

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**Instituto Biomédico**

**Departamento de Saúde Coletiva**

**Bacharelado em Biomedicina**

**Gisele Santos de Souza**

**Efeitos metabólicos do óleo essencial de carqueja amarga (*Baccharis trimera*)  
em ratos diabéticos**

**Trabalho final de Conclusão de Curso (TCC)**

**Rio de Janeiro**

**2018**

**Gisele Santos de Souza**

**Efeitos metabólicos do óleo essencial de carqueja amarga (*Baccharis trimera*)  
em ratos diabéticos**

Monografia apresentada ao curso de Biomedicina da UNIRIO, como requisito necessário à obtenção do título de bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Felipe Alves  
Moreira  
Coorientadora: Profa. Dra. Cristiane  
Barbosa Rocha

**Rio de Janeiro**

**2018**

S Souza, Gisele Santos de  
Efeitos do óleo essencial de carqueja amarga  
(Baccharis trimera) em ratos diabéticos / Gisele  
Santos de Souza. -- Rio de Janeiro, 2018.  
39

Orientador: Ricardo Felipe Alves Moreira.  
Coorientadora: Cristiane Barbosa Rocha.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro,  
Graduação em Biomedicina, 2018.

1. Diabetes Mellitus tipo 2. 2. Ervas  
medicinais. 3. Carqueja amarga (Baccharis trimera).  
4. Óleo essencial. I. Moreira, Ricardo Felipe Alves,  
orient. II. Rocha, Cristiane Barbosa, coorient.  
III. Título.

GISELE SANTOS DE SOUZA

**EFEITOS METABÓLICOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE CARQUEJA AMARGA  
(*BACCHARIS TRIMERA*) EM RATOS DIABÉTICOS**

Monografia apresentada ao Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Monografia apresentada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Felipe Alves Moreira (DSC/IB/UNIRIO)

---

Coorientadora: Profa. Dra. Cristiane Barbosa Rocha (DCF/IB/UNIRIO)

---

1° Examinador: Profa. MSc. Solange Campos Vicentini  
(Departamento de Ciências Fisiológicas / IB / UNIRIO)

---

2° Examinador: Prof. MSc Thiago Vieira de Moraes  
(PPGAN / UNIRIO)

## **Dedicatória**

*Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, minha irmã e cunhado, que estiveram me apoiando durante toda essa trajetória; aos meus ex-professores e incentivadores, aos meus grandes amigos e anjos, aos meus colegas de trabalho que sempre buscaram me ajudar de alguma forma; e ao meu afilhado, na esperança de que algum dia eu possa inspirá-lo.*

## **Agradecimentos**

“I’m Titanium”, esse foi o verso escolhido para acompanhar minha entrada na colação de grau festiva. Eu escolhi essa música, não apenas por gostar dela, mas porque eu sei exatamente o peso dessa frase. É preciso ser forte para se manter de pé, e muito mais forte quando se vai contra o sistema. Hoje eu sou como uma rachadura nesse sistema desleal que exclui àquele que mais precisa de amparo. Hoje, essa conquista representa apenas um pequeno passo de algo muito maior não apenas em minha vida. Eu sou a prova de que educação é a única forma de revolução eficaz.

Agradeço a Deus porque nada disso seria possível sem a presença e cuidado dEle. Agradeço a cada um que contribuiu de alguma forma para que um sonho se tornasse realidade em minha vida. Agradeço a minha família por todo o suporte oferecido mesmo com dificuldades, a cada amigo que ouviu quando estive entusiasmada e/ou reclamando e me encheu de bons conselhos e palavras positivas.

Eu não queria citar nomes em meus agradecimentos, mas não poderia deixar de destacar aqueles que viveram cada momento dessa jornada comigo, aqueles que compartilharam cada sentimento e material; minha família UNIRIO. Geyzara Diniz, Raquel Gorrera, Ingrid Paranhos, Yara Dabdab, Rodrigo Pimentel, Juliana Magalhães, Jéssica Blanco e Nicole Chaparro, não há como agradecer por tudo o que fizeram por mim, ou expressar o quão importantes se tornaram. Vocês estão eternizados em meu coração e nessas breves palavras.

Ademais, agradeço a todos que acreditaram em mim, quando, talvez, nem eu mesma fosse capaz de me depositar fé.

Gostaria de agradecer também ao CNPq, FAPERJ, CAPES e UNIRIO pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho de conclusão de curso (TCC), em nome de todo o grupo LACAPA/LEEM.

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)*

## RESUMO

A carqueja amarga (*Baccharis trimera*) é a segunda planta mais citada na literatura científica como apropriada para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Apesar disso, os compostos responsáveis pelas propriedades medicinais dessa planta (p. ex.: ação hipoglicemiante) ainda não foram identificados de fato. Algumas dessas propriedades podem estar associadas aos compostos terpênicos de seu óleo essencial (p. ex.: carquejol). Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar a influência da ingestão do óleo essencial de carqueja amarga sobre o metabolismo de ratos diabéticos, com ênfase no controle glicêmico e do perfil lipídico. O estudo foi desenvolvido durante 8 semanas com 20 ratos Wistar machos, divididos em quatro grupos de 5 indivíduos: Grupo 1 (NDV) = controle não diabético + veículo para o óleo essencial; Grupo 2 (NDO) = controle não diabético + óleo essencial; Grupo 3 (DV) = ratos diabéticos + veículo para o óleo essencial; Grupo 4 (DO) = ratos diabéticos + óleo essencial. Os ratos do grupos 1 e 2 foram alimentados com dieta normal, enquanto que os ratos dos grupos 3 e 4 foram alimentados com uma dieta hiperlipídica/hipercalórica, durante as 3 primeiras semanas. No 22º dia foi administrado 35mg/Kg de estreptozotocina aos ratos dos grupos 3 e 4. A partir da 6ª semana, ambos os grupos passaram a receber dieta normal. A glicemia de jejum dos animais foi monitorada semanalmente. No último dia do experimento (57º dia), realizou-se a eutanásia dos ratos e análise dos seguintes parâmetros bioquímicos: glicemia de jejum, insulinemia, hemoglobina glicada, triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol e LDL-colesterol. Os ratos diabéticos desenvolveram uma hiperglicemia marcante, que provocou uma taxa de glicação de hemoglobinas elevada em relação aos grupos controles não diabéticos. Os ratos diabéticos também desenvolveram uma dislipidemia caracterizada principalmente pela hipertrigliceridemia. O óleo essencial de carqueja mostrou potencial para agir como um agente hipotrigliceridêmico. Novos testes, com um n amostral maior e um tempo de tratamento superior a 3 semanas, devem ser realizados para confirmação da ação anti-dislipidêmica e para verificação de uma possível ação hipoglicemiante desse óleo essencial.

Palavras – chaves: ratos Wistar, diabetes mellitus tipo 2, óleo essencial de carqueja, ação hipotrigliceridêmica.



## **ABSTRACT**

The bitter carqueja (*Baccharis trimera*) is the second most cited plant in the scientific literature as appropriate type 2 diabetes mellitus (DM2) treatment. Despite this, the compounds responsible for the medicinal properties of this plant (e.g., hypoglycemic action) have not yet been identified. Some of these properties can be associated with the terpene compounds of its essential oil (e.g., carquejol). Thus, the present study aimed to evaluate the influence of the intake of bitter carqueja essential oil on the metabolism of diabetic rats, with emphasis on glycemic control and lipid profile. The study was developed for 8 weeks and with 20 male Wistar rats, divided into four groups of 5 individuals: Group 1 (NDV) = non-diabetic control + vehicle for essential oil; Group 2 (NDO) = non-diabetic control + essential oil; Group 3 (DV) = diabetic rats + vehicle for the essential oil; Group 4 (OD) = diabetic rats + essential oil. The rats in groups 1 and 2 were fed a normal diet, while the rats in groups 3 and 4 were fed a hyperlipid/hypercaloric diet for the first 3 weeks. On the 22<sup>nd</sup> day 35mg/kg of streptozotocin was administered to the rats of the groups 3 and 4. From the 6<sup>th</sup> week, both groups started to receive normal diet. The fasting glycemia of the animals was monitored weekly. On the last day of the experiment (57<sup>th</sup> day), rats were euthanized and the following biochemical parameters were analyzed: fasting glycemia, insulinemia, glycated hemoglobin, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol and LDL cholesterol. Diabetic rats developed hyperglycemia, which resulted in elevated hemoglobin glycation rate when compared to the non-diabetic control groups. Diabetic rats also developed dyslipidemia characterized primarily by hypertriglyceridemia. Carqueja essential oil showed potential to act as a hypotriglyceridemic agent. New tests, with a larger sample size and a treatment time greater than 3 weeks, should be performed to confirm the anti-dyslipidemic action and to verify a possible hypoglycemic action of this essential oil.

Key words: Wistar rats, type 2 diabetes mellitus, carqueja essential oil, hypotriglyceridemic action.

## Figuras e gráficos

<b>Figura 1:</b> Anatomia de uma ilhota de Langerhans.....	10
<b>Figura 2:</b> Alterações de algumas vias de sinalização da insulina que levam a resistência periférica à ação do hormônio.....	12
<b>Figura 3:</b> Lipotoxicidade dos Ácidos Graxos Livres nos Tecidos Muscular e Hepático.....	13
<b>Gráfico 1:</b> Glicemia dos ratos monitorada durante todo o desenvolvimento do protocolo experimental.....	26
<b>Gráfico 2:</b> Insulinemia de jejum determinada após eutanásia dos animais.....	27
<b>Gráfico 3:</b> Hemoglobina glicada determinada após eutanásia dos animais.....	28
<b>Gráfico 4:</b> Triglicerídeos determinados após eutanásia dos animais.....	30
<b>Gráfico 5:</b> LDL-colesterol determinado após eutanásia dos animais.....	30
<b>Gráfico 6:</b> HDL-colesterol determinado após eutanásia dos animais.....	31
<b>Gráfico 7:</b> Colesterol total determinado após eutanásia dos animais.....	32

## **Quadros e tabelas**

**Quadro 1:** Indicação para rastreamento de DM2 em indivíduos assintomáticos.....9

**Quadro 2:** Efeitos da insulina sobre a glicose sanguínea.....15

## Lista de abreviaturas e siglas

Acetil CoA	Acetil coenzima A
AGL	Ácidos Graxos Livres
ANOVA	Análise de Variância
DAG	Diacilglicerol
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DO	Diabéticos + óleo
DV	Diabéticos + veículo
FOXO	<i>Forkhead Box O</i>
G1/G2/G3/G4	Grupos 1/2/3/4 nos quais os ratos foram divididos
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GLUT-2	Transportador de glicose 2
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GSK3	Glicogênio Sintase Quinase 3
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL-colesterol	Lipoproteína de alta densidade
IKKB	Complexo inibidor de Quinase kB
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IRS	Receptor de insulina
JAK/STAT3	Janus quinase/Proteína transdutora de sinais ativadora de transcrição 3
JNK	c-Jun aminoterminal quinase
LACAPA	Laboratório de Avaliação da Composição e Aroma de Produtos Alimentícios
LCCoA	Acil-CoA de Cadeia Longa
LDL-colesterol	Lipoproteína de baixa densidade
LEEM	Laboratório de Estudo de Ervas Medicinais
MG	Minas Gerais
MS	Ministério da Saúde

NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo reduzida
NDO	Não diabéticos + óleo
NDV	Não diabéticos + veículo
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
PEPCK	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Proteína Fosfatidilinositol-3-Quinase
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PKB/Akt	Proteína quinase B
PKF-1	Proteína Fosfofrutoquinase 1
PPAR $\gamma$	Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos gama
RHH	Ração Hiperglicêmica Hipercalórica
RJ	Rio de Janeiro
RN	Ração Normal
RSI-1	<i>Insulin Receptor Substrate-1</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SOCS3	Supressor de sinalização de citocina 3
SUS	Sistema Único de Saúde
Teta-PKC	Proteína quinase C - teta
TG	Triglicerídeo
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
UNIRIO	Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Diabetes – visão geral.....	8
1.2 Ervas medicinais.....	16
1.3 Carqueja ( <i>Baccharis trimera</i> ).....	17
2. OBJETIVOS .....	19
3. METODOLOGIA .....	19
3.1 Aprovação da pesquisa.....	19
3.2 Animais.....	19
3.3 Rações.....	20
3.4 Estreptozotocina.....	20
3.5 Óleo essencial de carqueja ( <i>Baccharis trimera</i> ).....	21
3.6 Teste de Toxicidade com <i>Artemia salina</i> .....	21
3.7 Caracterização do óleo essencial da carqueja.....	21
3.8 Protocolo experimental para avaliação da influência do consumo do óleo essencial de carqueja sobre o metabolismo de ratos diabéticos .....	22
3.9 Análises bioquímicas.....	23
3.10 Análises estatísticas.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
4.1 Caracterização do óleo essencial de carqueja amarga ( <i>Baccharis trimera</i> ).....	23
4.2 Avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de carqueja amarga.....	24
4.3 Avaliação centesimal da RN e RHH.....	24
4.4 Influência do consumo do óleo essencial de carqueja amarga sobre o metabolismo de ratos diabéticos.....	24
4.4.1 Glicemia.....	24
4.4.2 Insulinemia.....	26
4.4.3 Hemoglobina glicada.....	27
4.4.4 Perfil lipídico.....	28
5. CONCLUSÃO.....	32

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
7. ANEXOS.....	39

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Diabetes – visão geral

A *Diabetes Mellitus* é uma doença crônica não transmissível de proporções mundiais. Ela afeta mais de 370 milhões de pessoas, com projeções de aumento significativas para as próximas décadas (BAYNES; DOMINICZAK, 2015). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2017), 6,9% da população é diabética, o que corresponde a aproximadamente 13 milhões de brasileiros.

Ao contrário do que se pode imaginar, a diabetes mellitus não é uma patologia que afeta exclusivamente a sociedade contemporânea. Admite-se que a doença já existia na antiguidade, isso porque relatos egípcios indicaram a existência de uma doença que era caracterizada pela emissão abundante e frequente de urina. Esse sintoma, conhecido como poliúria, constitui, junto com a polidipsia e a polifagia, a tríade clássica de sintomas dessa doença (TSCHIEDEL, 2010).

A relação entre diabetes e açúcar começou a ser estabelecida em 1675, quando Thomas Willis, médico londrino, descobriu que a urina dos pacientes diabéticos era doce após provar a urina de um paciente. Mathews Dobson, cerca de um século depois, confirmou experimentalmente a presença de altos níveis de açúcar na urina dos pacientes diabéticos quando notou que o aquecimento da urina desses pacientes até o ressecamento formava um resíduo açucarado. Ainda no século XVIII Cullen sugeriu a adição do termo *mellitus*, que significa doce como mel, ao nome dessa patologia. Em 1815, o químico Francês Michael Chevreau demonstrou que esse açúcar era a glicose (AHMED, 2003; TSCHIEDEL, 2010). A glicose representa cerca de 80% do produto da digestão de carboidratos e é a fonte de energia mais importante do organismo humano. (BAYNES; DOMINICZAK, 2015).

A diabetes é uma doença crônica associada a defeitos na produção, secreção ou ação do hormônio proteico insulina. Esses defeitos são responsáveis pelo estabelecimento da principal característica dessa doença: a hiperglicemia crônica. A insulina desempenha diversas funções fisiológicas (Quadro 1). Sua secreção é estimulada de forma rápida após a ingestão de carboidratos, pois esse hormônio é responsável pela captação celular de glicose em situação de hiperglicemia. Além disso, para dar um destino à glicose captada, a insulina dispara processos que favorecem a glicólise, glicogênese, lipogênese e a síntese proteica. Em paralelo, a



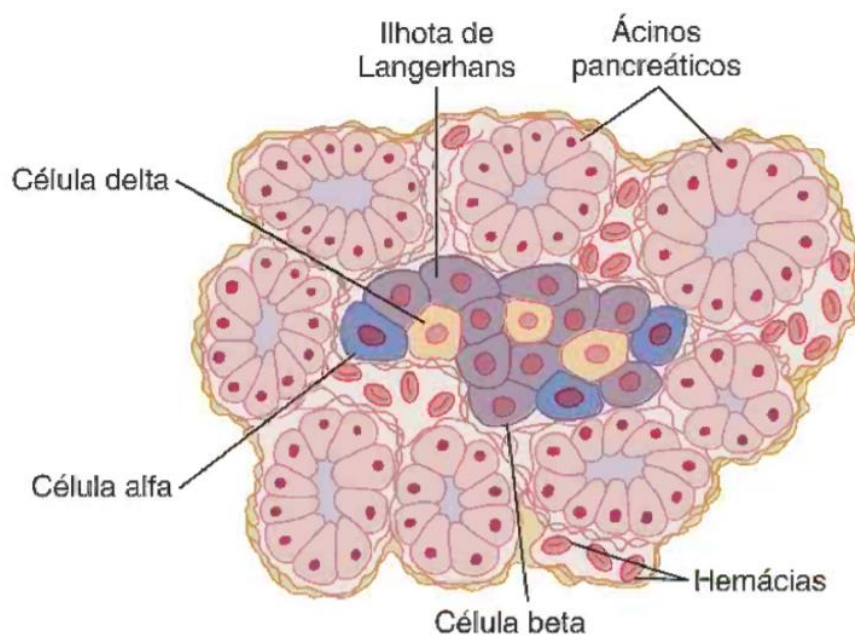
insulina promove a supressão da gliconeogênese, glicogenólise, lipólise e degradação proteica (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; GUYTON; HALL, 2011).

**Quadro 1:** Efeitos da insulina sobre a glicose sanguínea.

Efeito metabólico	Enzima alvo
↑ Captação de glicose (músculo, tecido adiposo)	↑ Transportador de glicose (GLUT-4)
↑ Captação de glicose (fígado)	↑ Glicocinase (expressão aumentada)
↑ Síntese de glicogênio (fígado, músculo)	↑ Glicogênio-sintase
↓ Degradação de glicogênio (fígado, músculo)	↓ Glicogênio-fosforilase
↑ Glicólise, produção de Acetil-CoA (fígado, músculo)	↑ PKF-1 ↑ Complexo da piruvato-desidrogenase
↑ Síntese de Ácidos Graxos (fígado)	↑ Acetil-CoA-carboxilase
↑ Triacilglicerol (tecido adiposo)	↑ Lipase lipoproteica

(Fonte: NELSON; COX, 2014).

Existem diversos tipos de diabetes, sendo os tipos 1 e 2 os principais (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017-2018). Na diabetes tipo 1 (DM1) se observa uma produção de insulina deficiente ou nula como resultado de um processo autoimune de destruição das células  $\beta$ -pancreáticas produtoras de insulina. Os linfócitos T auto reativos reconhecem os antígenos autólogos, presentes nas células  $\beta$ -pancreáticas (Figura 1), como antígenos estranhos ao organismo, por isso promovem a destruição dessas células. Em geral, a DM1 se desenvolve ainda na infância e adolescência, porém é possível que ela se manifeste na idade adulta. Também é comum que o estímulo para o desenvolvimento desse processo autoimune seja disparado pela exposição de indivíduos geneticamente propensos a infecções virais. (ABBAS; LITCHMAN, PILLAI, 2015; GUYTON; HALL, 2011)



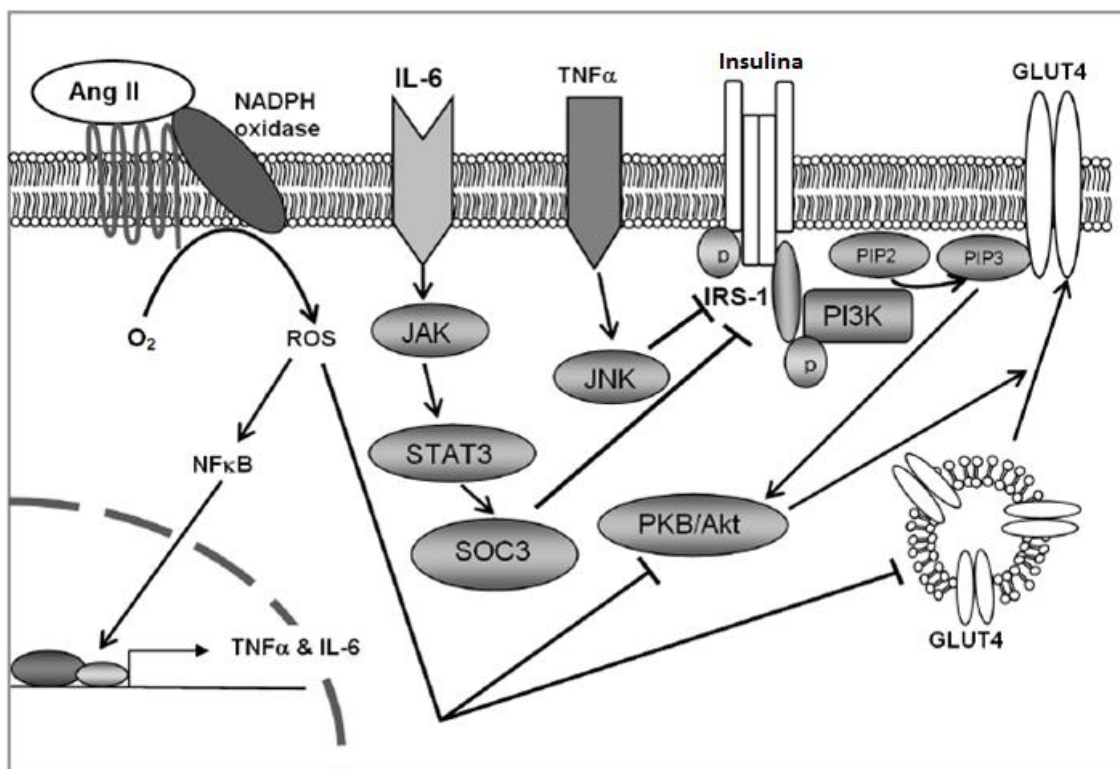
**Figura 1:** Anatomia de uma ilhota de Langerhans.

(Fonte: Guyton; Hall, 2011).

Dentre todas as formas de diabetes conhecidas atualmente, a mais comum e recorrente é a diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), que corresponde a 90% dos casos de diabetes diagnosticados em todo o mundo (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017-2018). Esse tipo de diabetes (DM2) é caracterizado principalmente pela resistência à ação da insulina observada nos tecidos periféricos. Essa resistência à insulina leva a um aumento da produção e secreção desse hormônio pelas células  $\beta$ -pancreáticas, o que pode levar, em um primeiro momento, ao surgimento de uma hiperinsulinemia antes mesmo do aparecimento da hiperglicemia. Em indivíduos não diagnosticados e, conseqüentemente, não tratados, ou ainda em pacientes tratados inadequadamente, esse aumento na secreção da insulina pode levar a uma exaustão das células beta e, em longo prazo, a sua destruição. Se isso acontecer, pode ser necessário começar a tratar o paciente com DM2 com insulina exógena, tal como se faz com a DM1 (ADA, 2017; DE MARIA, MOREIRA & MARCÍLIO, 2011; KHARROUBI & DARWISH, 2015).

Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da DM2 é a obesidade. Indivíduos obesos apresentam um estado de inflamação crônica de baixo grau e, por conta disso, expressam altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias

como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas 1 e 6 (IL-6 e IL-1), produzidas, nesse caso, principalmente pelos adipócitos, embora também possam ser produzidas em menores quantidades nos macrófagos, músculo e fígado. Estudos demonstram que o TNF- $\alpha$  reduz a autofosforilação insulina-estimulada do receptor de insulina – IRS (receptor do tipo tirosina quinase) em 20 a 50%, além de reduzir também a fosforilação em resíduos de tirosina no substrato proteico desse receptor, o *Insulin Receptor Substrate-1* (SRI-1). Esta última redução acontece a partir da ligação do TNF- $\alpha$  ao seu receptor de membrana, que ativa a via JNK (ou a via do complexo IKKB), que leva a fosforilação de resíduos de serina no IRS-1. De forma semelhante, a ligação de IL-6 ao seu respectivo receptor de membrana, ativa a via de sinalização JAK/STAT3, resultando na inibição da fosforilação de IRS-1 pelo receptor de insulina. Dessa forma, ambas as vias podem levar a uma ubiquitinação aumentada / degradação proteossômica do IRS-1 ou a diminuição da sua capacidade de ativar a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) que, por sua vez, é então incapaz de ativar a via PKB/Akt; responsável por fosforilar a proteína AS160 do GLUT4, promovendo sua translocação para a membrana e consequente aumento da captação intracelular de glicose. Portanto, a inibição dessa cascata de sinalização leva à diminuição da sensibilidade dos tecidos periféricos (principalmente adiposo, muscular e hepático) ao hormônio, caracterizando a resistência à insulina (Figura 2). Além disso, o TNF- $\alpha$  também está envolvido na regulação negativa da expressão do GLUT-4 (transportador de glicose) e de alguns fatores de transcrição envolvidos no metabolismo de lipídeos e glicídios no adipócito, como o PPAR- $\gamma$  e o C/EBP $\alpha$  (BOURET; LEVIN; OZZANE, 2015; DE GODOY-MATOS, 2006; DE MARIA, MOREIRA & MARCÍLIO, 2011).

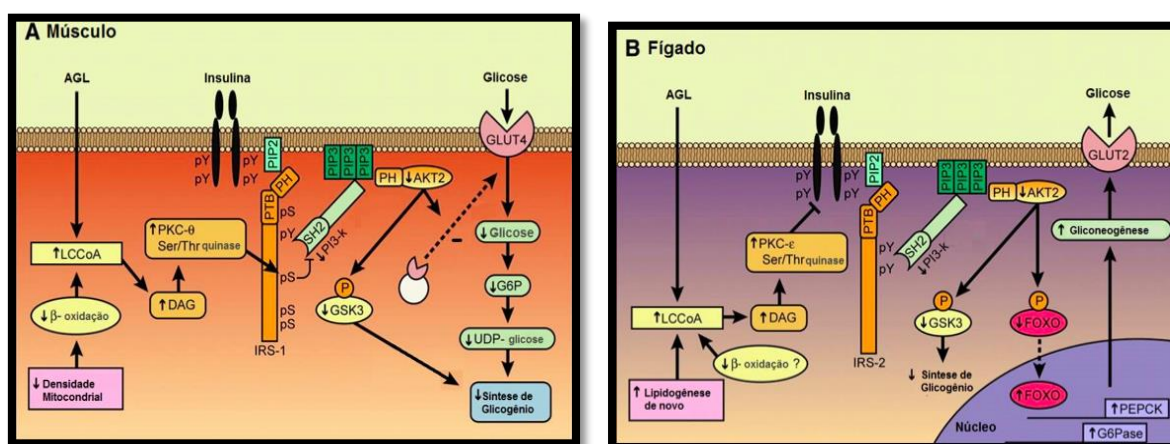


**Figura 2 - Alterações de algumas vias de sinalização da insulina que levam à resistência periférica à ação do hormônio.** Do lado esquerda da figura está representada a ação (sistêmica ou até mesmo local) da Angiotensina II na ativação do complexo enzimático NADPH-oxidase, desencadeando um estresse oxidativo que dá origem às espécies reativas de oxigênio (ROS), responsáveis por ativar e translocar o fator de transcrição NF-κB para o núcleo. Este último, uma vez no núcleo, estimula a transcrição, produção e liberação de citocinas, como TNF-α e IL-6. A ligação de IL-6 ao seu respectivo receptor de membrana, ativa a via de sinalização JAK/STAT3 que, por sua vez, ativa SOCS3, resultando na inibição da fosforilação de IRS-1 pelo receptor de insulina. De forma semelhante, a ligação de TNF-α ao seu receptor de membrana, ativa a via JNK, que leva a fosforilação de resíduos de serina no IRS-1, diminuindo sua fosforilação em resíduos de tirosina. Dessa forma, ambas as vias podem levar a uma ubiquitinação aumentada/degradação proteossômica do IRS-1 ou a diminuição da sua capacidade de ativar PI3K que, por sua vez, é então incapaz de converter PIP<sub>2</sub> em PIP<sub>3</sub> e, conseqüentemente, de ativar a via PKB/Akt; responsável por fosforilar a proteína AS160 do GLUT4, promovendo sua translocação para a membrana e consequente captação intracelular de glicose; contribuindo, assim, para o estabelecimento da resistência à insulina (MÍNEA et al., 2005; WEI et al., 2007). **Ang II**, angiotensina II; **O<sub>2</sub>**, oxigênio molecular; **ROS**, espécies reativas de oxigênio; **NF-κB**, fator nuclear kappa B; **TNF-α**, fator de necrose tumoral-α; **IL-6**, interleucina-6; **jak**, Janus quinase; **STAT3**, Signal transducer and activator of transcription 3; **SOCS3**, supressor de sinalização de citocina 3; **JNK**; c-Jun aminoterminal quinase; **IRS-1**, substrato do receptor de insulina-1; **PI3K**, proteína fosfatidilinositol-3-quinase; **PIP<sub>2</sub>**, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; **PIP<sub>3</sub>**; fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato; **PKB/Akt**, proteína quinase B; **GLUT-4**; transportador de glicose-4.

(Fonte: Adaptado Caio Júnior, 2017. Disponível em: <<https://goo.gl/sbPUQV>>).

Conforme mencionado, em um indivíduo normal os efeitos metabólicos principais da insulina seriam: o aumento da captação de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas (tecido muscular esquelético), triglicerídeos (tecido adiposo) e glicogênio (fígado) e, portanto, bloqueio da proteólise, lipólise e da produção hepática de glicose (via diminuição da glicogenólise e gliconeogênese).

As citocinas pró-inflamatórias, uma vez que inibem a cascata de sinalização da insulina geram resistência à ação do hormônio nos tecidos periféricos, isso acaba por favorecer a glicogenólise e a gliconeogênese no fígado, a proteólise no músculo e a lipólise no tecido adiposo. Devido a essa lipólise aumentada nos adipócitos, ocorre então um processo de lipotoxicidade, onde há uma alta concentração de ácidos graxos saturados no sangue, resultando numa maior captação celular e, conseqüentemente, acúmulo desses ácidos e de seus metabólitos (diacilglicerol, acetil-CoA e ceramidas) nos tecidos muscular esquelético e hepático (Figura 3). No tecido muscular esquelético esse acúmulo resulta na ativação da proteína quinase-teta (teta-PKC) que fosforila o SRI-1 em resíduos de serina e, portanto, reduz sua associação à proteína PI3K, alterando mais uma vez a via intracelular de sinalização da insulina (Figura 3). Já no tecido hepático, como mencionado, ocorre uma inibição da captação de glicose, além da falha em suprimir os processos de gliconeogênese e glicogenólise, colaborando para a hiperglicemia (Figura 3) (DE GODOY-MATOS, 2006; DE MARIA, MOREIRA & MARCÍLIO, 2011; BOURET, LEVIN & OZANNE, 2015).



**Figura 3 - Lipotoxicidade dos Ácidos Graxos Livres nos Tecidos Muscular e Hepático. A.: Músculo.** Do lado esquerdo da figura está representado o aumento de AGL no sangue que, ao entrar na célula, sofre conversão a LCCoA. Em condições basais, o LCCoA seria transportado para a mitocôndria para sofrer o processo de β-oxidação, entretanto, em concentrações elevadas de glicose

plasmática, este processo é inibido e as concentrações citosólicas de LCCoA se encontram aumentadas, levando a sua conversão em DAG. Este último faz a ativação da enzima PKC- $\theta$  que, por sua vez, leva a fosforilação de SRI-1 em resíduos de serina, diminuindo a ativação de PI3K e, portanto, bloqueando a via PKB/Akt de translocação da GLUT4 para a membrana plasmática. O bloqueio desta via (PKB/Akt) leva, ainda, a incapacidade desta de fosforilar e conseqüentemente ativar a enzima GSK3, responsável por converter glicose em glicogênio. **B.: Fígado.** A esquerda da figura observa-se que o excesso de AGL está sendo convertido em LCCoA, como supracitado, além da conversão de LDN em LCCoA. Novamente há a conversão de LCCoA em DAG que, por sua vez leva a ativação de PKC- $\epsilon$  (específica do fígado), que fosforila IRS-1 em resíduos de serina, resultando no bloqueio da via PKB/Akt. Além da inibição da conversão de glicose a glicogênio pela inativação da GSK3, como já citado, a inibição dessa via no fígado leva ainda, a sua incapacidade de fosforilar e conseqüente inativação do fator de transcrição FOXO, o que possibilita que esse seja translocado para o núcleo e aumente a expressão de G6Pase e PEPCK, enzimas envolvidas no processo de gliconeogênese (HABER et al., 2001; RAGHEB & MEDHAT, 2011; SOLINAS, BORÉN & DULLO, 2015; LU & HUANG, 2015). **AGL**, ácidos graxos livres; **LCCoA**, acil-CoA de cadeia longa; **DAG**, diacilglicerol; **PKC- $\theta$** , proteína quinase-teta; **SRI-1**, substrato 1 do receptor de insulina; **PI3K**, fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato; **PKB/Akt**, proteína quinase B; **GSK3**, glicogênio sintase quinase 3; **LDN**, lipídios de novo; **FOXO**, *forkhead box O*; **G6Pase**, glicose-6-fosfatase; **PEPCK**, fosfoenolpiruvato carboxiquinase.

(Fonte: Adaptado de Caio Júnior, 2016. Disponível em: <<https://goo.gl/o2hweG>>).

A dislipidemia diabética é geralmente determinada por um aumento da geração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol), combinado a uma concentração aumentada de triglicerídeos plasmáticos (TG) e a uma redução da lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol). Esses fatores associados, por sua vez, são denominados de dislipidemia aterogênica. Um tratamento intensivo focado na redução da pressão arterial, da glicemia e da LDL pode levar a uma redução significativa do risco de eventos cardiovasculares (em até 50%), sendo de extrema importância para garantir a qualidade de vida e a longevidade do paciente com DM2 (DE GODOY-MATOS, 2006; ALAM, KAMUR & VERMA, 2015; VALENSI, 2016).

A DM2 é uma doença com caráter progressivo, isso quer dizer que se desenvolve através dos anos. Por isso sua ocorrência se dá na idade adulta, costumeiramente a partir dos 40 anos de idade, segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016). Essa doença é motivo de grande preocupação e alvo de diversos estudos, porque além das proporções mundiais que assumiu, ela é uma doença que pode gerar diversas complicações graves, podendo comprometer o sistema renal, cardiovascular e até os nervos. (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; GUYTON; HALL, 2011; PEDROSA; VILAR; BOUTON, 2014). Essa doença pode

progredir de forma silenciosa, por isso é recomendado que se faça o rastreamento da doença (Quadro 2) em indivíduos assintomáticos que se enquadrem nos grupos de risco (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017-2018).

**Quadro 2:** Indicação para rastreamento de DM2 em indivíduos assintomáticos.

<b>Indivíduos com idade <math>\geq</math> 45 anos: todos.</b>
<b>Indivíduos com idade &lt; 45 anos; sugere-se rastreamento de DM2 em indivíduos com sobrepeso ou obesidade e que apresentem mais um fator de risco para DM dentre os seguintes:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Pré-diabetes;</b></li><li>• <b>História familiar de DM (parente de primeiro grau);</b></li><li>• <b>Raça/etnia de alto risco para DM (negros, hispânicos ou índios);</b></li><li>• <b>Mulheres com diagnóstico prévio de DMG;</b></li><li>• <b>História de doença cardiovascular;</b></li><li>• <b>Hipertensão arterial;</b></li><li>• <b>HDL-c &lt; 35 mg/dL e/ou triglicérides &gt; 250 mg/dL;</b></li><li>• <b>Síndrome de ovários policísticos;</b></li><li>• <b>Sedentarismo;</b></li><li>• <b>Acantose <i>nigricans</i>.</b></li></ul>

DM: diabetes mellitus; DMG: diabetes mellitus gestacional; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade.

(Adaptado: Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes 2017-2018.)

A DM2 ainda não tem cura, mas tem tratamento. A dieta é o tratamento primário quando se detecta a doença, e mesmo em casos mais complexos, quando se inclui o uso de medicamentos (hipoglicemiantes orais e agentes anti-dislipidêmicos), ela continua sendo um elemento fundamental no controle da diabetes. Como mencionado, em casos mais extremos, a insulina exógena também pode ser utilizada pelo indivíduo com DM2 para garantir o controle glicêmico (FERREIRA; CAMPOS, 2014; RANG; et al., 2013).

Apesar dos diversos tratamentos disponíveis, os estudos mostram um decréscimo contínuo no controle da diabetes, o que demonstra que o tema está longe

de ser esgotado, e é preciso buscar alternativas. Nesse contexto, o uso de ervas medicinais para tratamento complementar ou alternativo dessa doença tem demonstrado ser uma estratégia promissora (RANG; et al., 2013).

## **1.2 Ervas medicinais**

A utilização de ervas para tratar e prevenir doenças é uma antiga prática humana. Sociedades com pouca força econômica costumam ter dificuldade de acesso a serviços assistenciais médico e farmacêutico e, por isso, recorrem às plantas com maior frequência (BORGES; BAUTISTA; GUILERA, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Em Alma-Ata, 1978, a Organização Mundial da Saúde expressou sua posição sobre o uso de plantas medicinais, deixando clara a necessidade de valorização da utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário. Considera-se que 80 por cento da população mundial faz uso de plantas medicinais ou de seus preparados no que se refere à atenção primária à saúde. Nesse sentido, os países em desenvolvimento, como o Brasil, merecem destaque, pois possuem aproximadamente 67% da biodiversidade vegetal encontrada no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Mais de 50 mil espécies de plantas já foram catalogadas no Brasil. Essa diversidade inclui plantas nativas e estrangeiras. O uso dessas plantas medicinais está bastante enraizado na cultura brasileira, como herança das culturas africana e indígena (SILVA, 2017).

Há o interesse em desenvolver e fortalecer a fitoterapia no SUS (Sistema Único de Saúde). O Ministério da Saúde (MS) reconhece a importância do estudo das plantas medicinais e do conhecimento popular a esse respeito. Em 2006, quando publicou uma Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, cujas diretrizes evidenciam a estruturação e fortalecimento das cadeias produtivas locais, objetivando reduzir a dependência do Brasil no setor de medicamentos fitoterápicos, ressaltou a necessidade de catalogar conhecimento tradicional sobre plantas medicinais e buscar sua validação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; OLIVEIRA; ROPKE, 2016).

Dentre as vantagens do desenvolvimento das pesquisas farmacológicas com as plantas medicinais podemos citar: o fato de serem uma fonte inesgotável para o desenvolvimento científico, capaz de gerar lucro; o aprimoramento do conhecimento tradicional com grande alcance social, garantindo retorno à população; e a



possibilidade de utilização variada dessas plantas medicinais, como chá, material macerado, sumos ou sucos, xaropes e poções (SILVA, 2017; SIXEL; PECINALLI, 2005).

No Brasil, atualmente, observa-se o fenômeno de envelhecimento populacional. Como consequência disso, a busca por terapias menos onerosas para tratar doenças crônico-degenerativas, como a DM2, mostra-se crescente. Diversas plantas demonstraram caráter hipoglicemiante. Dessa forma, o uso de fitoterápicos para o tratamento de pacientes com DM2 pode ser uma forma opcional de terapia, com menores custos, cujos benefícios podem ser, no mínimo, complementares aos produzidos pela terapia convencional (BORGES; BAUTISTA; GUILERA, 2008).

### **1.3 Carqueja (*Baccharis trimera*)**

Carqueja é um nome vulgar que se refere a diversas espécies do gênero *Baccharis*. Essas plantas são utilizadas com frequência para tratamento de distúrbios relacionados ao trato digestivo (BORGES; et al., 2008; BELTRAME; et al., 2009). A *Baccharis trimera* é a espécie de carqueja mais estudada, estando incluída na farmacopeia brasileira. É, também, conhecida como carqueja-amarga, carqueja-amargosa ou carqueja-do-mato (BELTRAME, 2009). Apesar da difusão do uso dessa erva medicinal para fins relacionados ao sistema digestório, já foram relatadas diversas outras ações farmacológicas para essa espécie, tais como atividade relaxante muscular, anti-hepatotóxica, anti-inflamatória, analgésica, antimutagênica, anti-helmíntica e anti-reumática. Ela também é usada para tratar problemas renais, de má circulação sanguínea e diabetes (BELTRAME, 2009; SILVA, 2004). De acordo com Borges, Bautista e Guilera (2008), a carqueja amarga (*Baccharis trimera*) é a segunda planta mais citada por seus efeitos hipoglicemiantes, perdendo apenas para a pata de vaca (*Bauhinia forficata*).

Os flavonoides (quercetina, luteolina, genisteína, naringenina, cianidina, epicatequina) estão entre os metabólitos secundários encontrados em maior quantidade na *Baccharis trimera* e são indicados como potencialmente responsáveis por várias de suas atividades terapêuticas. Outro grupo de destaque com relação ao potencial bioativo é aquele formado por alguns compostos diterpênicos (não constituintes do óleo essencial dessa erva) e suas lactonas: bacrispina, 1-desóxi-bacrispina, ácido hautriwaico e sua lactona, malonil clerodanos. Por último, podemos

destacar o grupo bioativo dos compostos terpênicos, presentes no óleo essencial das folhas dessa planta (MARQUES, 2008).

Os óleos essenciais são utilizados em diferentes seguimentos industriais (farmacêutico, de alimentos e de cosméticos) e compreendem misturas complexas de compostos voláteis (principalmente compostos terpênicos) extraídos das glândulas secretoras de diferentes partes das plantas, como folhas e flores. A classificação dos compostos terpênicos é feita de acordo com o número de carbonos de suas moléculas: isoprenos ou hemiterpenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C); diterpenos (20C); sesterpenos (25C); triterpenos (30C); tetraterpenos (40C) e polisoprenóides (nC). Os métodos de extração mais comumente utilizados para a obtenção desses óleos essenciais são a destilação, compressão e extração com solventes. Desses métodos, destaca-se o processo de destilação conhecido como hidrodestilação ou destilação por arraste de vapor. Esse método consiste na imersão do material vegetal em água fervente, resultando na formação de vapores de água que carregam os compostos voláteis do óleo essencial. Após condensação, esses compostos se separam da fase aquosa por decantação. Para o desenvolvimento dessa técnica é frequente o uso do aparelho de Clevenger. O processo é de baixo custo e oferece grande praticidade (PRINS, 2006).

Na *Baccharis trimera*, os estudos sobre os componentes do seu óleo essencial são bem menos abundantes do que os estudos sobre, por exemplo, a fração flavonoide. Em comparação com outros grupos de substâncias podemos dizer que esses compostos terpênicos têm sido relativamente negligenciados, apesar de alguns possuírem ação farmacológica cientificamente comprovada e, também, potencial tóxico. A carqueja amarga (*Baccharis trimera*) possui vários compostos terpênicos bioativos em seu óleo essencial:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, palustrol, ledol, nerolidol, espatulenol, carquejol, acetato de carquejila, dentre outros (AMARAL *et al.*, 2010). O espatulenol, por exemplo, possui ação citotóxica e bactericida (LIMBERGER *et al.*, 2004). O  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno também possuem ação bactericida (MOOKDASANIT *et al.*, 2003). O carquejol, administrado em ratos de forma intraperitoneal, foi capaz de reduzir os níveis de colesterol sanguíneo de 5 – 10% (ABREU, 1994). Além disso, esse composto (carquejol) e seu éster (acetato de carquejila) também são considerados marcadores químicos importantes da *Baccharis trimera* (SILVA *et al.*, 2013).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho foi verificar a influência da ingestão do óleo essencial de carqueja amarga (*Baccharis trimera*) sobre o metabolismo de ratos diabéticos, sobretudo no controle glicêmico e no perfil lipídico.

Como objetivos específicos, o presente estudo buscou:

(1) Adquirir óleo comercial de carqueja amarga para o desenvolvimento do estudo;

(2) avaliar a toxicidade desse óleo comercial;

(3) induzir ratos Wistar à diabetes tipo 2 com dieta hiperlipídica/hipercalórica e pequena dose de estreptozotocina;

(4) monitorar a glicemia de jejum, hemoglobina glicada (HbA1c), perfil lipídico (triglicérides, colesterol total, HDL e LDL colesterol) e insulinemia dos grupos controle e teste.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1 Aprovação da pesquisa**

O presente estudo foi realizado após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO (código de registro - CEUA-UNIRIO/2012014-2).

### **3.2 Animais**

Foram adquiridos 20 ratos Wistar machos de 2 meses de idade, oriundos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP).

Os animais passaram por uma semana de adaptação, onde foram mantidos em caixas plásticas (máximo 3 animais por caixa) no biotério do departamento de Ciências Fisiológicas da UNIRIO. As luzes eram mantidas acesas durante o período diurno e apagadas durante o período noturno (12h/12h), para evitar alterações do ciclo circadiano. A temperatura do ambiente foi mantida a 24°C.

### **3.3 Rações**

Dois tipos de ração foram ofertados aos ratos, de acordo com o grupo a que pertenciam. A ração, aqui chamada de normal (RN), era da marca NUVILAB® ALIMENTO COMPLETO e foi obtida da empresa QUIMTIA S.A. (Paraná, Brasil). A ração hipercalórica/hiperlipídica (RHH) foi produzida, com base no método apresentado por Estadella et al. (2011), no laboratório LACAPA/UNIRIO durante o desenvolvimento do trabalho de conclusão de curso da aluna Andressa Monteiro Terra (curso de graduação em biomedicina).

Para o preparo da RHH foram utilizados os seguintes ingredientes: RN, chocolate ao leite SICA0 do grupo Barry Callebaut (MG, Brasil), amendoim sem pele e sem sal da empresa Nova Geração Comestíveis Ltda (Casas Pedro) (R.J., Brasil) e biscoito Maizena® da Indústria de Produtos Alimentícios Piraque S.A. (Piraquê) (R.J., Brasil); esses alimentos foram misturados na proporção de 3:2:2:1 (m/m), utilizando água potável (1,5 L para cada 3,0 Kg de mistura) para auxiliar o processo. A ração foi moldada e colocada em estufa a 200°C durante 24 horas para secagem.

Com base nas informações disponíveis em seu rótulo, foi possível estabelecer a composição centesimal da RN. A composição centesimal da RHH foi estimada com o auxílio de tabelas de composição de alimentos. Para o cálculo do valor calórico dessas rações considerou-se que 1 g de carboidrato é capaz de gerar cerca de 4 kcal de energia, 1 g de proteínas produz também cerca de 4 kcal de energia e, por último, que 1 g de lipídios gera cerca de 9 kcal de energia.

### **3.4 Estreptozotocina**

Para a indução da *diabetes mellitus* também foi utilizada, em associação à RHH, a estreptozotocina em tampão citrato (pH = 4,4) na concentração de 35 mg/kg de massa corporal. A estreptozotocina é capaz de provocar a morte das células  $\beta$ -pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001).

### **3.5 Óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera*)**

Os animais foram tratados diariamente por gavagem com uma dose de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera*), diluída em solução aquosa de Tween 80 a 0,01%, correspondente a 20 mg/kg de massa corporal. A dose oferecida aos animais foi estabelecida com base na análise da toxicidade desse óleo, determinada pelo teste da *Artemia salina*. O óleo essencial em questão foi adquirido da empresa LASZLO (LOTE 0814).

### **3.6 Teste de Toxicidade com *Artemia salina***

O teste de toxicidade aguda em *Artemia salina* foi realizado através da metodologia de Meyer *et al.* (1982) adaptada. Uma solução salina (água do mar retirada da praia de Itacoatiara-Niterói-Rio de Janeiro) foi filtrada e usada como meio para a eclosão dos ovos de *Artemia salina*. Os ovos foram colocados por 48 horas na solução salina filtrada para eclodirem. Nesse período, houve aeração constante à temperatura ambiente e iluminação artificial com lâmpada do tipo LED branca. Para a execução do teste, foram separadas 10 larvas de *A. salina* para cada tubo de ensaio. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 100µL das soluções aquosas (microemulsões) do óleo essencial de *Baccharis trimera* em Tween 80 a 0,01% para tubos de ensaio que foram avolumados para 5 mL, com água do mar filtrada. Nessas condições foram testadas seis diferentes concentrações do óleo essencial: 5, 50, 100, 150, 200 e 300 µg/mL. Cada uma dessas concentrações foi testada em triplicata, sendo a contagem dos animais mortos e vivos realizada após 24 horas. O teste foi acompanhado de um controle negativo, somente com água salina, e positivo, com dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ). Foi feita uma curva de mortalidade para o cálculo da  $DL_{50}$ , ou seja, da concentração do óleo essencial capaz de matar 50% da população estudada.

### **3.7 Caracterização do óleo essencial da carqueja**

O óleo essencial de carqueja, obtido comercialmente, foi caracterizado quimicamente por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas durante a execução do trabalho de conclusão de curso da aluna Andressa de Oliveira Costa (Ciências Biológicas), também pertencente ao grupo LACAPA/LEEM (UNIRIO).

### **3.8 Protocolo experimental para avaliação da influência do consumo do óleo essencial de carqueja sobre o metabolismo de ratos diabéticos**

O protocolo experimental usado para induzir a DM2 havia sido elaborado previamente pelo grupo LACAPA/LEEM (UNIRIO), sendo assim foi o protocolo escolhido para o desenvolvimento deste estudo.

Foram adquiridos vinte ratos *Wistar* com dois meses de idade. Esses ratos foram aleatoriamente divididos em 4 grupos de 5 indivíduos (Grupo 1 (NDV) = controle não diabético + veículo para o óleo essencial (Tween 0,01% em água); Grupo 2 (NDO) = controle não diabético + óleo essencial; Grupo 3 (DV) = ratos diabéticos + veículo para o óleo essencial; Grupo 4 (DO) = ratos diabéticos + óleo essencial). Durante uma semana os animais passaram por um período de adaptação e, posteriormente, foi realizado o procedimento de indução da DM2 experimental com RHH (3 semanas), seguida da administração de pequena dose de estreptozotocina (35mg/Kg de peso corporal).

A glicemia dos animais foi monitorada semanalmente. Água e a ração foram oferecidas *ad libitum* e o óleo essencial (20 mg/kg de massa corporal) ou seu veículo foram administrados diariamente por intubação intragástrica (gavagem) sempre no mesmo horário.

Durante os primeiros 21 dias (três semanas), a indução da diabetes foi feita utilizando apenas a alimentação. Nessa situação, os ratos dos grupos 1 e 2 receberam a RN, enquanto os dos grupos 3 e 4 receberam a RHH.

A segunda fase de indução da diabetes foi iniciada no 22º dia, quando os ratos dos grupos 3 e 4 receberam, por via intraperitoneal, uma dose de estreptozotocina, de 35mg/Kg de massa corporal (SZKUDELSKI, 2001). Essa fase teve duração de duas semanas, e a alimentação dos ratos foi mantida como estabelecido na fase 1.

A partir da sexta semana, 36º dia, ambos os grupos passaram a ser alimentados com a RN durante as três semanas seguintes, até o término do experimento. O tratamento com o óleo essencial ocorreu nessa fase.

O experimento teve duração total de oito semanas. Após esse período, os animais sofreram eutanásia (por deslocamento da cervical) e seu sangue foi coletado através de punção cardíaca. Para verificar a influência do óleo no metabolismo dos ratos diabéticos, foram realizadas análises de diversos parâmetros bioquímicos em ambos os grupos.

### **3.9 Análises bioquímicas**

Os parâmetros bioquímicos analisados foram, glicemia de jejum (1), hemoglobina glicada (HbA1c) (2), perfil lipídico (triglicerídeos (3), colesterol total (4), HDL-colesterol (5) e LDL-colesterol (6) e insulinemia de jejum (7). Os parâmetros 1, 3, 4 e 5 foram testados com os kits da marca Labtest Diagnóstica S.A. (M.G., Brasil); o parâmetro 2 com kits da marca Katal Biotecnologia Indústria e Comércio Ltda; o parâmetro 6 utilizando kits da empresa Química Básica Ltda (Bioclin) e o parâmetro 7 com o kit da Millipore Indústria e Comércio Ltda, seguindo sempre as instruções estabelecidas pelo fabricante.

### **3.10 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Graph Pad Prism 6.0. Os dados de glicemia dos animais passaram por uma análise de variância agrupada (two-way ANOVA), com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos.

Os dados obtidos pela avaliação dos demais parâmetros foram submetidos à análise de variância do tipo one-way ANOVA, empregando também o pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 Caracterização do óleo essencial de carqueja amarga (*Baccharis trimera*)**

O óleo essencial de carqueja amarga utilizado no presente estudo foi adquirido da empresa Laszlo. Esse óleo foi caracterizado quimicamente e sua autenticidade foi comprovada durante o desenvolvimento do trabalho de conclusão de curso da aluna Andressa de Oliveira Costa. Ambos os marcadores químicos dessa espécie de carqueja foram identificados nesse óleo essencial comercial [carquejol ( $0,18 \pm 0,01$ )% e acetato de carquejila ( $49,40 \pm 2,40$ )%], o que garantiu sua autenticidade. Além do acetato de carquejila, os compostos químicos encontrados em maior concentração nesse óleo comercial foram o espatulenol [( $8,03 \pm 0,20$ )%], o  $\beta$ -elemeno [( $4,64 \pm 0,04$ )%] e o  $\beta$ -copaeno [( $3,91 \pm 0,47$ )%].

## **4.2 Avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de carqueja amarga**

Os resultados do teste de toxicidade em *Artemia salina* indicaram que a DL50 do óleo essencial de carqueja amarga diluído em solução aquosa de Tween 80 a 0,01% era de  $(43,4 \pm 17,1)$  ppm. Esse valor inferior a 200 ppm indica que esse óleo essencial pode ser considerado citotóxico (LIMA *et al.*, 2014). Com base nessas informações, decidiu-se que os ratos seriam tratados com uma dose diária de óleo essencial de 20mg/kg de massa corporal.

## **4.3 Avaliação centesimal da RN e RHH**

Conforme explicitado, a RHH foi produzida e caracterizada durante o desenvolvimento do trabalho de conclusão de curso (Biomedicina) da aluna Andressa Monteiro Terra. A composição centesimal da RHH mostrou-se diferente da RN, principalmente com relação ao seu conteúdo de lipídios. O teor de lipídios da RHH  $[(25,75 \pm 1,11) /100g$  de amostra (base seca)] era 12 vezes superior ao da RN  $[(2,12 \pm 0,08)g/100g$  de amostra (base seca)]. O valor calórico da RHH  $[(512,55 \pm 17,16)kcal/100$  g de ração (base seca)] foi 1,7 vez maior do que o calculado para a RN  $[(294,88 \pm 1,10) kcal/100$  g de ração (base seca)]. Com base nesses dados, a RHH produzida e utilizada para a indução da DM2 nos ratos realmente pôde ser classificada como hiperlipídica/hipercalórica.

## **4.4 Influência do consumo do óleo essencial de carqueja amarga sobre o metabolismo de ratos diabéticos**

### **4.4.1 Glicemia**

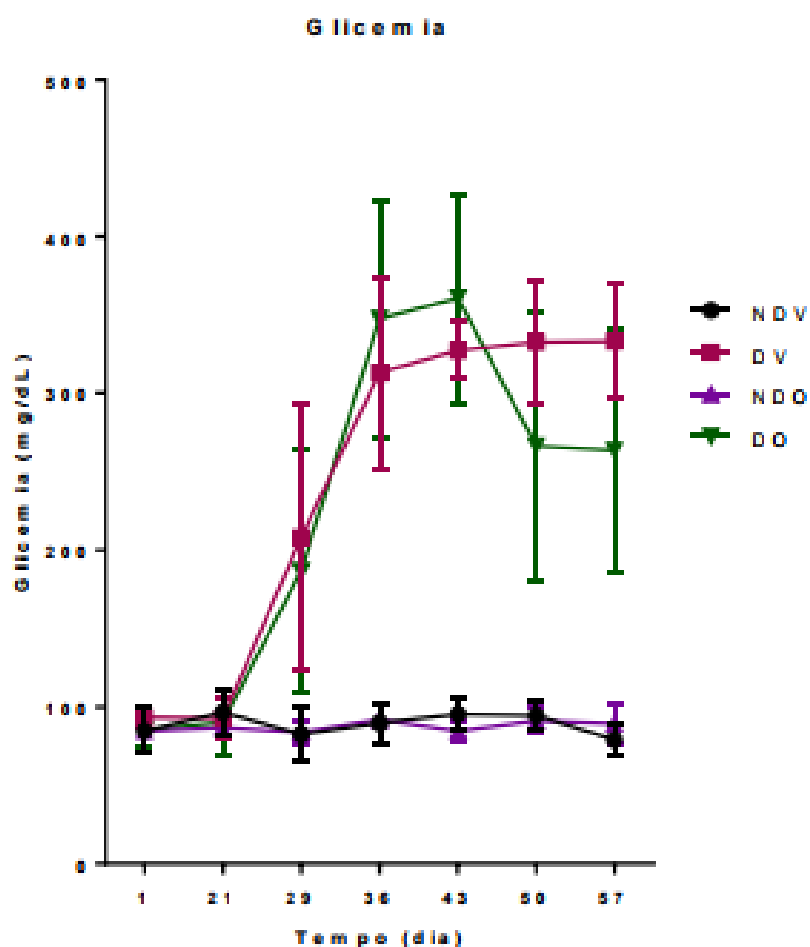
Durante as três primeiras semanas do estudo, os ratos dos grupos controles não diabéticos (NDO e NDV) receberam a RN, enquanto que os ratos dos grupos diabéticos (DO e DV) receberam a RHH produzida em nosso laboratório. Nesse período de 21 dias, a glicemia de jejum média dos quatro grupos permaneceu praticamente inalterada (Gráfico 1), não havendo diferença estatística entre esses grupos com relação a esse parâmetro ( $p > 0,05$ ). O fornecimento da RHH de forma isolada durante o período de 3 semanas não foi capaz de provocar a hiperglicemia crônica característica da DM2. Esse resultado é corroborado por estudos anteriores, que demonstraram que ratos *Sprague-Dawley* alimentados com dieta rica em gordura



podem desenvolver obesidade, hiperinsulinemia e resistência à insulina, mas não costumam desenvolver hiperglicemia significativa (SRINIVASAN *et al.*, 2005; MU *et al.*, 2006).

No vigésimo segundo dia do estudo, os animais dos grupos DV e DO receberam dose única de estreptozotocina (aplicação intraperitoneal) na concentração de 35 mg/kg de massa corporal. A partir desse momento, a glicemia desses ratos começou a se elevar (Gráfico 1). Uma semana depois já era possível observar diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) na glicemia de jejum entre esses grupos diabéticos (DV e DO) e os não diabéticos (NDV e NDO). A glicemia de jejum dos ratos do grupo DO e DV aumentou mais na semana seguinte, diferenciando-se de forma mais marcante ( $p < 0,0001$ ) daquela observada nos ratos dos grupos NDO e NDV. Foi demonstrado por MU e colaboradores (2006) que uma dose única isolada de estreptozotocina em baixa concentração não era capaz de causar hiperglicemia nos ratos. Sendo assim, a RHH deve ter causado a sensibilização do organismo dos ratos DO e DV, desencadeando a resistência à insulina. A combinação dessa sensibilização por RHH com uma possível diminuição da capacidade produtora e secretora de insulina do pâncreas, provocada pela estreptozotocina, levou os ratos DO e DV a um quadro de hiperglicemia. Nesse período de duas semanas pós-estreptozotocina, os ratos dos grupos DO e DV continuaram a ser alimentados com RHH.

Nas três últimas semanas do experimento, a partir do 36º dia, todos os animais (grupos 1, 2, 3 e 4) passaram a ser alimentados com RN. Nesse período, a glicemia dos ratos não diabéticos se manteve praticamente constante e não foi possível observar diferença estatística significativa entre os grupos NDV e NDO, indicando que o óleo essencial de carqueja não foi capaz de interferir na glicemia desses animais em condição não patológica. No caso dos animais diabéticos, comparando os grupos DV e DO, foi possível observar uma tendência de diminuição da glicemia nas duas últimas semanas do experimento nos animais tratados com o óleo essencial de carqueja. Entretanto, essa tendência não se reverteu em diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre esses grupos. Essa diferença estatística significativa talvez pudesse ter sido atingida se o trabalho tivesse sido desenvolvido com um  $n$  amostral maior para cada grupo e por um período de tratamento mais prolongado (superior a 3 semanas).

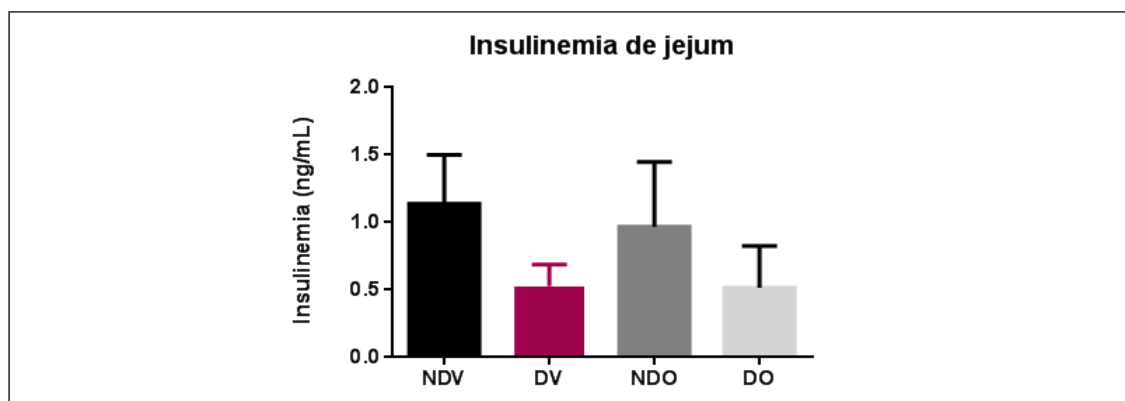


**Gráfico 1** - Glicemia dos ratos monitorada durante todo o desenvolvimento do protocolo experimental. NDV – grupo não diabético + veículo; DV – grupo diabético + veículo; NDO – grupo não diabético + óleo; DO – grupo diabético + óleo. Análise estatística realizada através de análise de variância agrupada (two-way ANOVA), com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos.

#### 4.4.2 Insulinemia

Ao final do experimento, a insulinemia em jejum dos animais também foi monitorada (Gráfico 2). Não houve diferença estatística significativa entre os quatro grupos com relação a esse parâmetro ( $p > 0,05$ ), mas é possível perceber uma tendência de diminuição da insulinemia nos grupos diabéticos em relação aos grupos não diabéticos. Essa condição foi suficiente para promover o desenvolvimento, a partir do 22º dia do experimento, da hiperglicemia característica da diabetes nos grupos DV e DO. Ao compararmos os dados de insulinemia dos grupos NDV e NDO e, também, dos grupos DV e DO, percebemos que o óleo essencial de carqueja amarga não foi

capaz de interferir na capacidade produtora e secretora de insulina desses animais, independente deles estarem em condição patológica ou não.

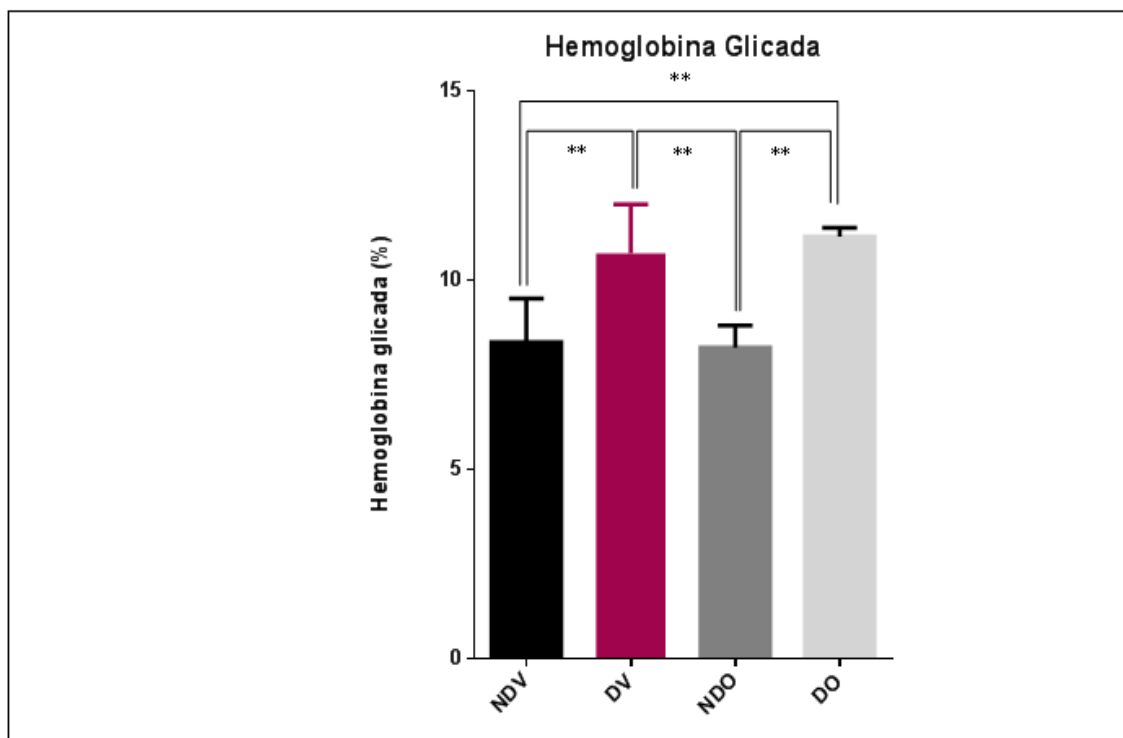


**Gráfico 2:** Insulinemia de jejum determinada após eutanásia dos animais. NDV – grupo não diabético + veículo; DV – grupo diabético + veículo; NDO – grupo não diabético + óleo; DO – grupo diabético + óleo. Análise estatística realizada através de análise de variância one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos.

#### 4.4.3 Hemoglobina glicada

A hiperglicemia crônica promove o aumento da glicação de proteínas e, com base nesse princípio, é comum que se avalie o teor de hemoglobina glicada de indivíduos diabéticos para que se possa verificar se o controle glicêmico foi apropriado por um período de tempo mais longo.

Analisando o Gráfico 3, percebe-se que a taxa de glicação da hemoglobina foi estatisticamente maior ( $p < 0,01$ ) nos grupos diabéticos do que nos grupos controles não diabéticos, mesmo com uma exposição de apenas três semanas à supracitada condição de hiperglicemia. Como esperado, por conta dos resultados já discutidos no item 4.4.1, o óleo essencial de carqueja não teve interferência sobre a taxa de glicação da hemoglobina, independente dos animais estarem em estado patológico ou não.



**Gráfico 3:** Hemoglobina determinada após eutanásia dos animais. NDV – grupo não diabético + veículo; DV – grupo diabético + veículo; NDO – grupo não diabético + óleo; DO – grupo diabético + óleo. Análise estatística realizada através de análise de variância one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos. \*\* -  $p < 0,01$ .

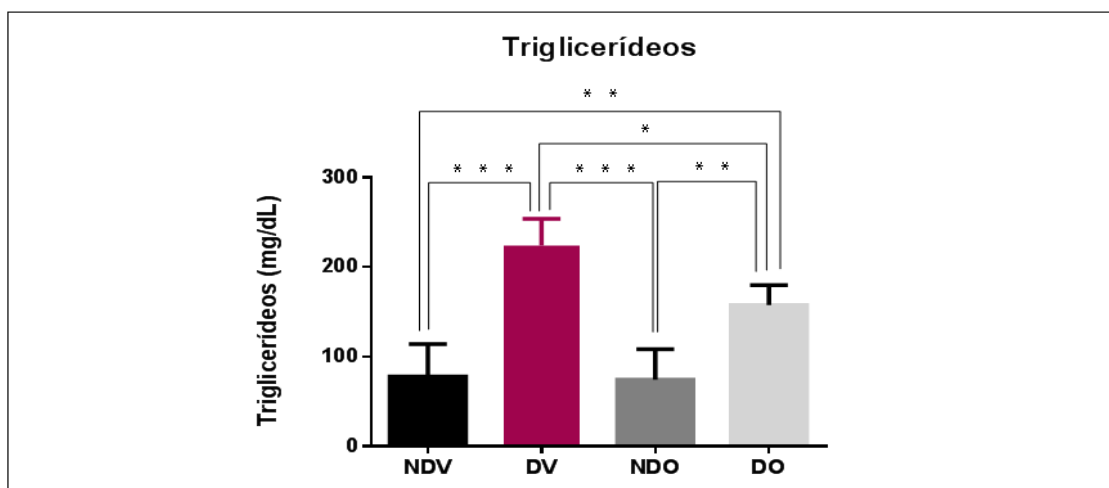
#### 4.4.4 Perfil lipídico

Quando o assunto é diabetes tipo 2 é importante ressaltar que além do controle glicêmico, o controle lipídico é de suma importância. A diabetes é considerada fator de risco para doenças cardiovasculares, por causar a chamada dislipidemia aterogênica, que consiste no aumento da LDL-colesterol e dos triglicerídeos, acompanhado da redução nos níveis de HDL-colesterol. Essas alterações favorecem a aterosclerose, que por sua vez compromete a circulação e o aporte sanguíneo para os tecidos.

Os ratos diabéticos (DV e DO) apresentaram anormalidades no metabolismo de lipídios evidenciadas, principalmente, pelo aumento estatisticamente significativo dos níveis plasmáticos de triglicerídeos em relação aos ratos não diabéticos (NDV e NDO) (Gráfico 4). Essa hipertrigliceridemia medida em jejum pode ser explicada pelo provável aumento do estoque de triglicerídeos no fígado associado à estimulação da

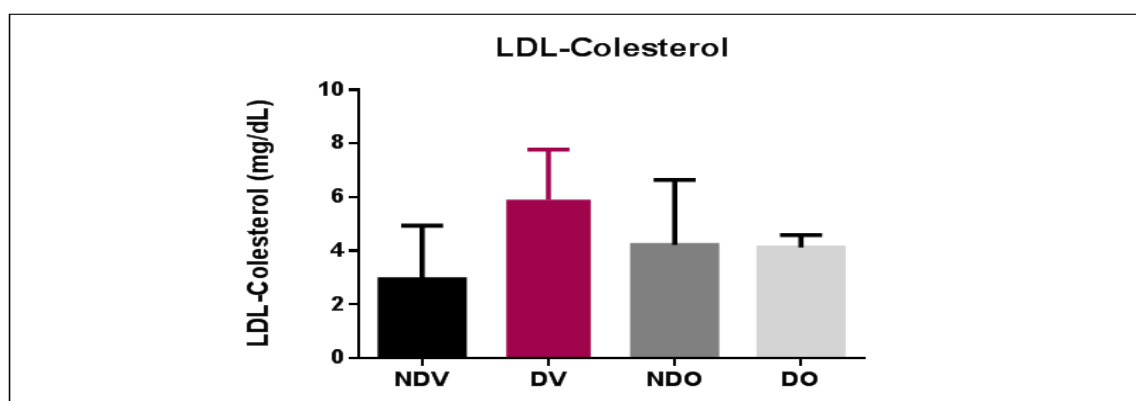
lipogênese *de novo* (com produção de ácidos graxos livres) a partir da glicose absorvida. Esse efeito lipogênico pode ser explicado pela alta concentração de insulina no sangue (hiperinsulinemia) relacionada à resistência à insulina. A RHH usada no presente estudo pode ter favorecido esse processo, uma vez que possuía um conteúdo de carboidratos [(52,38 ± 1,5) g/100 g de amostra (base seca)] superior ao de rações hiperlipídicas/hipercalóricas normalmente usadas em outros estudos (SRINIVASAN et al., 2005; CORREIA-SANTOS et al., 2012) e, também, superior ao da RN [(45,94 ± 0,70) g/100 g de amostra (base seca)] que utilizamos. O aumento da produção de VLDL pelo fígado a partir dos ácidos graxos liberados dos adipócitos, por conta da lipólise aumentada nesse tecido, também pode contribuir para essa hipertrigliceridemia. Por último, essa hipertrigliceridemia também pode ser correlacionada a uma maior absorção de ácidos graxos e formação aumentada de triglicerídeos no intestino (transportados na forma de quilomícrons), durante o período de ingestão da dieta rica em lipídios.

O óleo essencial de carqueja amarga conseguiu reduzir a hipertrigliceridemia observada nos ratos diabéticos de forma estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Isso fica evidente aos compararmos a trigliceridemia do grupo DV com a do grupo DO. Esse óleo, entretanto, não interferiu na trigliceridemia dos animais em condição não patológica, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos NDV e NDO com relação a esse parâmetro. O acetato de carquejila representou cerca de 50% do conteúdo do óleo essencial de carqueja testado nesse estudo. Esse composto é derivado do carquejol, sendo produzido pela esterificação desse álcool com o ácido acético. Conforme mencionado, o carquejol (administrado em ratos de forma intraperitoneal) foi capaz de reduzir os níveis de colesterol sanguíneo de 5 – 10% (ABREU, 1994). Dessa forma, seria interessante testar posteriormente a ação do acetato de carquejila isolado ou do próprio carquejol isolado, nesse tipo de modelo, para verificar se esse efeito anti-hipertrigliceridêmico se repetiria. A ideia de testar também o carquejol isolado é reforçada pela possível formação desse composto a partir do acetato de carquejila por ação de esterases presentes na corrente sanguínea.

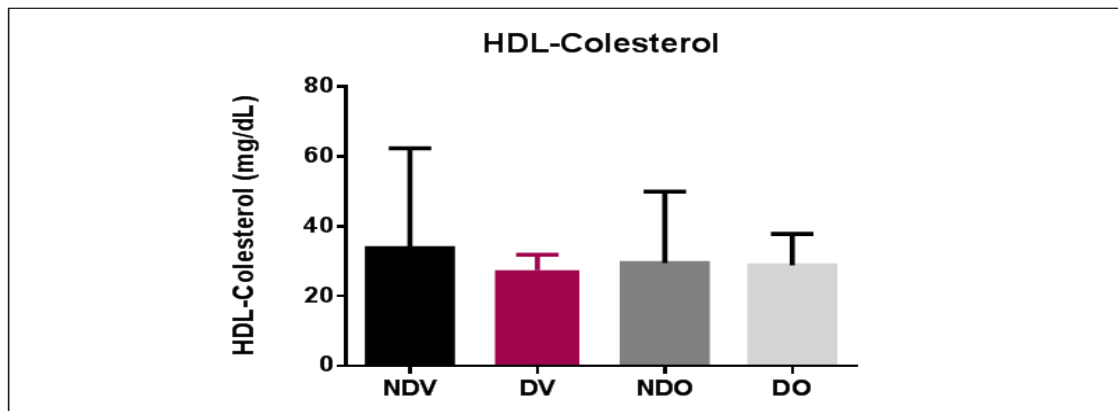


**Gráfico 4:** Triglicerídeos determinados após eutanásia dos animais. NDV – grupo não diabético + veículo; DV – grupo diabético + veículo; NDO – grupo não diabético + óleo; DO – grupo diabético + óleo. Análise estatística realizada através de análise de variância one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos. \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $0,001$ .

O aumento da VLDL pode ser associado a um aumento de LDL, visto que a VLDL é a lipoproteína precursora da LDL. Esse aumento da VLDL também poderia favorecer a geração da HDL2 (contém triglicerídeo e colesterol esterificado), forma prontamente captada pelo fígado, o que poderia levar à diminuição dessa lipoproteína no plasma dos ratos diabéticos. Entretanto, não foi possível observar diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) entre os quatro grupos estudados com relação aos níveis plasmáticos de LDL-colesterol e HDL-colesterol (Gráficos 5 e 6).

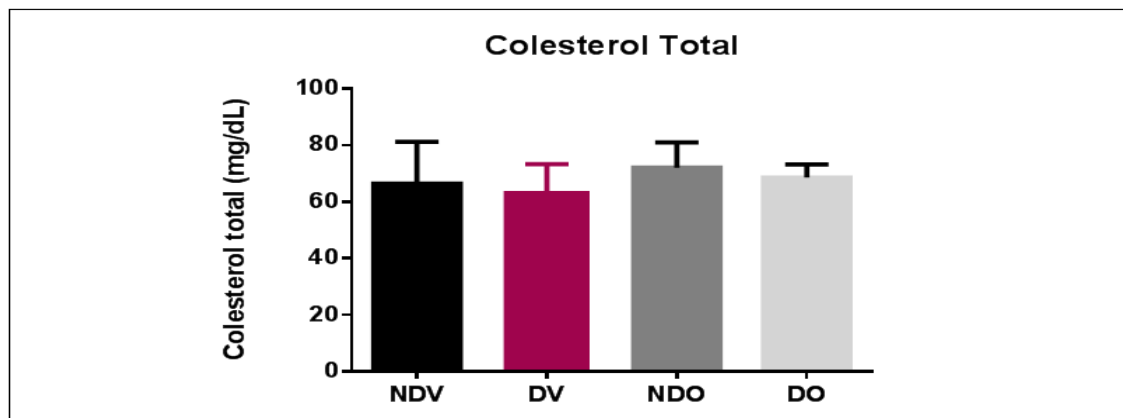


**Gráfico 5:** LDL-colesterol determinado após eutanásia dos animais. NDV – grupo não diabético + veículo; DV – grupo diabético + veículo; NDO – grupo não diabético + óleo; DO – grupo diabético + óleo. Análise estatística realizada através de análise de variância one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos.



**Gráfico 6:** HDL-colesterol determinado após eutanásia dos animais. NDV – grupo não diabético + veículo; DV – grupo diabético + veículo; NDO – grupo não diabético + óleo; DO – grupo diabético + óleo. Análise estatística realizada através de análise de variância one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos.

Os níveis sanguíneos de colesterol total também não diferiram de forma estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos (Gráfico 7). Nesse tipo de estudo, o desenvolvimento de hipercolesterolemia poderia ser associado, por exemplo, a uma absorção do colesterol aumentada no intestino delgado, depois da ingestão de uma dieta rica em lipídios. Apesar da dieta usada nesse estudo ser hiperlipídica, a quantidade de lipídios usada mostrou-se menor do que a de outros estudos similares (SRINIVASAN et al., 2005; CORREIA-SANTOS et al., 2012). Além disso, também deve haver diferença qualitativa entre essas frações lipídicas, visto que normalmente se usa banha de porco (rica em colesterol) para a montagem das mesmas (SRINIVASAN et al., 2005; CORREIA-SANTOS et al., 2012). A fração lipídica da RHH utilizada no presente estudo foi constituída pelos lipídios componentes dos diferentes alimentos que usamos em sua confecção. O amendoim contido em nossa ração, por exemplo, é um alimento rico em ácidos graxos mono- e poli-insaturados e não possui colesterol. Dessa forma, sua ingestão costuma ser benéfica para a manutenção de uma boa relação entre os níveis de HDL e LDL e, também, para redução do colesterol total. Isso poderia explicar, pelo menos em parte, os dados obtidos para o perfil lipídico dos ratos no presente estudo.



**Gráfico 7:** Colesterol total determinado após eutanásia dos animais. NDV – grupo não diabético + veículo; DV – grupo diabético + veículo; NDO – grupo não diabético + óleo; DO – grupo diabético + óleo. Análise estatística realizada através de análise de variância one-way ANOVA, com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações entre os grupos.

## 5. CONCLUSÃO

A toxicidade do óleo essencial de carqueja amarga foi avaliada pela primeira vez através do bioensaio com *Artemia salina*. O óleo avaliado mostrou-se citotóxico, apresentando uma  $DL_{50}$  de  $(43,4 \pm 17,1)$  ppm. Dessa forma, os testes *in vivo* da capacidade fitoterápica desse óleo essencial devem ser realizados em concentrações inferiores à indicada acima.

Com o modelo de indução de DM2 empregado, os ratos diabéticos desenvolveram uma hiperglicemia marcante, que provocou uma taxa de glicação de hemoglobinas elevada em relação aos grupos controles não diabéticos. Os ratos diabéticos também desenvolveram uma dislipidemia caracterizada principalmente pela hipertrigliceridemia.

Embora o principal alvo terapêutico de fármacos relacionados à diabetes seja o controle glicêmico, manter o controle lipídico também é fundamental para um bom controle metabólico. Nesse contexto, o óleo essencial de carqueja (*Baccharis Trimeria*) mostrou potencial para ser usado como uma alternativa para o controle da hipertrigliceridemia diabética.

O aumento do número de indivíduos (ratos) em cada grupo em estudo e um tratamento mais prolongado (superior a três semanas) podem produzir um conjunto



de dados mais robusto. Essas ações poderiam reforçar a capacidade hipotrigliceridêmica já observada para esse óleo essencial e, talvez, pudessem esclarecer definitivamente se esse óleo também tem efeito hipoglicemiante nos animais diabéticos. Por último, seria interessante monitorar alguns parâmetros bioquímicos (p. ex.: enzimas hepáticas, albumina, uréia, creatinina) que permitissem avaliar o grau de nocividade desse óleo essencial ao fígado e aos rins.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ABREU, M. F. J. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Fortaleza, Brasil: Edições UFC, 1994.

ALAM, R.; KUMAR, M. V.; VERMA, P. Glycated Hemoglobin as a Dual Biomarker in Type 2 Diabetes Mellitus Predicting Glycemic Control and Dyslipidemia Risk. **International Journal of Life-Sciences Scientific Research (IJLSSR)**, Volume 1, Issue 2. 2015. 62-65.

AHMED, A. M. History of diabetes mellitus. **Saudi Med J** 23: 373–378, 2002.

AMARAL, A. S.; RADÜNZ, L. L.; MOSSI, A. J.; SANTI, A.; DA ROSA, N. M. F. F., FEITEN, F. Rendimento de matéria seca e de óleo essencial de *Baccharis trimera* com adubação química e orgânica **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.9, n.1, p. 20-28, 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA. **Classification and Diagnosis of Diabetes**. Diabetes Care, Volume 40. 2017.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. K. **Bioquímica Médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

BELTRAME, F. L. et al. Avaliação da qualidade das amostras comerciais de *Baccharis trimera* L. (Carqueja) vendidas no Estado do Paraná. **Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal**, v. 31, n. 1, p. 37 – 43, 2009.

BORGES, K. B.; BAUTISTA, H. B.; GUILERA, S. DIABETES – UTILIZAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS COMO FORMA OPCIONAL DE TRATAMENTO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 12 – 20, 11 2008.

BOURET, S.; LEVIN, B. E.; OZANNE, S. E. Gene-Environment Interactions Controlling Energy and Glucose Homeostasis and the Developmental Origins of Obesity. **Physiological Reviews**. 2015. 95(1): 47-82.

CAIO JÚNIOR, João Santos; CAIO, Henriqueta Verlangieri. **OBESIDADE E MENOPAUSA**. 2016. Disponível em:

<<https://crescimentoinfoco.wordpress.com/page/19/>>. Acesso em: 08 jun. 2018.

CAIO JÚNIOR, João Santos. **OBESIDADE, HOJE CLARAMENTE ACEITA COMO UM ÓRGÃO COMPLEXO, COM DIVERSAS FUNÇÕES INQUESTIONÁVEIS**. 2017.

Disponível em: <<https://crescimentoinfoco.wordpress.com/2017/02/page/2/>>. Acesso em: 08 jun. 2018.

CARVALHO, C. X. de. **ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMA POST-MORTEM DE CÉREBRO DE *Mus musculus* SUBMETIDOS AOS DIFERENTES TIPOS DE EUTANÁSIA PRECONIZADOS PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL**.

2017. 60 p. Tese (Doutorado em ciências da saúde) — UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.

CHACÍN, Y. J. F.; et al. Constituyentes químicos de las hierbas y especias: Efectos sobre la salud humana. **Revista científica UDO agrícola**, v. 13, n.1, p. 1-16, 2013.

CORREIA-SANTOS, André M. et al. Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratas wistar. **Revista de Medicina: Ribeirão Preto (USP)**, Ribeirão Preto, v. 4, n. 45, p.436-444, ago. 2012.

CROWELL, P. L. Prevenção e Terapia do Câncer por Monoterpenos Dietéticos, **The Journal of Nutrition**, Volume 129, Edição 3, 1 de março de 1999, páginas 775S-778S. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/jn/129.3.775S>>.

DE GODOY-MATOS, A. F. **Síndrome Metabólica**. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto,

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A.; MARCÍLIO, R. **Bioquímica do Diabetes Melito**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2011.

**DIRETRIZES da Sociedade Brasileira de Diabetes** 2017-2018. Editora Clannad, São Paulo, p. 11 – 383, 2017.

DOOL, H. van Den; KRATZ, P. Dec.. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 11, p.463-471, jan. 1963. Elsevier BV. <[http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x)>.

ESTADELLA D. et al. A palatable hyperlipidic diet causes obesity and affects brain glucose metabolism in rats. **Lipids Health Dis.** 2011.

FERREIRA, V. A.; CAMPOS, S. M. B. de. AVANÇOS FARMACOLÓGICOS NO TRATAMENTO DO DIABETES TIPO 2. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 3, p. 72 – 78, set./nov. 2014.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica.** 12 ed. Elsevier, 2011.

KHARROUBI, A. T.; DARWISH, H.M. Diabetes Mellitus: The epidemic of the century. **World Journal of Diabetes.** 2015. 850-867.

LEITE, Ana C. et al. Biosynthetic origin of the isoprene units in chromenes of *Piper aduncum* (Piperaceae). **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 18, n. 8, p.1500-1503, 2007. FapUNIFESP (SciELO). <<http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532007000800008>>.

LIMA, C. M. P. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato das cascas de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr. **Rev. bras. plantas med.** 2014, vol.16, n.4, pp.832-838. <[http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/10\\_118](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/10_118)>.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do rio grande do sul. **Quimica Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

MARQUES, O. C. P. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com atividade antioxidante.** 210p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Farmácia) - Departamento de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal. 2008.

MEYER, B. N. *et al.* J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PROGRAMA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS.** Brasília - DF, p. 7 – 137, dezembro 2009.

MITCHEL, Richard N. et al. **FUNDAMENTOS DE PATOLOGIA.** 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 883 p.

MOOKDASANIT, J., TAMURA, H., YOSHIZAWA, T., TOKUNAGA, T. & NAKANISHI, K. Trace Volatile Components in Essential Oil of *Citrus sudachi* by Means of Modified

Solvent Extraction Method. **Food Science Technology Research**, v.9, n. 1 , p.54–61, 2003.

MU, Qiaozhen et al. Development of a global evapotranspiration algorithm based on MODIS and global meteorology data. **Remote Sensing Of Environment**, [s.l.], v. 111, n. 4, p.519-536, dez. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rse.2007.04.015>.

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

OLIVEIRA, A. C. D.; ROPKE, C. D. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos**, v. 10, p. 95 – 219, abril - junho 2016.

PEDROSA, H. C.; VILAR, L.; BOUTON, A. J. M. **Neuropatias e Pé Diabético**. [S.l.]: Grupo Editorial Nacional - GEN, 2014.

PRINS, C. L.; LEMOS, C. S. L.; FREITAS, S. P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.8, n.4, p.92-95, 2006.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 8 ed. São paulo: Elsevier, 2013.

SERRANO, D.; LÓPEZ, M. E.; LÓPEZ, M.; ESPUÑES, S.; ROSARIO, T. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**. 2006. Disponível em :<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57937408>>.

SILVA, D. C. M. N. **DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DE PARÂMETROS DE PROCESSO NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE CARQUEJA (*Baccharis trimera* Less)**. 2004. 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.

SILVA, F. A. **TRATAMENTO DO DIABETES MELLITUS TIPO 2 ATRAVÉS DO USO DE PLANTAS MEDICINAIS**. 2017. 41 p. Monografia (Bacharelado em Farmácia) — FACULDADE DE EDUCAÇÃO E MEIO AMBIENTE.

SILVA, F.; PARK, K. F.; MAGALHÃES, P. M.; MARTINS, G. N.; GAMA, E. V. S. Avaliação do teor de óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em diferentes

embalagens durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.54-58, 2013.

SRINIVASAN, K. et al. Combination of high-fat diet-fed and low -dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological Research**, Volume 52. 2005. 52: 313-320.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS GERAIS DAS PLANTAS MEDICINAIS. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, p. 74 – 77, 2005.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiol. Res**, v. 50, p. 536 – 546, 2001.

TSCHIEDEL, B. **A História do Diabetes**. 2010. Disponível em: <<https://www.endocrino.org.br/historia-do-diabetes/>>.

VALENSI, P. et al. Atherogenic dyslipidemia and risk of silent coronary artery disease in asymptomatic patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. **Cardiovascular Diabetology**, Volume 15. 2016. 15: 104-114.

## 7. ANEXOS

**Tabela 1** – Insulinemia de jejum determinada após eutanásia dos animais

Grupos	Insulinemia (ng/mL) (Med ± DP)
<b>NDV</b>	1,138 ± 0,3621
<b>DV</b>	0,5275 ± 0,1604
<b>NDO</b>	0,9680 ± 0,4808
<b>DO</b>	0,5154 ± 0,3084

NDV – grupo não diabético + veículo; DV – grupo diabético + veículo; NDO – grupo não diabético + óleo; DO – grupo diabético + óleo; Med – média; DP – desvio padrão

**Tabela 2** – Hemoglobina glicada de jejum determinada após eutanásia dos animais

Grupos	Hemoglobina glicada (%) (Med ± DP)
<b>NDV</b>	8,368 ± 1,150
<b>DV</b>	10,71 ± 1,295
<b>NDO</b>	8,218 ± 0,5892
<b>DO</b>	11,16 ± 0,2367

NDV – grupo não diabético + veículo; DV – grupo diabético + veículo; NDO – grupo não diabético + óleo; DO – grupo diabético + óleo; Med – média; DP – desvio padrão

**Tabela 3** – Colesterol total, triglicerídeos, HDL-colesterol e LDL-colesterol plasmáticos de jejum determinados após eutanásia dos animais

Grupos	Colesterol total (mg/dL) (Med ± DP)	Triglicerídeos (mg/dL) (Med ± DP)	HDL (mg/dL) (Med ± DP)	LDL (mg/dL) (Med ± DP)
<b>NDV</b>	66,44± 14,78	77,86± 36,39	33,78± 28,59	2,940± 1,998
<b>DV</b>	63,90± 9,512	224,1± 29,69	27,53± 4,363	5,900± 1,867
<b>NDO</b>	72,15± 8,881	74,33± 34,02	29,50± 20,46	4,225± 2,410
<b>DO</b>	68,67± 4,509	157,6± 22,23	28,84± 8,981	4,120± 0,4712

NDV – grupo não diabético + veículo; DV – grupo diabético + veículo; NDO – grupo não diabético + óleo; DO – grupo diabético + óleo; Med – média; DP – desvio padrão