número de animais dos grupos como 08 animais;

Resposta: O número máximo de animais que será utilizado por grupo será 8. Esse número já leva em conta a possibilidade de perda de alguns animais, o que poderá aumentar a necessidade de compra de mais ratos. Inicialmente o número de animais por grupo será de 6 (grupos controles) e 7 (grupos diabéticos e diabéticos x extratos ou fração). Caso ocorra morte devido indução de diabetes, teremos a possibilidade de comprar mais animais, uma vez que o número 8 por grupo terá sido aprovado pelo CEP.

A toxina induz diabetes em 80-90% dos animais em que é feita a indução, porém existe o risco tanto dos animais virem à óbito poucos dias após a indução ou dos animais não apresentarem indução de diabetes bem sucedida. Por isso, foram sugeridos oito animais por grupo. Considerando possíveis perdas, é necessário que se tenham pelo menos seis animais por grupo para que se alcance poder estatístico para o experimento, assim, é planejado um número de animais por grupo ligeiramente maior por causa do risco de não ocorrer a indução ou de haver óbito logo após esta

Situação: pendência respondida.

- b) Observando o exposto no Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica, em seu capítulo de Introdução Geral (RES. CONCEA nº 25/2015), tendo em vista a necessidade de atuação frente aos 3 R's, assim como, a necessidade de

obtenção de resultados aplicáveis e relevantes, este comitê sugere que os grupos controles sejam formados por 6 animais;

Resposta: Os grupos controles serão formados por 6 animais. Inserimos o número 8 de animais por grupo, somente em caso de perda, conforme descrito na questão 1, o que se aplica aos animais em teste, não aos controles.

Situação: pendência respondida.

- c) Solicita-se explicação referentes ao embasamento teórico para a dosagens escolhidas, com vistas a possibilidade de exclusão da dose de 25 mg/kg dos extratos hidroalcoólico e da fração acetato de etila;

Resposta: As doses do extrato hidroalcoólico e da fração acetato de etila (25, 50, 100 e 150mg/kg) foram escolhidas com base nos estudos de Kar et al., 2013; Ravi et al., 2005 e Ravi et al., 2004.

Consideramos importante a utilização da dose de 25 mg/kg porque caso apresente efeito antioxidante, hipoglicemiante e hipolipemiante será a que menos tem possibilidade de causar efeitos colaterais no uso contínuo.

Para encontrar a dose mais adequada, mesmo embasando-se na literatura, é preciso construir curva dose-resposta com pelo menos três doses, posto que uma ou duas doses podem sequer demonstrar alguma eficácia e doses acima ou abaixo destas duas serão suficientes para garantir uma exposição de 3-4 vezes maior ou menor, propiciando varredura mais suficiente para uma conclusão mais fidedigna sobre o extrato ou fração ser ou não eficaz.

Apesar de três doses serem consideradas suficientes para elaboração de curva dose-resposta, foi mantida a dose de 25 mg/kg exatamente porque é possível que esta promova efeito cuja intensidade não difira significativamente em termos estatísticos das doses mais altas, o que nos permitirá continuar trabalhando com a dose mais baixa, o que implica em menor possibilidade de toxicidade.

Situação: pendência respondida.

- d) Solicita-se que o momento de sacrifício de um animal não seja presenciado por nenhum outro animal, ou seja, os animais sejam mantidos no seu ambiente de descanso até o momento do seu sacrifício.

Resposta: Nosso grupo de pesquisa sempre realiza o sacrifício dos animais em ambiente separado. Os animais são transportados no biotério, para ao local de sacrifício, somente no horário determinado para cada um deles, desta forma os demais não visualizam o sacrifício.

No biotério, entre a sala de manutenção dos animais, tem-se um distanciamento entre quatro a cinco metros desta sala para o local onde é feito o sacrifício dos animais, que são conduzidos um a um exatamente porque o estresse, o barulho e o cheiro podem provocar alterações tanto na dosagem glicêmica quanto da atividade oxidativa.

Situação: pendência respondida.

6) PARECER (SINTÉTICO)

- ☐ Não aprovado
- ☐ Com pendências
- ☒ Aprovado



Joinville, 30 de novembro de 2020

Prof.^a Dr.^a Márcia Luciane Lange Silveira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Univille

ANEXO 2 – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data 23/06/2023.

1. Identificação do material bibliográfico: () Tese (X) Dissertação () Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: Gabriela Borgmann

Orientador: Profª Drª Daniela Delwing de Lima

Data de Defesa: 14/03/2023

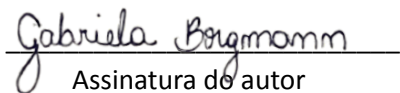
Título: Bioprospecção e potencial hipoglicemiante, hipolipemiante e antioxidante de *Myrcia pubipetala* na diabetes tipo II

Instituição de Defesa: Universidade da Região de Joinville

3. Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral (X) Sim () Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.


Assinatura do autor

Joinville, 23 de junho de 2023
Local/Data