

**UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA E FARMÁCIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**Fatima Karina Bolico da Silva**

**AVALIAÇÃO in vivo DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DE *Tripodanthus acutifolius* EM RATOS WISTAR**

**Santa Cruz do Sul  
2019**

**Fatima Karina Bolic da Silva**

**AValiação in vivo DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DE Tripodanthus  
acutifolius EM RATOS WISTAR**

**Trabalho de pesquisa a ser apresentado à disciplina de  
Trabalho de Curso II, do Curso de Farmácia da  
Universidade de Santa Cruz do Sul.**

**Orientador: Chana de Medeiros da Silva  
Coorientador: Danielly Joani Bullé**

**Santa Cruz do Sul  
2019**

## RESUMO

O diabetes mellitus é caracterizado por uma resistência à insulina, secreção defeituosa, resistência à insulina, ou ambos, o qual é um problema de saúde pública mundial devido ao seu alto índice de morbidade e mortalidade. Além das terapêuticas convencionais disponíveis existem também medicamentos fitoterápicos, para o manejo dos sintomas. No Brasil o uso de plantas medicinais com potencial terapêutico ocorre de forma expressiva, devido à extensa e diversificada flora, desta maneira, há uma quantidade representativa de plantas antidiabetogênicas sendo utilizadas pela população. A família Loranthaceae, especificamente da espécie *Tripodanthus acutifolius*, a qual já é utilizada popularmente como hipoglicemiante na forma de infusão (chá) de suas folhas. A partir disso, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade hipoglicemiante de *T. acutifolius* (erva-de-passarinho), em ratos Wistar através de uma indução de hiperglicemia com dieta de cafeteria. A administração da dieta se deu em 24 animais, preparada a partir de uma dieta padrão acrescida de carboidratos simples, além de refrigerante. A análise quantitativa do consumo de alimentos e de água foi realizada diariamente e as análises de peso e glicose foram realizadas semanalmente. Para o tratamento, os animais foram divididos em 4 grupos, o controle negativo (placebo), o controle positivo com hipoglicemiante, e duas concentrações (20 e 40mg/Kg) de extrato, administradas por gavagem diariamente por 15 dias. Os animais hiperglicêmicos apresentaram ganho de peso e IMC significativo quando comparados ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ), em contraponto a glicemia esperada não foi atingida. Em conclusão podemos discutir que a dieta de cafeteria desenvolvida não é um modelo de escolha para indução de hiperglicemia, por ser usado em um tempo incorreto ou em concentrações não apropriadas. Sendo assim, não foi possível encontrar diferenças significativas na ação hipoglicemiante do extrato estudado, pois o curto tempo não se mostrou eficaz, mesmo a planta, a qual já é utilizada com esta ação em uso popular.

**Palavras-chaves:** Diabetes, Dieta de Cafeteria, hipoglicemiante, *Tripodanthus acutifolius*

### ABSTRACT

The diabetes mellitus is characterized by insulin resistance, defective secretion, insulin resistance, or both, which is a worldwide public health problem due to its high morbidity and mortality rate. In addition to the conventional therapeutics available there are also herbal medicines for the management of symptoms. In Brazil the use of medicinal plants with therapeutic potential occurs in an expressive way, due to the extensive and diversified flora, in this way, there is a representative amount of antidiabetogenic plants being used by the population. The family Loranthaceae, specifically of the species *Tripodanthus acutifolius*, which is already popularly used as hypoglycemic in the form of infusion (tea) of its leaves. From this, the objective of this work is to evaluate the hypoglycemic activity of *T. acutifolius* (birdgrass) in Wistar rats through an induction of hyperglycemia with a cafeteria diet. The diet was administered in 24 animals, prepared from a standard diet plus simple carbohydrates, in addition to soda. Quantitative analysis of food and water intake was performed daily and weight and glucose analyzes were performed weekly. For the treatment, the animals were divided into 4 groups, the negative control (placebo), the positive control with hypoglycemic, and two concentrations (20 and 40mg / kg) of extract, administered by gavage daily for 15 days. The hyperglycemic animals showed significant weight gain and BMI when compared to the control group ( $p \leq 0.05$ ), whereas the expected glycemia was not reached. In conclusion we can argue that the developed cafeteria diet is not a model of choice for the induction of hyperglycemia, because it is used in an incorrect time or in inappropriate concentrations. Therefore, it was not possible to find significant differences in the hypoglycemic action of the extract studied, because the short time was not effective, even the plant, which is already used with this action in popular use.

**Key-words:** Diabetes, Cafeteria diet, hypoglycemic, *Tripodanthus acutifolius*

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	6
2 OBJETIVOS .....	8
2.1 Objetivo geral .....	8
2.2 Objetivos específicos .....	8
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	9
3.1 Diabetes mellitus .....	9
3.1.1 Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) .....	9
3.1.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) .....	10
3.1.3 Outros tipos de Diabetes .....	11
3.1.4 Diagnóstico e Formas de tratamento .....	11
3.2 Plantas hipoglicêmicas .....	12
3.2.1 Família Loranthaceae e gênero Tripodanthus .....	12
3.2.2 Tripodanthus acutifolius .....	13
3.3 Avaliação in vivo da atividade hipoglicemiante .....	16
3.3.1 Modelos animais .....	16
3.3.2 Dieta de cafeteria .....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
4.1 Coleta, identificação e processamento do material botânico .....	18
4.1.1 Coleta do material vegetal .....	18
4.1.2 Preparo do extrato aquoso bruto .....	18
4.2 Aquisição dos modelos animais .....	18
4.2.1 Comissão de ética para o uso de animais (CEUA) .....	19
4.2.2 Biotério/Condições .....	19
4.2.3 Seleção dos animais .....	19
4.2.4 Dieta .....	19
4.2.5 Distribuição e tratamento.....	20

4.2.6 Eutanásia e Destino dos animais .....	21
4.3 Parâmetros analisados .....	21
4.3.1 Determinação da glicose sanguínea.....	21
4.3.2 Teste oral de tolerância a glicose .....	22
4.3.3 Valores de referência .....	22
4.3.5 Avaliação antropométrica.....	23
4.4 Estatísticas.....	23
5 RESULTADOS .....	24
Artigo: AVALIAÇÃO in vivo DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DE <i>Tripodanthus acutifolius</i> EM RATOS WISTAR HIPERGLICÊMICOS .....	25
INTRODUÇÃO.....	26
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	38
REFERÊNCIAS .....	39
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	41
REFERÊNCIAS .....	42
ANEXO – Orientações Para Submissão .....	46

## INTRODUÇÃO

A insulina é um hormônio necessário para converter açúcar, amido e outros alimentos em energia necessária para a vida diária; a deficiência na produção ou na utilização deste hormônio caracteriza a Diabetes mellitus (DM). As causas desta patologia variam, podendo ser genéticas ou associados a fatores ambientais, como sedentarismo e obesidade (BARBOSA-FILHO et al., 2005).

DM é um problema de saúde pública mundial devido ao seu alto índice de morbidade e mortalidade (CAVALLI et al., 2006). Em 2015, 5 milhões de pessoas com idade entre 20 e 79 anos morreram com diabetes, ocorrendo um óbito a cada seis segundos. Estima-se que cerca de 8,8% da população mundial é acometida por esta patologia O Brasil está no ranking entre os cinco países com maior número de habitantes diabéticos, com projeção para ter mais de 23 milhões de pessoas acometidas em 2040... Além disso, o país está em 3º lugar entre os países com maior número de DM1 em crianças abaixo de 14 anos, totalizando 30.900 casos. O aumento desta prevalência pode estar associado a diversos fatores como, a rápida urbanização, desequilíbrio nutricional, excesso de peso, sedentarismo, transição nutricional e crescimento e envelhecimento da população (BRASIL, 2017).

O DM está associado a diversas complicações, como doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, cegueira, insuficiência renal, amputações de membros, dentre outras, o que acaba contribuindo para o aumento das taxas de hospitalizações e consequentemente desencadeando uma maior utilização dos serviços de saúde, principalmente o paciente diabético não tratado ou não controlado. Morbidades de grande impacto estão associadas ao DM, como hipertensão arterial, tuberculose, HIV e obesidade (BRASIL, 2017).

Como esta patologia não tem cura é necessário um manejo correto para controle da mesma, que se resume em manter o nível de açúcar no sangue o mais normal possível, o que geralmente é realizado através de exercícios físicos aliados a dieta e uso de medicação. Além das opções terapêuticas convencionais disponíveis existem também medicamentos fitoterápicos, os quais já são usados há muito tempo, visto que, muitas plantas possuem propriedades hipoglicêmicas além de outros efeitos benéficos para a saúde (NASRI et al., 2015).

O mecanismo de ação das plantas hipoglicêmicas está atribuído ao aumento da liberação de insulina através da estimulação das células beta-pancreáticas, ao aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina, a resistência aos hormônios, a diminuição da perda de glicogênio, a eliminação dos radicais livres e ao aumento do consumo de glicose nos tecidos

e órgãos (VOLPATO et al., 2002; HOU et al., 2003). Os principais constituintes naturais que apresentam esta atividade hipoglicemiante são carboidratos, alcaloides, glicopeptídeos, terpenóides, flavonoides e cumarinas (NEGRI, 2005 apud TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

No Brasil o uso de plantas medicinais com potencial terapêutico ocorre de forma expressiva, devido à extensa e diversificada flora, desta maneira, há uma quantidade representativa de plantas antidiabetogênicas sendo utilizadas pela população (ALVARENGA et al., 2017). Um estudo realizado por Trojan-Rodrigues et al (2012) encontrou 42 famílias botânicas utilizadas no Rio Grande do Sul para DM, dentre estas, a família da Loranthaceae, e mais especificamente a espécie *Tripodanthus acutifolius*.

Vários estudos realizados por diferentes autores já confirmaram as propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, diurética, hipocolesterolêmica e suposta atividade hipoglicemiante do gênero. A espécie *Tripodanthus acutifolius* foi relatada por Soberón e colaboradores (2010), Trojan-Rodrigues e colaboradores (2012) e por Coelho e colaboradores (2017) como hipoglicemiante, sendo administrada na forma de infusão (chá) de suas folhas em uso popular. Além da espécie *T. acutifolius*, outras espécies da mesma família Loranthaceae também são utilizadas popularmente como hipoglicemiantes. Portanto pouco se sabe sobre a comprovação desta ação hipoglicemiante, bem como os mecanismos envolvidos nesta atividade.

Frente a esta realidade torna-se imprescindível a procura de novas alternativas para o tratamento, desta forma, busca-se encontrar plantas com potencial hipoglicemiante que possam atuar na terapêutica da patologia, assim como, investigar a ação hipoglicemiante, buscando encontrar uma droga com grande potencial para se tornar um fármaco hipoglicemiante fitoterápico.

Comentado [KB1]: Não sei se era isso que a Lizi sugeriu, ela falou pra colocar uma justificativa ao trabalho.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

**Avaliar a atividade hipoglicemiante in vivo de *Tripodanthus acutifolius* em ratos hiperglicêmicos.**

### **2.2 Objetivos específicos**

**Induzir hiperglicemia em ratos através da dieta de cafeteria;**

**Testar a atividade hipoglicemiante do extrato aquoso bruto de *T. acutifolius* em ratos diabéticos, nas concentrações de 20mg/Kg e 40mg/Kg;**

**Avaliar a viabilidade dos extratos como novas fontes para o desenvolvimento de fármacos hipoglicemiantes.**

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Diabetes mellitus

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença caracterizada pela hiperglicemia (excesso de glicose no sangue) causada pela deficiência na síntese e/ou ação do hormônio insulina. Esta patologia traz alterações no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas, podendo causar efeitos secundários como insuficiência renal, doenças cardíacas, deficiências físicas, dentre outras (GHANBARI et al., 2016).

É uma patologia sem cura, o seu manejo é controlar os níveis de glicose no sangue mais próximos da normalidade, associando exercícios físicos, dieta além do uso de medicações apropriadas (NASRI et al., 2015).

DM resulta em um estado crônico de hiperglicemia em aproximadamente 7 milhões de pessoas por ano. Estima-se que em 2030, as pessoas com diabetes totalizarão 366 milhões, especialmente na faixa etária de 45 a 64 anos de idade (RODRIGUES et al., 2012). A Federação Nacional de Diabetes (International Diabetes Federation, IDF) estimou em 2015 que 8,8% da população mundial possui diabetes na faixa etária de 20 a 79 anos e suas perspectivas são que em 2040 ultrapasse os 643 milhões de pessoas acometidas (IDF, 2015).

A Sociedade Brasileira de Diabetes (2017) aponta que o Brasil está na quarta posição no ranking de países com maior número de diabéticos. Estima-se que em 2040 serão aproximadamente 23,3 milhões de brasileiros acometidos pela doença.

Suas complicações danificam os capilares causando microangiopatia, afetando os vasos sanguíneos na retina ocular, causando problemas visuais que incluem visão reduzida e cegueira (NASRI et al., 2015). Outras complicações associadas ao DM são distúrbios macrovasculares como acidente vascular cerebral e doenças da artéria coronária, que são de grande preocupação e incidência desta patologia (CAVALLI et al., 2006).

A sua classificação é baseada em sua etiologia, os principais fatores são genéticos, biológicos e ambientais, mas suas causas não estão completamente estabelecidas (BRASIL, 2017).

##### 3.1.1 Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)

O DM1 é caracterizado por ser a patologia juvenil, autoimune, poligênica, com presença de marcadores genéticos, decorrente da destruição das células beta pancreáticas, ocasionando deficiência completa na produção de insulina (NASRI et al., 2015; BRASIL, 2017). Consiste na destruição das células beta pancreáticas através da resposta anti-inflamatória mediada por

células T, bem como resposta humoral (células B). Uma característica específica do DM1 é a presença de autoanticorpos que agem nas ilhotas pancreáticas, assim como autoanticorpos à insulina (IAA), proteína tirosina fosfatase (IA2 e IA2beta), ácido glutâmico descarboxilase (GAD, GAD65) e proteína transportadora de zinco (ZnT81), caracterizando esta doença como autoimune (KHARROUBI; DARWISH, 2015).

A predisposição genética se dá com indivíduos portadores do genótipo HLA, o principal determinante genético da DM1, o locus de maior importância é o IDDM1 situado no braço curto do cromossomo 6 (6p21) que codifica múltiplos genes envolvidos na função e regulação da resposta imune. O segundo locus de importância relevante é o IDDM2 que se localiza no gene da insulina, no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5), alterando assim a tolerância a insulina (GUELHO et al., 2013).

O DM1 se desenvolve de maneira rápida, produzindo sintomas como polidipsia, enurese, poliúria, cansaço, falta de energia, polifagia, perda de peso, cicatrização lenta, infecções recorrentes, visão turva, desidratação e cetoacidose diabética (KHARROUBI; DARWISH, 2015).

### 3.1.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

O DM2 é reconhecida por ser a patologia característica da vida adulta e não dependente de insulina (NASRI et al., 2015). Sua etiologia é complexa e multifatorial, envolvendo componentes ambientais e genéticos, sendo uma doença poligênica, com herança familiar forte (BRASIL, 2017). Além da resistência à insulina, o aumento da demanda por insulina não pode ser recebido pelas células beta pancreática devido a defeitos nas suas funções. Seus sintomas iniciais são leves, atrasando um diagnóstico rápido. Este atraso no diagnóstico pode aumentar o número de complicações em longo prazo. A resistência à insulina pode causar também além do diabetes, obesidade, hipertensão, nefropatia, dislipidemia, doenças hepáticas, inflamação sistêmica, dentre outros (KHARROUBI; DARWISH, 2015).

O DM2 apresenta complexidade nos seus padrões de transmissão genética que limitam a identificação precisa dos genes responsáveis pela patologia. O principal marcador genético é o gene transcriptionfactor like-2 (TCF7L2) situado no cromossomo 10 (10q25), este, é um fator de transcrição envolvido na via de sinalização Wnt. O polimorfismo associado ao TCF7L2 representa um aumento de aproximadamente 50% no risco de DM2 dos indivíduos portadores (GUELHO et al., 2013).

### 3.1.3 Outros tipos de Diabetes

Outras formas de diabetes podem ocorrer, as quais incluem defeitos genéticos que acarretam na disfunção das células beta, na ação da insulina e nas doenças do pâncreas exócrino. Diabetes também está associado a doenças endócrinas que secretam hormônios em excesso, assim como em pacientes com síndromes, como síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner e síndrome de Wolfran (KHARROUBI; DARWISH, 2015).

DM também pode ser do tipo gestacional, pois a gestação consiste em condição diabetogênica na qual a placenta produz hormônios hiperglicemiantes e enzimas placentárias que degradam a insulina, desta forma, aumenta a produção de insulina, assim como resistência a insulina, podendo acarretar disfunção das células beta pancreáticas (BRASIL, 2017).

O diabetes monogênico é causado devido a um defeito genético em genes únicos nas células betas pancreáticas que resultam na ruptura da função ou na redução. Já o diabetes mitocondrial ocorre devido a uma mutação pontual no DNA mitocondrial associado à surdez e a transmissão de DNA mutante pelas mães (KHARROUBI; DARWISH, 2015).

### 3.1.4 Diagnóstico e Formas de tratamento

Os critérios de diagnósticos baseiam-se em exames, os quais correspondem a uma hemoglobina glicada (A1C) maior ou igual a 6,5%, glicemia de jejum superior ou igual a 126mg/dL em um jejum de no mínimo 8 horas, glicemia 2 horas após sobrecarga com 75g de glicose superior ou igual a 200mg/dL e glicemia ao acaso superior ou igual a 200mg/dL (BRASIL, 2018).

Como esta patologia não tem cura é necessário um manejo correto, o qual, se resume em manter o nível de açúcar no sangue o mais normal possível, o que geralmente é realizado através de exercícios físicos aliados a dieta e uso de medicação. O objetivo do tratamento medicamentoso é manter um nível de HbA1C próximo a 7% em adultos e entre 7,5-8,5% em idosos, mas além disso, é importante controlar os níveis de colesterol, obesidade, pressão arterial, tabagismo e sedentarismo (NASRI et al., 2015; BRASIL, 2018).

As terapias utilizadas para o DM2 incluem sulfonilureias, biguanidas, inibidores da alfa-glicosidase, tiazolidinedionas e inibidores da depeptidil-peptidase-4. Já na DM1, o tratamento consiste na utilização de insulina sintética, geralmente em forma de combinação entre mais de um tipo. Além das opções terapêuticas convencionais disponíveis existem também muitos medicamentos fitoterápicos, os quais são usados há muito tempo para o tratamento. Os fármacos sintéticos de maneira geral são caros e produzem sérios efeitos colaterais. Uma

alternativa a este problema são os medicamentos fitoterápicos que possuem atividade antioxidante e com a vantagem de apresentarem menos efeitos colaterais (NASRI et al., 2015).

Esta patologia está associada também ao estresse oxidativo causado por radicais livres, de frente a isso, os fitoterápicos possuem potencial para combater as complicações causadas pelo DM (NASRI et al., 2015).

### 3.2 Plantas hipoglicêmicas

No Brasil, há um grande número de plantas utilizadas como antidiabéticas, conforme relatada pelos autores Negri (2005), Barbosa-Filho et al., (2005), Borges et al., (2008) e Volpato et al., (2012). Especificamente no estado do Rio Grande do Sul, alguns estudos etnobotânicos descrevem que o uso de plantas para controlar a glicemia é comum (SIMÕES et al., 1986 apud TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

O mecanismo de ação das plantas hipoglicêmicas está atribuído ao aumento da liberação de insulina através da estimulação das células beta-pancreáticas; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; resistência aos hormônios; diminuição da perda de glicogênio; eliminação dos radicais livres; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos (VOLPATO et al., 2002; HOU et al., 2003). Os principais constituintes naturais que apresentam esta atividade hipoglicemiante são carboidratos, alcaloides, glicopeptídeos, terpenóides, flavonoides e cumarinas (NEGRI, 2005 apud TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

No Brasil o uso de plantas medicinais com potencial terapêutico ocorre de forma expressiva, devido à extensa e diversificada flora, deste modo, há uma quantidade representativa de plantas antidiabéticas sendo utilizadas pela população (ALVARENGA et al., 2017). Um estudo realizado por Trojan-Rodrigues et al (2012) encontrou 42 famílias botânicas utilizadas no Rio Grande do Sul para DM, dentre estas a família da Loranthaceae, especificamente do gênero *Tripodanthus acutifolius*.

#### 3.2.1 Família Loranthaceae e gênero *Tripodanthus*

O gênero *Tripodanthus* é pertencente à família Loranthaceae, sendo esta a maior família da ordem Santalales, a qual é formada por 73 gêneros e mais de 1000 espécies hemiparasitas tornando a família de hemiparasitas uma das mais representativas (SOUZA; LORENZI, 2012). As espécies de Loranthaceae são vegetais primeiramente silvestres, distribuídos nas regiões tropicais e climas temperados, onde as zonas de tempestades causam pouco ou nenhum dano ao hospedeiro, ao contrário, do que acontece nos trópicos (CONCEIÇÃO et al., 2010).

As espécies hemiparasitas crescem em galhos de árvores ou arbustos hospedeiros realizando uma conexão com o xilema deste para retirar água e nutrientes (CAZZETA; GALETTI, 2017). Além da característica sugatória, a presença de clorofila e a realização de fotossíntese faz com que este gênero metabolize seus próprios compostos orgânicos contribuindo para a grande capacidade de proliferação destas espécies, o que os torna caracterizando-as hemiparasitas (ROTTA et al., 2005).

O gênero *Tripodanthus* é composto por apenas três espécies com ocorrência predominante na América do Sul: *Tripodanthus flagellaris* (Cham. & Schledl.) Tiegh, encontrados no Uruguai e Argentina; *Tripodanthus belmirensis* Roldan & Kujit, endêmica da Colômbia; e *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Tiegh, mais amplamente distribuída na Venezuela, Argentina, Uruguai e no Brasil (DETTKE; WAECHTER, 2014).

### 3.2.2 *Tripodanthus acutifolius*

Esta espécie é conhecida popularmente como Erva-de-passarinho porque a maior parte das espécies depende das aves para dispersão das suas sementes (CAZZETA; GALETTI, 2003). Os pássaros usam seus frutos para alimentação e liberam as sementes por regurgitação ou defecação, que, ao serem liberadas estas se aderem nas plantas hospedeiras por possuírem uma camada de substância mucilaginosa. A partir deste fato os pássaros são considerados agentes facilitadores da germinação e disseminadores da espécie (CONCEIÇÃO et al., 2010). Para que a germinação ocorra é necessário que as sementes germinem sobre o galho e o haustório precisa penetrar no hospedeiro desenvolvendo uma união complexa com o tecido vascular deste (CAZZETA; GALETTI, 2017).

A relação com o hospedeiro é limitante, pois alguns fatores como a viabilidade, qualidade, resistência do hospedeiro ao parasita e a preferência deste são fundamentais para que a germinação ocorra. Assim, é fundamental a compatibilidade com o hospedeiro e onde o sucesso de dispersão influenciará diretamente na germinação e no seu estabelecimento. Algumas plantas são generalistas, enquanto que outras apresentam limitação na qualidade de hospedeiros que parasitam, havendo algumas que parasitam apenas uma única espécie, as chamadas especialistas (CONCEIÇÃO et al., 2010).

*T. acutifolius* apresenta raízes epicorticais, formando haustórios secundários no contato com o hospedeiro. Seu caule é pendente, com ramos jovens elipsoidais a circulares em seção transversal, ramos adultos circulares, até 6 cm de diâmetro, entrenós superfície fissurada, lenticelas circulares ou elípticas. Apresenta folhas coriáceas, opostas, elípticas, oblongas ou ovadas, presença de lenticelas na face abaxial, circulares; base aguda ou obtusa, ápice agudo,

convexo ou acuminado, mucronado; nervação pinada, a nervura principal conspícua, as secundárias inconspícuas. Apresenta inflorescências laterais e terminais, racemos, geralmente duas ou mais por axila; brácteas caducas; flores da tríade pedunculadas; botões florais retos, ápice agudo, pétalas de coloração amarela ou branca, lígula ausente; estilete, estames heterodínamos, anteras e frutos oblongos (Figura 1) (DETTKE; WAECHTER, 2014).



Figura 1- *Tripodanthus acutifolius*: A - hábito escandente na copa de cinamomo (*Melia azedarach*); B - Ramos e folhas; C - Flores; D – Frutos.  
Fonte: ROTTA et al., 2005.

Os principais constituintes químicos identificados são os glicoflavonóides, como rutina, nicotiflorina, hiperosídeo e isoquercetina, além de um fenilbutanóide, o tripodantosídeo. Também já foi relatada a presença de outros compostos fenólicos nesta espécie, como flavonoides, taninos, proantocianidinas e catequinas, além de derivados antracênicos (SOBERÓN et al., 2010a).

Quanto às suas propriedades farmacológicas, vários estudos realizados por diferentes autores já confirmaram as propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, diurética, hipocolesterolêmica, dentre outras. Coelho et al. (2018) descreve o efeito protetor de extrato hidroalcoólico em ratos Wistar hipercolesterolêmicos, provando uma melhora do perfil hematológico, lipídico, antiinflamatório, cardíaco, hepático, renal e antioxidante.

Soberón et al. (2010a) realizaram um estudo para avaliar a atividade sequestradora de radicais livres e inibição de enzimas inflamatórias de fenólicos isolados; em outro estudo (2010c) avaliaram a atividade anti-inflamatória de metabólitos isolados de *T. acutifolius*, ressaltando o grande potencial farmacêutico como agente quimioterápico, além de auxiliar na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, com mecanismo de aumento de defesas antioxidantes.

A atividade antibacteriana foi avaliada por Souza et al. (2014) frente a *Staphylococcus aureus*, inibindo o crescimento do microrganismo, bem como por Daud et al, (2006) inibindo bactérias gram-positivas, como *S. aureus*, *S. saprophyticus* e *Enterococcus faecalis*, quanto de bactérias gram-negativas, como *Serratia marcescens*, *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*.

Daud et al. (2006) também avaliaram os efeitos antiinflamatórios, bem como os efeitos antipiréticos e analgésicos do extrato de *Phrygilanthus actifolius*, com resultados satisfatórios para estas atividades. Uma avaliação realizada com a mesma espécie por Intersimone et al. (2005) buscou avaliar a atividade diurética com extratos aquosos e alcoólico apresentando resultados positivos.

Popularmente, a espécie *Tripodanthus acutifolius* foi relatada por Soberón e colaboradores (2010), Trojan-Rodrigues e colaboradores (2012) e por Coelho e colaboradores (2017) como hipoglicemiante, administrada na forma de infusão (chá) de suas folhas. Entretanto pouco se sabe sobre a comprovação desta ação hipoglicemiante, bem como pelos mecanismos envolvidos nesta atividade. Além da espécie *T. acutifolius*, outras espécies da família Loranthaceae também são utilizadas popularmente como hipoglicemiantes (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies vegetais da família Loranthaceae utilizadas popularmente como hipoglicemiantes

ESPÉCIE	AUTOR
<i>Loranthus micranthus</i>	OSABEDE et al., 2010;
<i>Pharadendron reichenbachianum</i>	RAMÍREZ-ESPINOZA et al., 2013.
<i>Phthirusa verruculosa</i>	RODRIGUEZ et al., 2008.
<i>Phthirus acastillana</i>	RODRIGUEZ et al., 2008.
<i>Psittacanthus acimarius</i>	RODRIGUEZ et al., 2008.
<i>Struthanthus polyrhizus</i>	ALVARENGA et al., 2017.
<i>Struthanthus vulgaris</i> Eichler	TROJAN-RODRIGUES et al., 2012.
<i>Struthanthus flexicaulis</i>	SANTOS; VILANOVA, 2017.
<i>Viscum album</i> Linn	MISHA et al., 2009.



### 3.3 Avaliação in vivo da atividade hipoglicemiante

#### 3.3.1 Modelos animais

Existe grande interesse em desenvolver novos fármacos que visam evitar complicações associadas a patologia e é crescente o interesse científico em avaliar produtos naturais em estudos experimentais. Para avaliação in vivo é necessário que os animais apresentem diabetes, para isso, a maioria dos estudos realizam a indução por manipulações farmacológicas, cirúrgicas ou genéticas (FRODE; MEDEIROS, 2008).

A indução farmacológica ao DM é realizada com estreptozotocina e aloxano. A estreptozotocina entra nas células beta pancreáticas através de um transportador de glicose-GLUT2 e causa alquilação do DNA, também induz a ativação da ribosilação de difosfato de poli-adenosina e liberação de óxido nítrico, assim, as células beta pancreáticas são destruídas por necrose. O aloxano e o produto da sua redução, o ácido dialúrico, realizam ciclo redox formando radicais superóxidos, estes radicais sofrem dismutação ao peróxido de hidrogênio com um aumento significativo na concentração de cálcio citosólico, causando destruição rápida das células beta (FRODE; MEDEIROS, 2008).

Modelos cirúrgicos são utilizados a partir da remoção completa do pâncreas, o que não é utilizado com muita frequência, pois é uma cirurgia de grande porte com alto risco de infecção, necessita de analgesia pós-operatória adequada, alto nível de especialização técnica, ambiente cirúrgico adequado, suplementação com enzimas pancreáticas para evitar má absorção e perda da resposta regulatória pancreática a hipoglicemia (FRODE; MEDEIROS, 2008).

Estirpes de animais que desenvolveram espontaneamente diabetes é uma opção alternativa, pois, são semelhantes à condição humana, apresentam características complexas e heterogêneas. Neste caso, o tipo de animal varia de acordo com o tipo de diabetes que se pretende avaliar. Para avaliar a diabetes do tipo 2 é utilizado rato ob/ob que consegue manter a euglicemia devido a resposta robusta e persistente das células beta pancreáticas compensatória. Já o camundongo db/db desenvolve rapidamente hiperglicemia, pois suas células beta pancreáticas são incapazes de manter os altos níveis de secreção de insulina necessários. O rato Goto-Kakizaki é espontaneamente diabético, originário da reprodução seletiva de gerações de ratos Wistar não diabéticos intolerantes à glicose. Para avaliar diabetes do tipo 1 utiliza-se camundongos NOD que apresenta hiperglicemia em poucas semanas de idade, utilizado também para avaliar aterosclerose (FRODE; MEDEIROS, 2008).

### 3.3.2 Dieta de cafeteria

A dieta de cafeteria serve como uma alternativa para induzir o diabetes em ratos normais, pois é uma simulação da dieta humana, que consiste em uma dieta desequilibrada com macronutrientes, a qual, está relacionada a alterações metabólicas (BORBA et al., 2011).

A dieta de cafeteria é reproduzida por refeições de fast-food, ou seja, contendo um elevado teor de carboidratos e gorduras, sendo os ingredientes e suas proporções variáveis, podendo ser hiperlipídicas, hipercalóricas ou associações. A partir disso, ressalta que há uma associação existente entre uma densidade calórica elevada e densidade nutricional baixa (menor quantidade de vitaminas e nutrientes por caloria ingerida) caracterizando a alimentação atual de grande parte da população mundial (ALMEIDA et al., 2008).

A dieta utilizada para avaliar sobrepeso e obesidade descrita por Almeida et al (2008) inclui os seguintes alimentos: mortadela, marshmallow, chips bacon, bolacha waffer, bolacha recheada, chips queijo, salsicha, pão francês, paçoca, refrigerantes de guaraná e cola, além da ração controle e água ad libitum, os quais, são considerados mais comuns neste tipo de estudo.

Bernardes et al. (2004) avaliou o metabolismo de carboidratos e lipídeos através de uma dieta hipercalórica contendo por peso 19% de proteína, 47% de carboidrato, 16% de lipídeos, 3% de celulose, 5% de vitaminas e minerais, acrescidos de amendoim torrado, chocolate ao leite e bolacha maisena homogeneizado com a ração padrão, resultando em um aumento da glicemia de 100% quando comparados ao grupo controle que ingeriu dieta normocalórica. Da mesma forma, dieta com grande ingesta de carboidratos simples, como açúcares, foi relatada por Vanzela et al. (2009), o qual, acrescentaram biscoito, chocolate, bolo, amendoim e refrigerante, resultando no desenvolvimento de obesidade e de resistência à insulina. Um estudo realizado por Macedo et al. (2012) utilizando 60% de carboidratos, 20% de proteína, 15% de lipídeos e 5% de outros constituintes, dentre eles leite condensado, confirma que o nível de glicose não se altera estatisticamente com dieta hipercalórica sem adição dos alimentos já mencionados.

De outro modo, há relatos de tentativas do aumento de glicemia com uso de dietas hiperlipídicas, como Hamza et al. (2010) e Borba et al. (2011) contendo 26,9% de lipídeos, 18,6% de carboidratos simples, 15,9% de proteína e 2,1% de minerais, dieta rica em proteína e lipídeo e pobre em carboidratos, respectivamente.

Nesse contexto, esse tipo de dieta, utilizada por animais, vem se tornando um modelo de grande interesse para estudos que tratam síndromes metabólicas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta, identificação e processamento do material botânico

#### 4.1.1 Coleta do material vegetal

As folhas de *Tripodanthus acutifolius* foram coletadas manualmente, no município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul - Brasil, tendo como seu hospedeiro *Ligustrum lucidum* (Oleaceae). A espécie já se encontra identificada e depositada no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande Sul (UFRGS), sob o número ICN 167796. O acesso ao patrimônio genético foi informado junto ao Sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (SisGen), sob cadastro nº AAFC1F0.

#### 4.1.2 Preparo do extrato aquoso bruto

Para a coleta foram consideradas apenas folhas íntegras, sem doenças, rasuras ou contaminantes. As folhas de *Tripodanthus acutifolius* foram lavadas em água corrente e secas em uma estufa de ar circulante (Tecnal TE-394/5) a uma temperatura de 40°C por um período de 48 horas. Em seguida foram moídas em moinho de facas tipo Willye (Tecnal TE-680). A preparação do extrato foi realizada através de refluxo, deixando o sistema sob aquecimento por um período mínimo de 3 horas. Após percorrido o tempo de extração, o extrato obtido foi congelado e posteriormente liofilizado (Liofilizador K120 Liobras) e devidamente armazenado (Ultrafreezer) até o momento dos tratamentos. Para a administração aos animais, o extrato seco foi ressuspenso em água deionizada em uma concentração padrão 1g% (20mg/Kg) e 2g% (40mg/Kg).

### 4.2 Aquisição dos modelos animais

Foram adquiridos 26 ratos machos da linhagem Wistar, de peso entre 200-250g, com idade aproximadamente de 60 dias provenientes do Biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O uso de animais com tempo de vida mais avançado foi baseado no estilo de vida social dos animais comparado aos humanos, visto que, a prevalência de DM2 é maior em adultos (MACEDO et al., 2012).

#### 4.2.1 Comissão de ética para o uso de animais (CEUA)

O projeto deste trabalho foi submetido à Comissão de Ética para o uso de animais (CEUA) da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), com a autorização número 26/18, visando atender ao manual “Experimentação animal: ética e legislação brasileira”, o qual visa tratar os animais sem dor, estresse ou sofrimento demasiado (REZENDE et al., 2008). Também, na presente pesquisa, seguiu-se a Lei número 11.794 de 2008 que estabelece procedimentos para o uso científico de animais através do Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal – CONCEA e do CEUA. Além disso, a Pesquisadora realizou curso de capacitação ofertado pelo CEUA intitulado como “Manejo e cuidado com animais de laboratório”.

#### 4.2.2 Biotério/Condições

O estudo foi realizado no Biotério da UNISC, situado no bloco 20 das dependências do campus. Após recebimento dos animais, estes foram acondicionados em gaiolas com cama de maravalha, ração previamente estabelecida, água ad libitum, em ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura constante de 22°C com variação de até 2°C, permaneceram nestas condições por sete dias para adaptação ao meio.

#### 4.2.3 Seleção dos animais

Como modelo experimental optou-se por utilizar ratos Wistar machos, os quais apresentam muitas vantagens, tais como semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com o sistema biológico humano. A seleção dos animais foi realizada de maneira aleatória, alocados nos grupos sem aplicação de critérios (CAVALLI et al., 2012).

#### 4.2.4 Dieta

Foram administradas duas dietas distintas, a normocalórica onde foi utilizada a ração padrão industrial da marca comercial Puro Trato para um grupo de animais (n=2) e a dieta de cafeteria hipercalórica, onde a ração normal foi acrescida de leite condensado e açúcar ofertada para 24 animais.

A ração padrão é constituída de ácido fólico, ácido nicotínico, aditivo antioxidante (BHA e BHT), biotina, calcário calcítico, cloreto de colina, cloreto de sódio (sal comum), farelo de soja (OGM a partir de *Agrobacterium* sp.), farelo de trigo, fosfato bicalcico, iodato de cálcio, lisina, metionina, milho integral moído (OGM a partir de *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces* sp.), pantotenato de cálcio, selenito de sódio, soja integral moída (OGM a partir de

**Agrobacterium sp./tratamento por pressão), sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, trigo integral, vitamina a, vitamina b1, vitamina b12, vitamina b2, vitamina b6, vitamina c, vitamina d3, vitamina e, vitamina k3. E seus níveis de garantia são cálcio (mín) 10 g/kg e (máx) 12 g/kg, extrato Etéreo (mín) 40 g/kg, fósforo (mín) 8.000 mg/kg, fibra bruta (máx) 70 g/kg, matéria mineral (máx) 80 g/kg e proteína bruta (mín) 220 g/kg.**

Para obter a dieta de cafeteria hipercalórica, a mesma foi preparada inicialmente seguindo as orientações de Bernardes (2014) o qual acrescentou amendoim torrado, chocolate ao leite e bolacha maisena. Entretanto, a mesma não apresentou boa consistência e precisou ser alterada durante a execução do estudo. Visto que Vanzela (2010) utilizou carboidratos simples, de fácil acesso, a dieta foi modificada a partir da ração padrão moída na proporção de 33%, acrescida de leite condensado (33%) e açúcar (33%), utilizando água suficiente para umedecer e moldar a ração. Após a mistura, esta foi congelada por 12 horas para formar consistência, após foi cortada em pequenos pedaços e assada em estufa a 180°C por uma hora.

**A dieta foi administrada por 13 semanas, sendo as seis primeiras semanas ofertados somente a dieta de cafeteria como alimento, após a sétima semana foi oferecido também chocolate ao leite, com o intuito de acrescentar carboidrato à dieta exclusivamente para os 24 animais que faziam parte da indução do DM.**

Inicialmente a ingestão líquida foi realizada através do oferecimento de refrigerante cola diluído em água na proporção 70:30 nas três primeiras semanas iniciais. A partir da quarta semana utilizou-se açúcar diluído em água, preparando uma solução 30%, até saturação. Após, utilizou-se o oferecimento ad libitum de refrigerante cola através de equipo de alimentação, totalizando sete semanas. O refrigerante cola apresenta 425 Kcal, 105g de açúcar e 50mg de sódio por litro. Somente a quantidade de água foi mensurada, sendo esta, realizada dia a dia.

#### **4.2.5 Distribuição e tratamento**

Os animais hiperglicêmicos foram distribuídos aleatoriamente para compor 4 grupos de 6 animais, sendo distribuídos 3 animais por caixa, tratados da mesma forma todos receberam a dieta por gavagem no mesmo horário por 15 dias. Os grupos foram:

**GRUPO 1 - NC: controle negativo, tratado com placebo (água destilada);**

**GRUPO 2 - PC: controle positivo, tratado com glibenclamida na dose de 0,071mg/Kg (CAVALLI et al., 2006);**

**GRUPO 3: tratado com extrato aquoso bruto de T. acutifolius na dose de 20mg/Kg;**

**GRUPO 4:** tratado com extrato aquoso bruto de *T. acutifolius* na dose de 40mg/Kg; Dois animais compuseram o grupo não hiperglicêmico (que não recebeu a dieta de cafeteria hipercalórica), para controle da experimentação.

O número mínimo de animais foi definido a partir das recomendações da Organização para Cooperação e Desenvolvimento econômico (OECD, 1997) estipula que os estudos devem incluir pelo menos cinco animais por grupo.



#### 4.2.6 Eutanásia e Destino dos animais

Após o estudo foi realizada a eutanásia dos animais, minimizando o sofrimento, medo, ansiedade e apreensão, de acordo com o Guia Brasileiro de Boas Práticas para eutanásia em animais. O método de escolha baseia-se na inconsciência prévia com tiopental, para após sedação realizar-se a execução por guilhotina.

Conforme determina a RDC nº 306 (ANVISA, 2004) o descarte de resíduos biológicos de fácil putrefação, tais como: carcaças, vísceras e outros devem ser colocados em saco plástico branco leitoso, fechado e mantidos congelados até seu descarte final. Desta forma foram congelados em freezer estabelecido para este fim. Esses resíduos, uma vez congelados, foram descartados em dia e horário específico por empresa terceirizada, onde o tratamento consiste de autoclave (30 minutos, a 150°C) e após, são encaminhados ao Aterro Industrial Classe II.

#### 4.3 Parâmetros analisados

##### 4.3.1 Determinação da glicose sanguínea

No período de indução da DM, a determinação da glicose foi realizada no primeiro dia de alimentação da dieta de cafeteria, e avaliada quinzenalmente, até confirmação do DM por

TTGO (item 4.3.2). No tratamento, a determinação da glicose foi realizada nos dias 1, 7 e 15 após os animais serem considerados diabéticos e iniciar o tratamento com *T. acutifolius*. Para isso, os ratos passaram por um jejum de 6 horas. A análise foi realizada através de uma picada com lanceta estéril na cauda dos animais, coletando uma gota de sangue (cerca de 20 microlitros) em fita para aparelho de glicosímetro portátil. O aparelho informava a glicose do momento. Este método tem como objetivo secundário amenizar dor e sofrimento aos animais, quando comparado à uma coleta sanguínea, simulando a picada no dedo em humanos para avaliação da glicemia com o uso de aparelho glicosímetro portátil.

#### 4.3.2 Teste oral de tolerância a glicose

O teste oral de tolerância a glicose (TTGO) foi realizado na última semana de administração da dieta, e no último dia de tratamento com os extratos de *T. acutifolius* em duas caixas de animais, coletando uma pequena amostra de sangue da cauda dos mesmos (n=6) e realizado o doseamento do tempo zero, após administrou-se uma solução de glicose a 20% via oral na dose de 2g/Kg por gavagem e foi realizada nova coleta no tempo de 30 e 60 minutos (MOURA et al., 2012).

#### 4.3.3 Valores de referência

Não há um valor de referência oficial para os animais em estudo, a partir disso, Santos et al. (2010) comparou os parâmetros bioquímicos de animais saudáveis em cinco estudos antecedentes resultando em uma média glicêmica de 85,00 22,50mg/dL para animais machos, adultos jovens, com peso entre 230-260g em jejum de 12 horas. Nestas mesmas condições, Melo et al. (2012) e Lima et al. (2014) encontraram uma glicemia superior, em animais pesando entre 140-310g, sendo de 104,00 17,18mg/dL e 138,72 30,17mg/dL, respectivamente.

Não há valor de referência oficial para animais diabéticos, sendo assim, autores definem o valor onde encontram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Os autores Mazzanti et al. (2003) e Carvalho et al. (2015) em estudos realizados com ratas Wistar definiram animais diabéticos quando apresentaram glicemia de 180mg/dL e 200mg/dL, respectivamente. Em animais machos Lerco et al. (2003) definiu animais diabéticos com glicemia superior 200mg/dL com animais pesando de 200-300g. A partir destes achados, o objetivo deste estudo foi elevar a glicemia até 150mg/dL para iniciar o tratamento conforme protocolo da Animal Models of Diabetic Complications Consortium (AMDCC, 2003).

#### **4.3.5 Avaliação antropométrica**

A pesagem e o comprimento dos animais foram realizados semanalmente, usando balança semi-analítica para acompanhamento do peso e avanço da obesidade, e fita métrica, para avaliar o comprimento dos animais (CAVALLI et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008). No tratamento os animais foram pesados e medidos uma vez na semana para adequar a dose de administração do extrato. O Índice de massa corporal (IMC) foi determinado pelo peso corporal

(g) dividido pelo seu comprimento ao quadrado (cm) CAVALLI et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008).

#### **4.4 Estatísticas**

Os resultados encontrados e a significância estatística entre os grupos tratados e controle foi avaliada através de gráficos no Microsoft Office Excel 2016, Software ANOVA e GraphPad Prism.



## 5 RESULTADOS

Os resultados e discussões deste trabalho serão apresentados na forma de um artigo científico intitulado como “AVALIAÇÃO in vivo DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DE *Tripodanthus acutifolius* EM RATOS WISTAR HIPERGLICÊMICOS” submetidos ao periódico da Revista Brasileira de Farmacognosia, apresentando fator de impacto de 1,596, cujas orientações para submissão apresentam-se em anexo (Anexo).

## **Artigo: AVALIAÇÃO in vivo DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DE Tripodanthus acutifolius EM RATOS WISTAR HIPERGLICÊMICOS**

Fatima Karina Bolico da Silva<sup>1</sup>, Chana de Medeiros da Silva<sup>2</sup>, Danielly Joani Bullé<sup>2</sup>

**RESUMO:** O diabetes mellitus é caracterizado por uma resistência à insulina, secreção defeituosa, resistência à insulina, ou ambos, o qual é um problema de saúde pública mundial devido ao seu alto índice de morbidade e mortalidade. Além das terapêuticas convencionais disponíveis existem também medicamentos fitoterápicos, para o manejo dos sintomas. No Brasil o uso de plantas medicinais com potencial terapêutico ocorre de forma expressiva, devido à extensa e diversificada flora, desta maneira, há uma quantidade representativa de plantas antidiabéticas sendo utilizadas pela população. A família Loranthaceae, especificamente da espécie *Tripodanthus acutifolius*, a qual já é utilizada popularmente como hipoglicemiante na forma de infusão (chá) de suas folhas. A partir disso, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade hipoglicemiante de *T. acutifolius* (erva-de-passarinho), em ratos Wistar através de uma indução de hiperglicemia com dieta de cafeteria. A administração da dieta se deu em 24 animais, preparada a partir de uma dieta padrão acrescida de carboidratos simples, além de refrigerante. A análise quantitativa do consumo de alimentos e de água foi realizada diariamente e as análises de peso e glicose foram realizadas semanalmente. Para o tratamento, os animais foram divididos em 4 grupos, o controle negativo (placebo), o controle positivo com hipoglicemiante, e duas concentrações (20 e 40mg/Kg) de extrato, administradas por gavagem diariamente por 15 dias. Os animais hiperglicêmicos apresentaram ganho de peso e IMC significativo quando comparados ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ), em contraponto a glicemia esperada não foi atingida. Em conclusão podemos discutir que a dieta de cafeteria desenvolvida não é um modelo de escolha para indução de hiperglicemia, por ser usado em um tempo incorreto ou em concentrações não apropriadas. Sendo assim, não foi possível encontrar diferenças significativas na ação hipoglicemiante do extrato estudado, pois o curto tempo não se mostrou eficaz, mesmo a planta, a qual já é utilizada com esta ação em uso popular.

**Palavras-chaves:** Diabetes, Dieta de Cafeteria, hipoglicemiante, *Tripodanthus acutifolius*

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC <sup>2</sup>

**ABSTRACT:** The diabetes mellitus is characterized by insulin resistance, defective secretion, insulin resistance, or both, which is a worldwide public health problem due to its high morbidity and mortality rate. In addition to the conventional therapeutics available there are also herbal medicines for the management of symptoms. In Brazil the use of medicinal plants with therapeutic potential occurs in an expressive way, due to the extensive and diversified flora, in this way, there is a representative amount of antidiabetogenic plants being used by the population. The family Loranthaceae, specifically of the species *Tripodanthus acutifolius*, which is already popularly used as hypoglycemic in the form of infusion (tea) of its leaves. From this, the objective of this work is to evaluate the hypoglycemic activity of *T. acutifolius* (birdgrass) in Wistar rats through an induction of hyperglycemia with a cafeteria diet. The diet was administered in 24 animals, prepared from a standard diet plus simple carbohydrates, in addition to soda. Quantitative analysis of food and water intake was performed daily and weight and glucose analyzes were performed weekly. For the treatment, the animals were divided into 4 groups, the negative control (placebo), the positive control with hypoglycemic, and two concentrations (20 and 40mg / kg) of extract, administered by gavage daily for 15 days. The hyperglycemic animals showed significant weight gain and BMI when compared to the control group ( $p \leq 0.05$ ), whereas the expected glycemia was not reached. In conclusion we can argue that the developed cafeteria diet is not a model of choice for the induction of hyperglycemia, because it is used in an incorrect time or in inappropriate concentrations. Therefore, it was not possible to find significant differences in the hypoglycemic action of the extract studied, because the short time was not effective, even the plant, which is already used with this action in popular use.

**Key-words:** Diabetes, Cafeteria diet, hypoglycemic, *Tripodanthus acutifolius*

## INTRODUÇÃO

A insulina é um hormônio necessário para converter açúcar, amido e outros alimentos em energia necessária para a vida diária; a deficiência na produção ou na utilização deste hormônio caracteriza a Diabetes mellitus (DM). As causas desta patologia variam, podendo ser genéticas ou associados a fatores ambientais, como sedentarismo e obesidade (BARBOSA-FILHO et al., 2005).

O DM é um problema de saúde pública mundial devido ao seu alto índice de morbidade e mortalidade (CAVALLI et al., 2006). Em 2015, 5 milhões de pessoas com idade entre 20 e 79 anos morreram com diabetes, ocorrendo um óbito a cada seis segundos. Estima-se que cerca de 8,8% da população mundial é acometida por esta patologia. O Brasil está no ranking entre os cinco países com maior número de habitantes diabéticos, com projeção para ter mais de 23 milhões de pessoas acometidas em 2040... Além disso, o país está em 3º lugar entre os países com maior número de DM1 em crianças abaixo de 14 anos, totalizando 30.900 casos. O aumento desta prevalência pode estar associado a diversos fatores como, a rápida urbanização, desequilíbrio nutricional, excesso de peso, sedentarismo, transição nutricional e crescimento e envelhecimento da população (BRASIL, 2017).

O DM está associado a diversas complicações, como doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, cegueira, insuficiência renal, amputações de membros, dentre outras, o que acaba contribuindo para o aumento das taxas de hospitalizações e consequentemente desencadeando uma maior utilização dos serviços de saúde, principalmente o paciente diabético não tratado ou não controlado. Morbidades de grande impacto estão associadas ao DM, como hipertensão arterial, tuberculose, HIV e obesidade (BRASIL, 2017).

Como esta patologia não tem cura é necessário um manejo correto para controle da mesma, que se resume em manter o nível de açúcar no sangue o mais normal possível, o que geralmente é realizado através de exercícios físicos aliados a dieta e uso de medicação. Além das opções terapêuticas convencionais disponíveis existem também medicamentos fitoterápicos, os quais já são usados há muito tempo, visto que, muitas plantas possuem propriedades hipoglicêmicas além de outros efeitos benéficos para a saúde (NASRI et al., 2015).

O mecanismo de ação das plantas hipoglicêmicas está atribuído ao aumento da liberação de insulina através da estimulação das células beta-pancreáticas, ao aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina, a resistência aos hormônios, a diminuição da perda de glicogênio, a eliminação dos radicais livres e ao aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos (VOLPATO et al., 2002; HOU et al., 2003). Os principais constituintes naturais que

apresentam esta atividade hipoglicemiante são carboidratos, alcaloides, glicopeptídeos, terpenóides, flavonoides e cumarinas (NEGRI, 2005 apud TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

No Brasil o uso de plantas medicinais com potencial terapêutico ocorre de forma expressiva, devido à extensa e diversificada flora, desta maneira, há uma quantidade representativa de plantas antidiabéticas sendo utilizadas pela população (ALVARENGA et al., 2017). Um estudo realizado por Trojan-Rodrigues et al (2012) encontrou 42 famílias botânicas utilizadas no Rio Grande do Sul para DM, dentre estas, a família da Loranthaceae, e mais especificamente a espécie *Tripodanthus acutifolius*.

Vários estudos realizados por diferentes autores já confirmaram as propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, diurética, hipocolesterolêmica e suposta atividade hipoglicemiante do gênero. A espécie *Tripodanthus acutifolius* foi relatada por Soberón e colaboradores (2010), Trojan-Rodrigues e colaboradores (2012) e por Coelho e colaboradores (2017) como hipoglicemiante, sendo administrada na forma de infusão (chá) de suas folhas em uso popular. Além da espécie *T. acutifolius*, outras espécies da mesma família Loranthaceae também são utilizadas popularmente como hipoglicemiantes. Portanto pouco se sabe sobre a comprovação desta ação hipoglicemiante, bem como os mecanismos envolvidos nesta atividade.

Frente a esta realidade torna-se imprescindível a procura de novas alternativas para o tratamento, desta forma, busca-se encontrar plantas com potencial hipoglicemiante que possam atuar na terapêutica da patologia, assim como, investigar a ação hipoglicemiante, buscando encontrar uma droga com grande potencial para se tornar um fármaco hipoglicemiante fitoterápico.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e preparação do Extrato aquoso

As folhas de *Tripodanthus acutifolius* foram coletadas em Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul – Brasil, tendo como hospedeiro o *Ligustrum lucidum* (Oleaceae). Uma amostra foi depositada no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande Sul (UFRGS), sob o número ICN 167796. E o acesso ao patrimônio genético foi informado junto ao Sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (SisGen), sob cadastro nº A AFC1F0. Para a preparação do extrato as folhas foram lavadas em água corrente e secas em uma estufa de ar circulante (Tecnal TE-394/5) a uma temperatura de

40°C por um período de 48 horas. Em seguida foram moídas em moinho de facas tipo Willye (Tecnal TE-680). A preparação do extrato foi realizado através de refluxo, deixando o sistema sob aquecimento por um período mínimo de 3 horas. Após percorrido o tempo de extração, o extrato obtido foi congelado e posteriormente liofilizado (Liofilizador K120 Liobras) e devidamente armazenado (Ultrafreezer) até o momento dos tratamentos. Para a administração aos animais, o extrato seco foi ressuspensionado em água deionizada em uma concentração padrão 1g% (20mg/Kg) e 2g% (40mg/Kg).

## 2.2 Aquisição dos animais

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), com a autorização número 26/18 visando atender ao manual “Experimentação animal: ética e legislação brasileira”, e também a Lei número 11.794 de 2008 que estabelece procedimentos para o uso científico de animais através do Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal – CONCEA e do CEUA.

Os 26 animais foram adquiridos do Biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), todos ratos machos da linhagem Wistar, de peso entre 200- 250g, com idade aproximadamente de 60 dias. O uso de animais com tempo de vida mais avançado foi baseado no estilo de vida social dos animais comparado aos humanos, visto que, a prevalência de DM2 é maior em adultos (MACEDO et al., 2012). Após recebimento dos animais, estes foram acondicionados em gaiolas com cama de maravalha (substituída duas vezes na semana), ração previamente estabelecida, água ad libitum, em ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura constante de 22°C com variação de até 2°C.

Como modelo experimental optou-se por utilizar ratos Wistar, os quais apresentam muitas vantagens, tais como semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com o sistema biológico humano. A seleção dos animais foi realizada de maneira aleatória, alocados nos grupos sem aplicação de critérios (CAVALLI et al., 2012).

Os animais hiperglicêmicos foram distribuídos aleatoriamente para compor cada grupo, formando 6 animais, sendo distribuídos 3 animais por caixa, tratados da mesma forma todos receberam as substâncias por gavagem no mesmo horário, por 15 dias, os grupos são:

- GRUPO 1 - NC: controle negativo, tratado com placebo (água destilada);
- GRUPO 2 - PC: controle positivo, tratado com glibenclamida na dose de 0,071mg/Kg (CAVALLI et al., 2006);
- GRUPO 3: tratado com extrato aquoso bruto de *T. acutifolius* na dose de 20mg/Kg;
- GRUPO 4: tratado com extrato aquoso bruto de *T. acutifolius* na dose de 40mg/Kg;

Dois animais compuseram o grupo não hiperglicêmico (que não recebeu a dieta de cafeteria hipercalórica), para controle da experimentação.

O número mínimo de animais foi definido a partir das recomendações da Organização para Cooperação e Desenvolvimento econômico (OECD, 1997) estipula que os estudos devem incluir pelo menos cinco animais por grupo.

### 2.3 Dieta

Foram administradas duas dietas distintas, a normocalórica, na qual foi utilizada a ração padrão industrial da marca comercial Puro Trato para um grupo de animais (n=2) e a dieta de cafeteria hipercalórica, a qual é acrescida de leite condensado e açúcar ofertada para 24 animais. Visto que Vanzela (2010) utilizou carboidratos simples, de fácil acesso, a dieta teste foi preparada a partir da ração padrão moída na proporção de 33%, acrescida de leite condensado (33%) e açúcar (33%), utilizando água suficiente para molhar a ração. Após a mistura, esta foi congelada por 12 horas para formar consistência, após foi cortada em pequenos pedaços e assada em estufa a 180°C por uma hora.

A dieta foi administrada por 13 semanas, sendo as seis primeiras semanas ofertadas somente a dieta de cafeteria como alimento, após a sétima semana foi oferecido também chocolate ao leite, com o intuito de acrescentar carboidrato a dieta exclusivamente para os 24 animais que faziam parte da indução do DM.

Inicialmente a ingestão líquida foi realizada através do oferecimento de refrigerante cola diluído em água na proporção 70:30 nas três primeiras semanas iniciais. A partir da quarta semana utilizou-se açúcar diluído em água, preparando uma solução 30%, até saturação. Após, utilizou-se o oferecimento ad libitum de refrigerante cola através de equipo de alimentação, totalizando sete semanas. O refrigerante cola apresenta 425 Kcal, 105g de açúcar e 50mg de sódio por litro. Somente a quantidade de água foi mensurada, sendo esta, realizada dia a dia.

### 2.4 Parâmetros

A avaliação da glicose se deu semanalmente durante todas as 14 semanas do experimento. Para realizar a análise, os animais passaram por um pequeno jejum de 6 horas. A análise foi realizada através de uma picada com lanceta estéril na cauda dos animais, coletando uma gota de sangue (cerca de 20 microlitros) em fita para aparelho de glicosímetro portátil (Accu-Chek).

O teste de TTGO foi realizado na última semana de administração da dieta, e no último dia de tratamento com os extratos de *T. acutifolius* em duas caixas, coletando uma pequena

amostra de sangue da cauda dos animais (n=6) e realizado o doseamento do tempo O, após administrou-se uma solução de glicose a 20% via oral na dose de 2g/Kg por gavagem e foi realizadas nova coleta no tempo de 0, 30, 60, 90 minutos (MOURA et al., 2012), analisou-se em menor tempo visto que o teste implica em grande estresse aos animais.

A pesagem e o comprimento dos animais foram realizados semanalmente, usando balança semi-analítica, para acompanhamento do peso e avanço da obesidade através de fita métrica para avaliar o comprimento dos animais e posterior cálculo do índice de massa corporal ( $IMC = \text{peso corporal} / \text{comprimento}^2$ ) (CAVALLI et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008).

## 2.5 Eutanásia

Após o estudo foi realizada a eutanásia dos animais, minimizando o sofrimento, medo, ansiedade e apreensão, seguindo o protocolo está de acordo com o Guia Brasileiro de Boas Práticas para eutanásia em animais. O método de escolha baseia-se na inconsciência prévia antes de anteceder o método de guilhotina. Conforme determina a RDC nº 306 (ANVISA, 2004) o descarte de resíduos biológicos de fácil putrefação, estes, são congelados e passarão por tratamento por autoclave, durante 30 minutos, a 150°C e após, serão encaminhados ao Aterro Industrial Classe II.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Obtenção e rendimento do extrato aquoso de *Tripodanthus acutifolius*

Após liofilização do extrato aquoso bruto, este resultou em 3g de peso de extrato seco, totalizando um rendimento de 15%.

### 3.2 Consumo da dieta de cafeteria para indução da hiperglicemia

Primeiramente, preparou-se uma ração baseado no estudo realizado por Bernardes et al., (2014) composto por 14% proteínas 52% carboidratos, 20% lipídeos, 1,2% celulose, 1,5% vitaminas e minerais, totalizando 456,30 Kcal/100g, utilizando uma mistura de ração padrão (30g), amendoim torrado (20g), chocolate ao leite (20g), bolacha maisena (10g) e leite condensado (20g). Porém, a consistência da ração não ficou da maneira esperada, apresentando-se úmida. Após as seis semanas de teste com a ração hipercalórica, esta, foi substituída por uma nova fórmula, utilizando apenas açúcar (sacarose) 33% e leite condensado 33%, adicionados à ração padrão 33%, dieta baseada nos estudos de Vanzela (2010), as quais com as concentrações estão apresentadas na tabela 1.



	Ração	Leite Condensado (100mL)	Açúcar refinado (100g)	Chocolate ao leite (100g)	Refrigerante cola (100mL)	Total
Carboidratos	-	55g	100g	68g	10,50g	233,5g
Extrato etéreo	4g	-	-	-	-	4g
Fibra Bruta	7g	-	-	-	-	7g
Matéria Mineral	8g	-	-	-	-	8g
Proteína Bruta	22g	7,50g	-	2g	-	31,50g
Gorduras	-	13g	-	54g	-	67g
Sódio	-	1,30g	-	3,04g	0,05g	4,39g
Álcio	10g	2,90g	-	-	-	12,90g
Fósforo	0,80g	-	-	-	-	0,80g

Tabela 1: Concentrações de ingredientes em cada alimento utilizado

Assim, a partir do consumo das dietas oferecidas aos animais, observa-se um aumento do consumo de ração, quando a mesma foi acrescida dos ingredientes da dieta de cafeteria (comparado ao grupo não-diabético) e que os animais apresentaram preferência à ração hipercalórica do que ao chocolate (Figura1) ao longo das semanas, destacando diferenças significativas entre o consumo de chocolate e ração, (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Através da análise de dados de regressão linear obteve-se os seguintes valores de R, para os animais não diabéticos de 0,9305, controle negativo 0,9478, controle positivo 0,9595, extrato na menor dose 0,9702, extrato na maior dose 0,9005, todos, no entanto apresentaram valor próximo a 1.

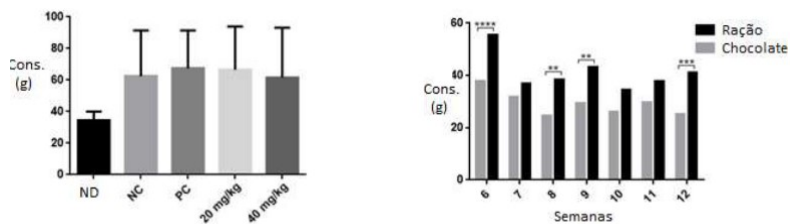


Figura 1: Médias e seus respectivos desvio padrão do consumo de ração; e comparação do consumo de ração e chocolate semanal (ANOVA, duas vias, Bonferroni's teste: \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ )

A mensuração do consumo de água foi realizada diariamente durante todo o experimento. Para análise dos dados, esta medida foi analisada em dois momentos: o consumo de água desde o início até o final do experimento; e antes e após a inserção do refrigerante na dieta, demonstrando resultados significativos apenas no grupo controle negativo (\*\*  $p \leq 0,01$ ) (Figura 2).

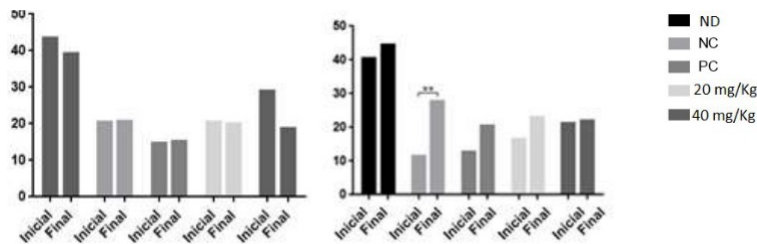


Figura 2: Médias iniciais e finais do consumo de água; e antes e após a inserção do refrigerante na dieta

\*\*  $p \leq 0,01$  (ANOVA, duas vias, Bonferroni's teste).

No presente estudo, observa-se que houve um aumento do consumo de água, quando os animais começaram a receber refrigerante, mostrando a preferência pela bebida calórica.

O autor Reuter (2007) levanta uma observação importante que é possível que cada animal escolha uma seleção individual de componentes que variam na seleção da dieta oferecida, comprometendo assim o controle na ingestão, podemos confirmar com os dados encontrados neste estudo, demonstrados no gráfico abaixo, onde pode-se perceber a diminuição no consumo de ração hipercalórica ao longo das semanas.

De acordo com Beuttner (2006) as gorduras saturadas e monoinsaturadas quando comparadas as gorduras poli-insaturadas são capazes de promover de forma mais pronunciada à obesidade e resistência à insulina. As gorduras poli-insaturadas possuem a capacidade de gerar aumento da lipogênese e depósito de microvesículas de gordura no fígado.

A composição de nutrientes não pode ser controlada e a mensuração de energia são difíceis de alcançar, além das dietas apresentarem uma variedade de alimentos ricos em gordura e açúcar e pobres em proteínas, vitaminas e minerais (REUTER, 2007).

### 3.3 Avaliação do peso corporal e IMC

Na primeira semana do estudo, foi possível observar um aumento de peso dos animais apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no aumento de peso quando comprados os

animais do grupo não diabético com controle positivo e nas duas doses de extrato testados, assim como o controle negativo quando comparados com os extratos e o controle positivo. O controle positivo só apresentou diferenças significativas quando comprado ao extrato na maior concentração. Por outro lado, não houve diferenças significativas quando comparados o controle negativo com os animais não diabéticos, o controle positivo com o extrato na menor dose, e comparação entre as doses de extrato. Já na sétima e décima quarta semanas de indução da hiperglicemia não apresentou ganho de peso significativo em nenhum grupo testado. Todos os animais apresentaram diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ) quando comparados o seu peso corpóreo no início e ao final do experimento (Tabela 2).

GRUPOS		Peso Corpóreo		IMC	
		Média (g)	Desvio Padrão	Média (g)	Desvio Padrão
Controle Negativo	Inicial	296,833	4,622	0,625	0,050
	Final	551,000	50,675 <sup>****</sup>	0,989	0,115 <sup>****</sup>
Controle Positivo	Inicial	314,833	1,472	0,674	0,033
	Final	553,667	28,395 <sup>****</sup>	0,990	0,071 <sup>****</sup>
Extrato dose de 20mg/Kg	Inicial	326,500	4,037	0,718	0,030
	Final	578,333	49,633 <sup>****</sup>	0,992	0,073 <sup>****</sup>
Extrato dose de 40mg/Kg	Inicial	332,303	15,303	0,690	0,060
	Final	535,667	35,178 <sup>****</sup>	0,999	0,060 <sup>****</sup>
Não Diabéticos	Inicial	284,500	0,700	0,617	0,039
	Final	518,500	3,536 <sup>****</sup>	0,906	0,112 <sup>***</sup>

Tabela 2: Valores iniciais e finais do peso corpóreo e IMC dos animais

\*\*\*  $p \leq 0,001$  (ANOVA, duas vias, Bonferroni's teste)

\*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  (ANOVA, duas vias, Bonferroni's teste)

### 3.4 Avaliação da glicemia e TTGO

A evolução da glicemia ao longo das semanas (Figura 3) demonstrou uma grande variação, não evoluindo como o esperado.

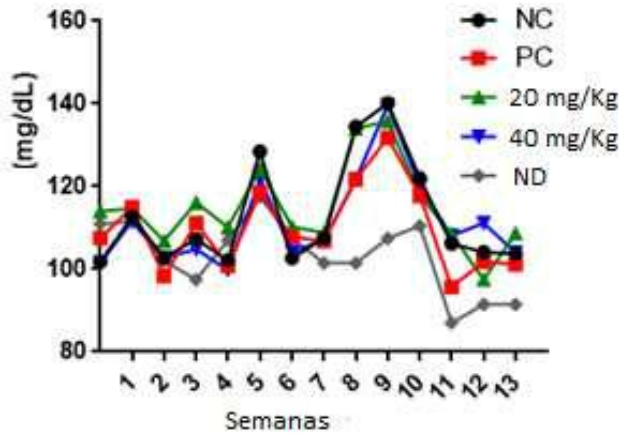


Figura 3: Evolução da Glicemia  
ANOVA – GraphPad Prism

A dieta inicial testada não conseguiu um aumento de glicemia esperado, a partir deste pressuposto optou-se por substituir esta dieta por outra rica em carboidratos simples (semana 7), como já mencionado. Após a inserção da segunda dieta os animais apresentam um pico metabólico extenso quando comparados a média de glicemia que apresentavam, mas mesmo assim, não mantiveram a glicemia superior a 150 mg/dL. Após aproximadamente duas semanas de administração, a glicemia começou a diminuir, motivo ainda desconhecido. Desta maneira, não foi possível verificar se o extrato apresenta ou não ação hipoglicêmica.

O estudo tinha como intenção realizar o TTGO em todos os animais, mas após realizar-se o teste em duas caixas avaliou-se um grande aumento no nível de estresse dos animais, pois estes apresentavam-se em jejum, o que já é uma variável difícil para os mesmos. O teste foi realizado em uma caixa de cada grupo teste (Tabela 3), não sendo possível assim comparar com o grupo controle como o esperado.

		Teste Oral de Tolerância a Glicose (TTGO)					
		Tempo (min)					
		0 min		30 min		60 min	
Grupo	Tempo	Méd	Desv	Méd	Desv	Méd	Desv
Extrato dose 20mg/Kg	Inicial	144,000	52,830	154,000	20,224	138,333	15,742
	Final	109,000	11,533	136,333	14,503	134,000	5,568
Extrato dose 40mg/Kg	Inicial	96,333	2,082	184,667	28,148	150,667	32,960
	Final	101,667	7,371	133,333	2,082*	130,333	7,024

Tabela 3: Valores do TTGO em dois grupos, sendo Méd (média) e Desv (Desvio padrão)  
\*p<0,05 (ANOVA, duas vias, Bonferroni's teste)

O autor Moraes et al (2008) conseguiu uma elevação na glicemia, aumento no peso corporal e resistência à insulina com uma dieta semelhante em 8 semanas de experimento. Com resultados semelhantes a este estudo Naderalli et al (2001) em uma tentativa de induzir hiperglicemia em ratos machos por um período de 16 semanas também não encontrou diferenças significativas.

Em 2003 Chicco identificou a hiperglicemia com indução de dieta hipercalórica com excesso de sacarose em estágios, denominados precoce (3 a 5 semanas) e tardios (15 a 30 semanas), sendo no período tardio que obteve a hiperglicemia esperada, alcançando a dislipidemia.

Para os animais que consomem menos alimentos sólidos e aumentam sua ingestão hídrica, pressupõem-se que este acúmulo hídrico é absorvido principalmente no intestino delgado, de modo que poderia inalterar o perfil de ingestão de nutrientes (SINGH et al., 2016). Além disso, a microbiota intestinal é um fator crucial no aparecimento do diabetes (EVERARD; CANI, 2013), o que se pode suspeitar que estes animais analisados apresentaram resistência ao desenvolvimento de hiperglicemia.

Franke et al (2017) em uma tentativa de induzir a hiperglicemia em ratos wistar com sacarose também não encontrou resultados satisfatórios e significativos, mas ressalta que a sacarose está diretamente ligada ao DM2 em humanos e apresenta influências no desenvolvimento de algumas doenças cardiometabólicas (SONESTEDT et al., 2012). Do mesmo modo, Singh et al. (2016) concluiu que administrar uma dieta rica em sacarose por 15

semanas não foi suficiente para desenvolver resistência à insulina, hiperglicemia ou obesidade, embora autores descreveram sucesso na tentativa.

Estudos sugerem que os tecidos adiposos são capazes de produzir e liberarem uma série de proteínas conhecidas como adipocitocinas, as quais, desempenham um papel muito importante na prevenção da resistência a insulina. A leptina e a adiponectina mostraram prevenir a resistência à insulina de fato (GHAFOORUNISSA et al., 2005).

O mecanismo pelo qual a sacarose induz a resistência à insulina do músculo esquelético ainda não está totalmente esclarecido, sugere-se que o excesso de oferta, seja ela local ou sistêmica de lipídeos pode desenvolver a insensibilidade à insulina neste tecido (CHICCO et al., 2003).

### 3.4 Peso dos órgãos

Após eutanásia dos animais, os órgãos baço, fígado e rim dos mesmos foram pesados e comparados, apresentando diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) apenas no fígado do controle negativo quando comparado aos animais não diabéticos (Figura 4).

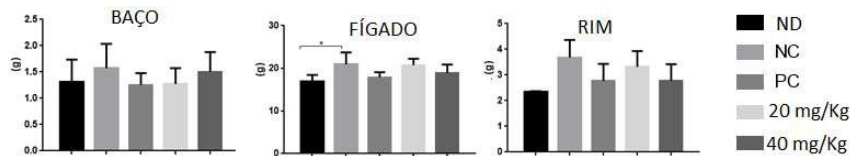


Figura 4: Variação do peso dos órgãos baço, fígado e rim dos animais após eutanásia. \* $p < 0,05$  (ANOVA, duas vias, Bonferroni's teste).

No presente estudo foi observada maior intensidade de esteatose hepática no grupo experimental, além de grande acúmulo de gordura peritoneal. Já foi demonstrado que dietas alimentares produzem efeitos que atuam na bioquímica corporal e acúmulo de reservas, modificando morfologicamente vários órgãos (BORBA et al., 2011).

Beuttner (2006) já explicava que a dieta hiperlipídica/hipercalórica pode induzir esteatose hepática e sinais de resistência à insulina hepática nos animais, como também observado em humanos obesos, apesar de não demonstrar diferenças significativas. Sugere-se ainda que o mecanismo pelo qual a dieta induz a deposição de gordura em ratos poderia ser a ativação de ciclos inflamatórios hepáticos.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após desenvolvimento do trabalho, foi possível concluir que os animais não atingiram um estado de hiperglicemia ( $> 150\text{mg} / \text{dL}$  de glicose, de acordo com o AMDCC 2003) desejável para induzir o Diabetes mellitus, possivelmente porque não utilizou-se drogas para esta indução (por exemplo, a estreptozotocina ou aloxano). E sim uma dieta palatável e de fácil acesso para simular uma dieta de cafeteria utilizada por humanos, rica em carboidratos simples, gordura e também refrigerante. Em conclusão podemos discutir que a dieta de cafeteria desenvolvida não é um modelo de escolha para indução de hiperglicemia, por ser usado em um tempo incorreto ou em concentrações não apropriadas. Sendo assim, não foi possível encontrar diferenças significativas na ação hipoglicemiante do extrato aquoso estudado, pois o curto tempo não se mostrou eficaz, para comprovar suas propriedades farmacológicas, a qual já é utilizada com esta finalidade em uso popular.

A alimentação com dieta hiperlipídica está associada ao desenvolvimento de obesidade central, resistência à insulina, alta concentração plasmática de insulina no plasma e esteatose hepática não alcoólica. Causando a longo prazo, um alto número de ácidos graxos livres circulantes que prejudica as células beta-pancreáticas através do mecanismo de lipotoxicidade, além de aumentar a produção hepática de glicose e uma piora de hiperglicemia. Esta consideração pode explicar o fato de a hiperglicemia ser prejudicada com uma dieta de cafeteria hipercalórica ou hiperlipídica.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, C. F. et al. Uso de plantas medicinais para o tratamento do Diabetes mellitus no Vale do Paraíba – SP. *Rev. Eletrônica funvic*, 2017.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 306 de 7 de Setembro de 2004.
- BARBOSA-FILHO, J.M. et al. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. p.392–413, 2005.
- BUETTNER, R. et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effect of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology*, p. 485-501, 2006.
- BORBA, A. J. et al. Dieta hiperlipídico-proteica utilizada para emagrecimento induz obesidade em ratos. *Rev. de Nutrição*, p. 519-528, Campinas, 2011.
- BRASIL, Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretriz Brasileira de Diabetes, Cáp. 1 Princípios básicos: avaliação, diagnóstico e metas de tratamento do diabetes mellitus, 2017/2018.
- CAVALLI, V. L. L. O. et al. Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill) Bernh. *Rev. Brasileira de Farmacognosia*, p. 64-70, 2007.
- CHICCO, A. et al., Muscle Lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *Rev. American Society for Nutritional Sciences*, 2003.
- COELHO, R. P. et al. Protective effect of the hydroalcoholic extract of *Tripodanthus acutifolius* in hypercholesterolemic Wistar rats. *Rev. Biomedicine & Pharmacotherapy*, p. 300-309, 2018.
- EVERARD, A; CANI, P. D. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Practice & research clinical Gastroenterology*, 2013.
- FRANKE, S. I. R. et al., High consumption of sucrose induces DNA damage in male Wistar rats. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 2017.
- GHAFOORUNISSA, A. I. et al., Dietary (n-3) long chain polyunsaturated fatty acids prevent sucrose induced insulin resistance in rats. *Rev. American Society for Nutrition, Nutrient interactions and toxicity*, 2005.
- GRUNDY, S. M. Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Journal of the American College of Cardiology*, v.59, 2012.
- HOU, C. et al. Antidiabetic dimeric guianolides and a ligand glycoside from *Lactuca indica*. *Journal natural products*, p.625-629, 2003.
- MACEDO, I. C. et al. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Rev. Peptides*, p. 189-196, 2012.



MORAES, C. de. et al. Exercise training improves relaxation and SOD-I expression. In aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiology*, research article, 2008.

MOURA, L. P. de. et al. Insulina pancreática de ratos diabéticos tipo 1 submetidos a um protocolo de treinamento físico individualizado. *Rev. Motricidade*, v. 8, n. 1, p. 23-32, 2012.

NADERALI, E. K. et al., Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. *Rev. Clinical Science*, 2001.

NASRI, H.; SHIRZARD, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Antioxidant plants and diabetes mellitus. *Journal of research in medical sciences*, v.20, 2015.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, P. 121–141, 2005.

OECD, *Guideline for the Testing of Chemicals: Mammalian erythrocyte micronucleus test*, 1997.

REUTER, Tanja T. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes. *Drugs Discovery today: Disease models*, v.4, n.1, 2007.

SING, S. et al., Expression of cardiac insulin signalling genes and proteins in rats fed a high-sucrose diet: effect of bilberry anthocyanin extract. *Genes & Nutrition*, 2016.

SOBERÓN, J. R. et al. Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 329-333, 2010.

SONESTEDT, E. et al., Does high sugar consumption exacerbate cardiometabolic risk factors and increase the risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease? *Review article, Food & Nutrition*, 2012.

TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T. L. S.; SOARES, G. L. G.; RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 155-163, 2012.

ULLA, A. et al., Supplementation of *Syzygium cumini* seed powder prevented obesity, glucose intolerance, hyperlipidemia and oxidative stress in high carbohydrate high fat diet induced obese rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 2017.

VANZELA, E. C. et al. Pregnancy restores insulin secretion from pancreatic islets in cafeteria diet-induced obese rats. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2009.

VOLPATO, G. T. et al. Revisão de plantas brasileiras em comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. *Rev. Brasileira de Plantas medicinais*, v.4, p.35-45, 2002.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo do trabalho não foi atingido, pois os animais não atingiram um estado de hiperglicemia ( $> 150\text{mg} / \text{dL}$  de glicose, de acordo com o AMDCC 2003) durante o período do estudo, possivelmente porque não usamos drogas para induzir diabetes (por exemplo, a estreptozotocina ou aloxano). E sim uma dieta palatável e de fácil acesso para simular uma dieta de cafeteria utilizada por humanos, rica em carboidratos simples, gordura e também refrigerante. Em conclusão podemos discutir que a dieta de cafeteria desenvolvida não é um modelo de escolha para indução de hiperglicemia, por ser usado em um tempo incorreto ou em concentrações não apropriadas. Sendo assim, não foi possível encontrar diferenças significativas na ação hipoglicemiante do extrato estudado, pois o curto tempo não se mostrou eficaz, mesmo a planta, a qual já é utilizada com esta ação em uso popular.

A alimentação com dieta hiperlipídica está associada ao desenvolvimento de obesidade central, resistência à insulina, alta concentração plasmática de insulina no plasma e esteatose hepática não alcoólica. Causando a longo prazo, um alto número de ácidos graxos livres circulantes que prejudica as células beta-pancreáticas através do mecanismo de lipotoxicidade, além de aumentar a produção hepática de glicose e uma piora de hiperglicemia. Esta consideração pode explicar o fato de a hiperglicemia ser prejudicada com uma dieta de cafeteria hipercalórica ou hiperlipídica.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. N. et al. A resposta do peso e da composição corporal à inclusão da dieta de cafeteria e treinamento físico aeróbico em diferentes fases do desenvolvimento. *Rev. Ciência, Cuidado e Saúde*, 2008.
- ALVARENGA, C. F. et al. Uso de plantas medicinais para o tratamento do Diabetes mellitus no Vale do Paraíba – SP. *Rev. Eletrônica funvic*, 2017.
- AMDCC. Animal Models of Diabetic Complications Consortium. Validation of models of cardiovascular disease in Diabete, 2003.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 306 de 7 de Setembro de 2004.
- BARBOSA-FILHO, J.M. et al. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. p.392–413, 2005.
- BERNARDES, D. et al. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. *Rev. Brasileira de Educação Física*, São Paulo, v.18, n. 2, p. 191-200, 2004.
- BORBA, A. J. et al. Dieta hiperlipídico-proteica utilizada para emagrecimento induz obesidade em ratos. *Rev. de Nutrição*, p. 519-528, Campinas, 2011.
- BORGES, K.N. et al. Diabetes – utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. *Revista Eletrônica da Faculdade de Farmácia*, p.12–20, 2008.
- BRASIL, Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretriz Brasileira de Diabetes, Cáp. 1 Princípios básicos: avaliação, diagnóstico e metas de tratamento do diabetes mellitus, 2017/2018.
- BRASIL, Sociedade Brasileira de Diabetes. Posicionamento Oficial SBD nº 02/2018, Conduta Terapêutica no Diabetes Tipo 2: Algoritmo SBD 2018/2019.
- CARVALHO, C. et al. Perfil glicêmico de ratas diabéticas induzidas por alozono tratadas com *Momordica charantia* L. *Revista Ciência e Saúde*, 2016.
- CAVALLI, V. L. L. O. et al. Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctiumminus* (Hill) Bernh. *Rev. Brasileira de Farmacognosia*, p. 64-70, 2007.
- CAZZETA, E; GALETTI, M. Frugivoria e especificidade por hospedeiros na erva-de-passarinho *Phoradendron rubrun* (L.) Griseb. (Viscaceae). *Rev. Brasileira de Botânica*, v.30, n.2, p.345-351, 2007.

COELHO, R. P. et al. Protective effect of the hydroalcoholic extract of *Tripodanthus acutifolius* in hypercholesterolemic Wistar rats. *Rev. Biomedicine & Pharmacotherapy*, p. 300-309, 2018.

CONCEIÇÃO, G. M. et al. Erva-de-Passarinho: Substratos vegetais, uso e aplicações na medicina popular, Caxias, Maranhão. *Rev. Scientia Plena*, v.6, n.6, 2010.

DAUD, A. et al. Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic effects of extracts of *Phrygilanthus acutifolius* flowers. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 108. P. 198-203, 2006.

DANTAS, J. A. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Rev. Acta Sci. Health Sci. Maringá*, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DETTKE, G. A.; WAECHTER, J. L. Estudo taxonômico das ervas-de-passarinho da Região Sul do Brasil: I. Loranthaceae e Santalaceae. *Rev. Rodriguésia*, p. 939-953, 2014.

FRODE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 173-183, 2008.

GHANBARI, A. et al. Tribulus terrestris hydroalcoholic extract administration effects on reproductive parameters and serum level of glucose in diabetic male rats. *Rev. Int. J. Morphol. Pág.* 796-803, 2016.

Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais: conceitos e procedimentos recomendados. Conselho Federal de Medicina Veterinária, Brasília, 2012.

HAMZA, N. et al. Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 513-518, 2010.

HOU, C. et al. Antidiabetic dimeric guianolides and a ligand glycoside from *Lactuca indica*. *Journal natural products*, p.625-629, 2003.

IDF, International Diabetes Federation. IDF Atlas. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015. In: Diretriz Brasileira de Diabetes, Capítulo 1: Princípios básicos: avaliação, diagnóstico e metas de tratamento do diabetes mellitus, 2017/2018.

INTERSIMONE, N. H.; THOENE, A. D.; RIERA, A. S. Efecto diurético de extractos acuosos y alcohólicos de flores de *Phrygilanthus acutifolius* (corpo) en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 10, n. 3-4, 2005.

KHARROUBI, A.T.; DARWISH, H. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World journal of Diabetes*, v.6, 2015.

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: Estudo clínico e laboratorial. *Rev. Acta Cirúrgica Brasileira*, v.18, 2003.

LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Rev. Scientia Plena*, v. 10, n.3, 2014.

MACEDO, I. C. et al. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Rev. Peptides*, p. 189-196, 2012.

MAZZANTI, C. M. et al. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. *Rev. Ciência rural*, v.33, n.6, Santa Maria, 2003.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Rev. Scientia Plena*, v.8, n. 9, 2012.

MISHA, S. B. et al. Na analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituent & mechanism of action. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Reserarch*, 2010.

MOURA, L. P. de. et al. Insulina pancreática de ratos diabéticos tipo 1 submetidos a um protocolo de treinamento físico individualizado. *Rev. Motricidade*, v. 8, n. 1, p. 23-32, 2012.

NASRI, H.; SHIRZARD, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Antioxidant plants and diabetes mellitus. *Journal of research in medical sciences*, v.20, 2015.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, P. 121–141, 2005.

OECD, *Guideline for the Testing of Chemicals: Mammalian erythrocyte micronucleus test*, 1997.

OSABEDE, P. O. et al. Seasonal variation for the antidiabetic activity of *Loranthus micranthus* metanol extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, p. 196-199, 2010.

RAMÍREZ-ESPINOSA, J. J. et al. Antihyperglycemic and sub-chronic antidiabetic actions of morolic and moronic acids, in vitro and in silico inhibition of 11 beta-HSD 1. *Rev. Phytomedicine*, p. 571-576, 2013.

REZENDE, A. H. de; PELUZIO, M. do C. G.; SABARENSE, C. M. Experimentação animal: ética e legislação brasileira. *Rev. de Nutrição*, p. 237-242, 2008.

RODRIGUEZ, M. et al. Antidiabetic and antiradical activities of plants from Venezuelan Amazon. *Rev. Brasileira de Farmacognosia*, p. 331-338, 2008.

ROTTA, E. et al. Reconhecimento prático de cinco espécies de Erva-de-passarinho na arborização de Curitiba, Paraná. In: Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2005.

SANTOS, K. A.; VILANOVA, C. M. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas como hipoglicemiantes por usuários do Programa de Fitoterapia da Universidade Federal do Maranhão, Brasil. *Rev. Scientia plena*, v. 13, n. 03, 2017.

SANTOS, M. R. V. et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. *Rev. Scientia Plena*, v.6, n.10, 2010.

SILVA, S. L. da et al. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *Rev. Acta Amazonica*, v. 46, pág 73-80, 2016.

SIMÕES, C.M.O. et al. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul, 5th ed. Editora da UFRGS, Porto Alegre, 1986.

SOBERÓN, J. R. et al. Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, p. 329-333, 2010a.

SOBERÓN, J. R. et al. Purification and identification of antibacterial phenolics from *Tripodanthus acutifolius* leaves. *Journal of applied microbiology*, p. 1757-1768, 2010b.

SOBERÓN, J. R. et al. Study of antiinflammatory activity of metabolites isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *Molecular medicinal chemistry*, v. 21, p. 88-90, 2010c.

TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T. L. S.; SOARES, G. L. G.; RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Journal of Etnopharmacology*, p. 155-163, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 3 ed., p. 768, 2012.

VANZELA, E. C. et al. Pregnancy restores insulin secretion from pancreatic islets in cafeteria diet-induced obese rats. *American Journal of Pshysiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2009.

VOLPATO, G. T. et al. Revisão de plantas brasileiras em comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. *Rev. Brasileira de Plantas medicinais*, v.4, p.35-45, 2002.

## ANEXO – Orientações Para Submissão

### Revista Brasileira de Farmacognosia

**Instructions for Authors Introduction** The Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy is a periodical dedicated to the publication of original scientific work, reviews and communications in the field of Pharmacognosy (the study of crude drugs and substances derived from natural sources used as medicines). Types of articles The Brazilian Journal of Pharmacognosy accepts for publication original scientific work, reviews and communication articles written only in English. • **Original papers:** Original papers are research articles describing original experimental results. The manuscript should be arranged in the following order: Graphical abstract, Title, Abstract, Keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Authorship, References, Figures with Legends, Tables, Structural Formulae and Supplemental files (if applicable). Results and Discussion sections may appear as a combined 'Results and Discussion' section. The normal length of the main text of an Original Paper (excluding references, tables, figures and figure legends) is approximately 3,000 words. Longer manuscripts may be accepted only in exceptional and well justified cases. • **Short communications:** This section will cover mainly the isolation of known compounds from new neotropical sources, or complementary results of on-going work. The text should be arranged as follows: Graphical abstract, Title, Abstract of 200 words, Keywords, Introductory Remarks, Material and Methods with brief experimental details without subheadings, Results and Discussion as one body of text without headlines, Acknowledgements, Authorship, References (up to 20 citations) and Figures and/or Tables (up to 3). The text should not exceed 2,000 words. • **Reviews:** Authors are invited to submit a review article that provides concise and critical updates on a subject, and with around 100 references. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter and inform the reader critically of the latest developments in the field. They should be concise and include details of the search strategy used, such as time frame, search terms, used databases. A review should be an article that produces knowledge and not just a kind of survey of the existing literature. The review must be a response to an initial question. Reviews of a particular herbal drug will be considered if they contain the newest issue and a perspective on future directions. Authors are strongly recommended to prepare a manuscript using a A4- sized paper, double-spaced, with Times New Roman size-12 font, fully justified, with margins of 2 cm. **Submission checklist** You can use this list to carry out a final check of your submission before

you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details. Ensure the following: i. One author has been designated as the corresponding author with contact details: Institutional e-mail address; full postal address. ii. All authors, with their respective email addresses, should be entered into the system. iii. All necessary files have been uploaded: Graphical abstract, Manuscript; Include keywords; All figures with Legends; All tables (including titles, description, footnotes); and Supplemental files (if applicable). iv. All figure and table citations in the text match the files provided; v. Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked; vi. All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa; vii. Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet); viii. Relevant declarations of interest have been made;

ix. Journal policies detailed in this guide have been reviewed. Before you begin Ethics in publishing Please see our information page on Ethical guidelines for journal publication. Human and animal rights If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed. All articles involving studies with humans or animals should have the approval and authorization of the Ethics Committees on Research on Human Beings or on Animals of the institution to which the author(s) belong. Declaration of interest All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. For more information, please contact the Managin Editor at [revista@sbfgnosia.org.br](mailto:revista@sbfgnosia.org.br). Submission declaration and verification Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.



**Contributors** Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure. **Authorship** All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted. **Changes to authorship** Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum. **Article Transfer Service** This journal is part of an Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. **Copyright** Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this) to assign to the Brazilian Society of Pharmacognosy the copyright in the manuscript and any tables, illustrations or other material submitted for publication as part of the manuscript (the "Article") in all forms and media (whether now known or later developed), throughout the world, in all languages, for the full term of copyright, effective when the Article is accepted for publication. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. **Author rights** As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. **Role of the funding source** You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of

the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Open Access This is an open access journal: all articles will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Article Processing Charges The Brazilian Society of Pharmacognosy (SBFgnosia) pays for most of the publishing costs incurred by the journal. But, authors are required to pay a small publication fee to the Brazilian Society of Pharmacognosy in order to share in the costs of production: Payments will be received through the PayPal system for Overseas, which is a safe, flexible and well-established service for on-line payments, or by Bank transfer. Brazilian authors could make a bank deposit/transfer to Banco do Brasil account. Sociedade Brasileira de Farmacognosia (CNPJ: 76.259.381/0001-90) Processing fees: Corresponding author non-member of the SBFgnosia: US\$ 450 Corresponding author member of SBFgnosia: US\$ 350 Corresponding author member of SBFgnosia for more than two successive years US\$ 300 Corresponding author: member of the SBFgnosia for more than five successive years R\$ 250,00 A limited number of waivers for article processing charges are also available at the editors' discretion, and authors wishing to apply for these waivers should contact the editors prior to submit their manuscripts. Editors and reviewers have no access to whether authors are able to pay; the acceptance of a manuscript is based exclusively on scientific criteria for quality, novelty and relevance. Permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses: Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. Language services Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from journal's webpage. Submission Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. Please submit your article via: <https://www.evisse.com/evisse/jrnl/BJP> Additional information - All plant,

microorganism and marine organism materials used in the described research should be supported by an indication of the site (including GPS coordinates, if possible) and country of origin, the name of the person identifying the biological material and the location of the voucher specimen. - Authors should be prepared to provide documentary evidence that approval for collection was afforded from an appropriate authority in the country of collection and, if applicable, to follow the rules concerning the biodiversity rights. - The journal will not accept responsibility for research works that do not comply with the legislation of the country of residence of the author. - We strongly recommend that authors avoid stating that the popular or traditional use of a certain herb was confirmed by pre-clinical, in-vitro or in vivo tests using animals. - The Brazilian Journal of Pharmacognosy strongly encourages the submission of original works in which the experimental procedures were conducted taking into consideration green chemistry principles, such as by employing green solvents and environmental resource saving experimental designs in any step of the investigation. - The following immediate rejection criteria apply i. the manuscript does not fall into the areas of interest of the journal; ii. manuscripts not formatted in accordance with the standards of the journal; iii. the manuscript results are preliminary; iv. manuscripts reporting activity data without comparison with a reference, without a positive control/appropriate control or not based on adequate statistics; v. the biological source (e.g. plant, microorganism, marine organism etc.) is not clearly identified, authenticated and documented; vi. experimental work on antioxidant activity of crude extracts without isolation, identification and content estimation of the active compounds; phenolic compounds are widely spread in nature and fully recognized as antioxidants or scavengers. vii. experimental work on antimicrobial activity with crude extracts without isolation and identification of the active compounds, with large MIC values ( $\mu\text{g/ml}$ ) for antimicrobial activity ( $\geq 250 \mu\text{g/ml}$  for plant extracts and  $\geq 50 \mu\text{g/ml}$  for pure compounds) and without appropriate identification of culture collections/strain designation codes; viii. experimental work on essential oils with only one sample of a single plant specimen with a single chromatographic analysis and without appropriate statistical analyses; without oil yield (%) and characterization and component quantification not undertaken using GC-MS-FID. Analyses of the retention indices of the components not calculated using n-alkane homologous series together with analyses of some of the isolated natural components. Biological activity of essential oil without chemical characterization. ix. too preliminary data using in-vitro assays will not be acceptable if (i) no information on the type of activity is given; (ii) single dose or very high concentrations (must show dose-response studies); (iii) repetition of a simple bioassay (usually one assay with replicates); (iv) lack of appropriate controls (solvents; positive or negative substances according

to the study); (v) no IC50 values (if applicable). x. use of only the brine shrimp assay (*Artemia salina*) to assess the toxicity of extracts; xi. isolation and bioassay of well-known compounds with small or no relationship to the activity, or to the medicinal use of the plant without clear justification; xiii. manuscripts reporting pharmacological or biological activities of crude extracts without chemical and technical standardization. Standardization of the plant extracts is considered to be the complete description of manufacturing parameters such as granulometry, solvent-plant ratio, time of extraction, solvent composition etc., together with marker quantification and chromatographic fingerprint analyses. In addition to these Guidelines, a template (for original papers) is available at <http://www.sbfgnosia.org.br/revista/templates.html>.

**Preparation** Peer review This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Use of word processing software Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spellcheck' and 'grammar-check' functions of your word processor.

**Article structure** The manuscript should be arranged in the following order: Graphical abstract, Title, Abstract, Keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Authorship, References, Figures with Legends, Tables, Structural Formulae and Supplemental files (if applicable). Subdivision - unnumbered sections Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

**Essential title page information** Title: Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. Author names and affiliations: Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

Author affiliations should be presented in decreasing hierarchical order (e.g. Harvard University, Harvard Business School, Boston, USA) and should be written as established in its own language (e.g. Université ParisSorbonne; Harvard University, Universidade de São Paulo). Corresponding author: Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the institutional e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author. Present/permanent address: If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. Abstract A structured abstract of  $\leq 300$  words, by means of appropriate headings, should provide the context or background for the research and should state its purpose, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations. The journal does not accept abbreviations in the abstract. Immediately after the abstract, provide a maximum of six keywords in alphabetical order and separated by commas, to represent the content of the article. Please avoid using the plant name species in the keywords as it should be already in the title and/or in the abstract. Choose representative words to help indexation and readers to reach your article. Graphical abstract A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 x times; 1328 pixels (h x w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 x 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. BJP does not accept Graphical abstract using images of animals. Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Material and methods Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Plant name species Plant names should be complete, including author name and family, according to

<http://www.theplantlist.org/> or <http://www.tropicos.org>, and  
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/> Structural Formulae Chemical structures are not

considered as figures, should be numbered sequentially in bold letters according to their citations in the manuscript, and placed closed to the desired point in the manuscript body. Structures should be drawn according to the style set by the American Chemical Society. Chemical structures of well-known compounds will not be published. Abbreviations Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Units Follow internationally accepted rules and conventions: use the International System of Units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Math formulae Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Results Results should be clear and concise. Discussion This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Acknowledgements Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.). Authors contributions The role of each author involved in the development of the study and/or the elaboration of the manuscript must be clearly described, and he/she should be referred to by his/her initials. Formatting of funding sources List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. Artwork The journal uses recycled paper, so colour figures are accepted and will be available only on the online version. Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

**Electronic artwork General points**

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

**Formats**

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

- EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
- TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

**Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then the journal will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version.

**Figure captions**

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them

do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

**References Citation in text** Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication. Reference links

**Increased discoverability of research and high quality peer review** are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged. A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M., 2003. Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *J. Geophys. Res.* <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

**Web references** As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given.

**Data references** This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. This identifier will not appear in your published article.

**References in a special issue** Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

**Reference style Text:** All citations in the text should be chronologically and refer to: Author in lower case, followed by the publication year between parenthesis, e.g. Pereira (1999); at the end of the citation: Author in lower case and year, both between parenthesis. e.g. (Silva, 1999) or (Silva and Souza, 1998) or (Silva et al., 1999) or



(Silva et al., 1995a,b); textual citation: the page must be provided, e.g. (Silva, 1999, p. 24). List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c' etc., placed after the year of publication. Examples: Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304. Reference to a website: Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003). Reference to a dataset: [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>. Scientific meetings: Oliveira, R.M.M.W., Lolli, L.F., Santos, C.A.M., 2006. Possible involvement of GABA<sub>A</sub> benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. 19th ECNP Congress. Paris, France. Patents: whenever possible the Chemical Abstracts Service number should be informed. Ichikawa, M., Ogura, M., Lijima, T., 1986. Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 61,118,396*, apud *Chemical Abstracts* 105: 178423q. Journal abbreviations source Journal names should be abbreviated according to the <https://www.library.caltech.edu/journal-title-abbreviations>. Supplementary material Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). Research data This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data

refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. After acceptance Availability of accepted article This journal makes articles available online as soon as possible after acceptance. This concerns the accepted article (both in HTML and PDF format), which has not yet been copyedited, typeset or proofread. A Digital Object Identifier (DOI) is allocated, thereby making it fully citable and searchable by title, author name(s) and the full text. The article's PDF also carries a disclaimer stating that it is an unedited article. Subsequent production stages will simply replace this version. Proofs One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. The journal provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download the free Adobe Reader. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them by the system. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Authors Inquiries You can check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.