



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

ALANNE LUCENA DE BRITO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA, DE DOSES REPETIDAS E DO
POTENCIAL ANTIDIABÉTICO, ANTI-HIPERGLICEMIANTE E ANTIOXIDANTE DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *BAUHINIA CHEILANTHA* BONG.**

RECIFE-PE

2021

ALANNE LUCENA DE BRITO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA, DE DOSES REPETIDAS E DO
POTENCIAL ANTIDIABÉTICO, ANTI-HIPERGLICEMIANTE E ANTIOXIDANTE DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *BAUHINIA CHEILANTHA* BONG.**

Defesa de Doutorado apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira

RECIFE-PE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Brito, Alanne Lucena de

Avaliação da toxicidade oral aguda, de doses repetidas e do potencial antidiabético, anti-hiperglicemiante e antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Bauhinia cheilantha* Bong. / Alanne Lucena de Brito– 2021.

135 f. : il., fig., tab.

Orientador: Eduardo Carvalho Lira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Plantas medicinais 2. Testes de toxicidade 3. Diabetes I. Lira, Eduardo Carvalho (orient.) II. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -227

ALANNE LUCENA DE BRITO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA, DE DOSES REPETIDAS E DO
POTENCIAL ANTIDIABÉTICO, ANTI-HIPERGLICEMIANTE E ANTIOXIDANTE DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *BAUHINIA CHEILANTHA* BONG.**

Defesa de Doutorado apresentado como um dos
requisitos para o cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título de Doutor
em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Area de concentração: Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 03 de Dezembro 2021.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Prof. Dr. Renan Oliveira Silva Damasceno (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Prof.^a Dr.^a Amanda Martins Baviera (Examinador Externo)
Universidade Estadual Paulista-UNESP Araraquara

Profa. Dra. Lúgia Cristina Monteiro Galindo (Examinadora Externo)
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

AGRADECIMENTOS

A família e amigos.

Aos meus queridos e amados pais, Painho e Mainha, pelo total apoio em minhas escolhas e decisões, pelo amor, carinho, cobranças e ensinamentos que me ajudaram a ser quem sou e onde estou hoje. Serei eternamente grato por vossa dedicação e de abdições em momentos de suas vidas para tornar a vida de seus filhos melhor. Vocês estarão sempre à frente de minhas conquistas. Os amarei eternamente.

Aos meus irmãos Aline, Patriky e Horberlan, por todo apoio, amor e dedicação oferecidos a mim, que apesar da distância e de nossas vidas corridas sempre se fizeram presente. Obrigado pelo total apoio, incentivo e por acreditar em meu potencial nessa minha longa jornada.

Ao meu companheiro de vida, Borja Ruiz, por todo companheirismo, amizade e amor compartilhados, por não me deixar desistir e apoiar em minhas escolhas e decisões, dividindo comigo todas as alegrias e dificuldades que encontrei pelo caminho, sendo meu porto seguro e meu colo nos momentos de fraqueza. Minha eterno “ratiburi” ...

A todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo (LNEM), Dionísio Amaral, Elifrances Oliveira, José Carlos Junior, Alicia Soares, July Ferreira, Hanna Pereira, Carla Tabosa, Eucilene Kélita, Amanda Jordão, Lidiane Lima, e a todos que direta ou indiretamente vocês puderam contribuir para minha formação, e acima de tudo, foram as amizades conquistadas. Um forte abraço!

Ao meu orientador Eduardo Carvalho Lira por todo esforço, dedicação, ética e responsabilidade dedicados a este trabalho, assim como as palavras amigas oferecidas nos momentos mais difíceis.

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Pró-Reitoria Para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ) e a Pró-Reitoria de Planejamento, Orçamento e Finanças (PROPLAN) pelo auxílio financeiro dedicado a presente pesquisa, sem a qual ela não se realizaria.

RESUMO

Bauhinia cheilantha (Lauraceae), é amplamente recomendada para o tratamento de diversas doenças na medicina popular, tais como inflamações, diabetes, gripe, tosse e problemas gastrintestinais. O objetivo desse trabalho foi elaborar uma revisão sistemática da literatura sobre o uso medicinal das espécies do gênero *Bauhinia* no tratamento do DM, assim como caracterizar quimicamente o extrato hidroalcóolico das folhas de *Bauhinia cheilantha* (HaEBcl), avaliar a toxicidade oral aguda e de doses repetidas por 28 dias, atividade antidiabética, antihiperlipemiante e antioxidante do HaEBcl em ratos. A estratégia de inclusão foi estabelecida com SYRCLE *protocol guideline* e avaliados com base ao risco de viés. A revisão sistemática da literatura mostrou o efeito antihiperglicemiante e antidiabético em espécies do gênero *Bauhinia* em roedores. Experimentalmente, os fitoquímicos majoritários do HaEBcl foram determinados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada pelo sequestro de radicais livres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). A toxicidade oral aguda foi avaliada em camundongos fêmeas (n=3 por grupo) tratados com dose única de 300 ou 2.000 mg / kg. A toxicidade oral de doses repetidas por 28 dias foi avaliada em camundongos fêmeas (n=5 por grupo) e machos (n=5 por grupo) tratados com as doses de 300, 1.000 ou 2.000 mg / kg por 28 dias consecutivos. Foram avaliados os níveis séricos dos marcadores de função hepática (transaminases hepáticas) e renais (ureia e creatinina), assim como o perfil hematológico e a histologia hepática e renal. Ratos Wistar machos (200±10g) foram tratados com uma dose única de estreptozotocina (STZ, 40mg/kg, i.v.). Após a confirmação do DM, os animais foram tratados por via oral durante 28 dias com o HaEBcl (150 e 300mg/kg). Foram avaliados parâmetros metabólicos como ganho de massa corporal, ingestão hídrica e alimentar, volume urinário, assim como glicemia pós-prandial, massa do fígado, músculo esquelético e tecido adiposo branco, perfil lipêmico plasmático, transaminases hepáticas, ureia, creatinina e atividade enzimática da superóxido dismutase e catalase hepática e níveis do malondialdeído (MDA), nitrito, glutathiona reduzida e oxidada no fígado. Os fitoquímicos majoritários encontrados no HaEBcl foram principalmente flavonoides (quercetina e afzelina), glicosídeo de kaempferol e glicosídeo de quercetina, assim como o HaEBcl apresentou atividade antioxidante *in vitro*. O HaEBcl não exibiu toxicidade oral aguda, assim como de doses repetidas de 28 dias nas doses avaliadas. O tratamento com HaEBcl melhorou o ganho ponderal e reduziu a polifagia (20%) na maior dose, sem alterações na

polidipsia e poliúria. O HaEBcl reduziu a hiperglicemia em 20 e 40% na menor dose e 30% e 70% na maior dose no 21º e 28º dias de tratamento, respectivamente, assim como os níveis de frutossamina (40%) na maior dose. Além disso, os animais tratados com o HaEBcl melhoraram os níveis lipêmicos e de glicogênio hepático, a hepatotoxicidade e o estresse oxidativo induzido pelo DM na maior dose. Deste modo, o HaEBcl não é tóxico oralmente, assim como tem ações antidiabética e antihiperglicemiantes claras, além de efeitos hepatoprotetores e antioxidantes *in vivo*.

Palavras-chave: toxicidade; diabetes; *bauhinia cheilantha*; plantas medicinais; estreptozotocina.

ABSTRACT

Bauhinia cheilantha (Lauraceae), such as anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, hypocholesterolemic. The objective of this work was to evaluate the acute toxicity and repeated doses for 28 days, antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activity of the ethanol extract of the leaves of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. The systematic study was carried out in the PubMed, Web of Science, Science direct, SCIELO, Google Scholar and PROSPERO databases, which were searched along the entire timeline. The inclusion strategy was established with SYRCLE protocol guideline and evaluated based on the risk of bias. Experimentally, the profile and structural characterization of the compounds present in the ethanol extract of *B. cheilantha* was evaluated, as well as the anti-hemolytic effect. Acute oral toxicity was evaluated in female mice (n=3 per group) treated at a single dose of 300 and 2000 mg/kg. Subchronic oral toxicity was evaluated in female mice (n=5 per group) and male mice (n=5 per group) treated with doses of 300, 1,000 or 2,000 mg/kg for 28 consecutive days. Serum levels of liver (liver transaminases) and renal (urea and creatinine) markers were evaluated, as well as the hematological profile and liver and kidney histology. Efficacy with a hypoglycemic agent was evaluated in rats, which were divided into four groups (control, diabetic, HaEBcl 150mg / kg, HaEBcl 300mg / kg, insulin). Experimental DM was induced by intravascular injection through jugular injection of streptozotocin 40mg / kg, five days after diabetes induction, animals with postprandial glucose values equal to or greater than 250mg / dL were considered diabetic. HaEBcl did not show alterations in the plasmatic and histological levels of the markers of renal and hepatic function, as well as it did not produce hematological alterations in the acute and subchronic toxicity assays in the evaluated doses. Male Wistar rats (200±10g) were treated with a single dose of streptozotocin, the studied groups were divided into: diabetic (D), diabetic treated with 150mg/kg of HaEBcl, diabetic treated with 300mg/kg HaEBcl and diabetic treated with insulin (DI, ip) for 28 consecutive days. Glucose levels were determined in addition to oxidative activities: biochemical parameters and lipid profile. Based on a survey of experimental studies carried out and published based on the experimental use of the genus *Bauhinia*. A strategic search was established in order to evaluate the glycemic and lipid profile in experimental models in vivo. The systematic study showed that most articles confirm the hypoglycemic action of preparations from *Bauhinia* extract. Four compounds experimentally identified in the HaEBcl extract as quercetin glycosides and two were

identified as kaempferol glycosides. HaEBcl was able to inhibit the activity of DPPH radicals and also exert antioxidant activity for ABTS. The anti-hemolytic result showed that HaEBcl did not disrupt the red blood cell membrane and also preserved the integrity of the erythrocyte membrane. We verified that HaEBcl150 and HaEBcl300, obtained a significant improvement in the concentration of glucose in diabetic animals from the 15th day of the experiment, in addition to improvements in the levels of transaminases and oxidative stress. When compared to the group that received only STZ, HaEBcl had a significant role in reducing the levels of MDA, ALT, AST and ALP, in addition to increasing the lipid profile after the treatment of diabetic rats. The results obtained prove this antidiabetic effect thanks to the restriction of oxidative stress and the reinforcement of antioxidant activities.

Keywords: toxicity; diabetes; *bauhinia cheilantha*; medicinal plants; streptozotocin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1 DIABETES MELLITUS.....	12
2.1.1 Epidemiologia	12
2.1.2 Fisiopatologia.....	16
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES	22
2.3 FARMACOLOGIA DO TRATAMENTO DO DIABETES <i>MELLITUS</i>	24
2.3.1 Terapia combinada	31
2.3.2 Alternativas Terapêuticas.....	33
2.3.3 Plantas medicinais.....	35
2.4 <i>Bauhinia sp.</i>	36
2.4.1 Fitoquímica	37
2.4.2 Toxicologia	38
2.4.3 Atividades farmacológicas apresentadas pelas plantas do gênero <i>Bauhinia</i>	38
3 OBJETIVOS.....	40
3.4 GERAL	40
3.5 ESPECÍFICOS	40
4 CONCLUSÕES GERAIS	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO A – <i>Bauhinia</i> genus: Biochemistry on the antihyperglycemic and dyslipidemic effect, cross-sectional study and meta-analysis.....	53
ANEXO B – Safety assessment of <i>Bauhinia cheilantha</i> Bong. Steud leaves extract: Acute, sub- acute toxicity, antioxidant and antihemolytic evaluations....	75
ANEXO C –Antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant effect of the ethanolic extract of the leaves of <i>Bauhinia cheilantha</i>	105
APÊNCICE A - (Syrclé’s tool for assessing risk of bias)	131
APÊNCICE B - (Research strategy).....	132
APÊNCICE C - Processo N° 23076.004793/2015-42.....	134
APÊNCICE D - Processo N° 23076.042497/2015-22.....	135

1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma grave endocrinopatia caracterizada por níveis elevados de glicose plasmática (hiperglicemia) decorrentes de uma deficiência β -pancreática na síntese e secreção de insulina e/ou resistência de tecidos metabolicamente importantes como músculo esquelético, tecido adiposo branco e fígado a ação hormonal (Ballinger, 2011). O DM é um dos mais preocupantes problemas de saúde pública mundial, com prevalência alarmante. Atualmente, estima-se que 537 milhões de pessoas no mundo vivem com diabetes (IDF, 2019). A projeção é que este número alcance 578 milhões no início da próxima década e em 2045 tenhamos 700 milhões no mundo (IDF, 2019).

Embora existam opções farmacológicas para o tratamento do DM, a necessidade da combinação de diferentes fármacos, dificuldade econômica para acesso a fármacos, necessidade de modificação de estilo de vida e os efeitos colaterais comumente relatados pelos pacientes dificulta a adesão ao tratamento e o controle glicêmico (Chatterjee et al., 2017). Diante deste cenário, busca-se o desenvolvimento de novas opções terapêuticas no tratamento do DM, incluindo o uso de terapias alternativas como o uso de plantas medicinais. Elementos religiosos e culturais, acesso relativamente fácil, sobretudo de populações economicamente vulneráveis e a ideia equivocada de ausência de efeitos colaterais justificam a maior adesão ao tratamento utilizando plantas medicinais (Almalki et al., 2019). Neste sentido, a avaliação toxicológica e farmacológica de plantas é fundamental para o uso terapêutico seguro e a comprovação cientificamente aceitável do uso popular relatado (Dar et al., 2017; Almeida et al., 2009).

Diferentes espécies são indicadas popularmente para o tratamento do DM, como a *Morus nigra* (Hassanalilou et al., 2017), *Spondias tuberosa* (BARBOSA et al., 2018), *Baunia forficata* (Souza et al., 2018). Além dessas, uma leguminosa endêmica da Caatinga, a *Bauhinia cheilantha* (Bong.), conhecida popularmente como pata-de-vaca ou mororó, é amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento do DM (Silva et al., 2017), entretanto, a comprovação científica de seus efeitos biológicos e de seus possíveis mecanismos de ação são bastante escassos. Seu gênero apresenta diferentes classes de moléculas de interesse medicinal, como os alcalóides, as antraquinonas, esteróides livres, flavonas, flavonóides e xantonas (folhas, madeira e raízes), fenóis (caule, folha), flavononas (caule, raiz) (SILVA et al., 2020; AGRA, 2007; LUNA et al., 2005; BRAGA, 1960).

Diante do exposto, a presente proposta se organiza norteadada pela hipótese de que o DM

o presente trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade oral aguda e de doses repetidas por 28 dias do extrato etanólico das folhas de *Bauhinia cheilantha*, assim como os possíveis efeitos antidiabético, antihiperglicemiante, antihiperlipidêmico e antioxidante em ratos diabético. A fim, de testar as hipóteses (1) Formulação da fração hidroalcóolica de *B. cheilantha* possui relação significativa na redução dos perfis glicêmicos e lipêmico de animais diabéticos e (2) A composição da fração hidroalcóolica de *B. cheilantha* possui relação significativa no estado redox de animais diabéticos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

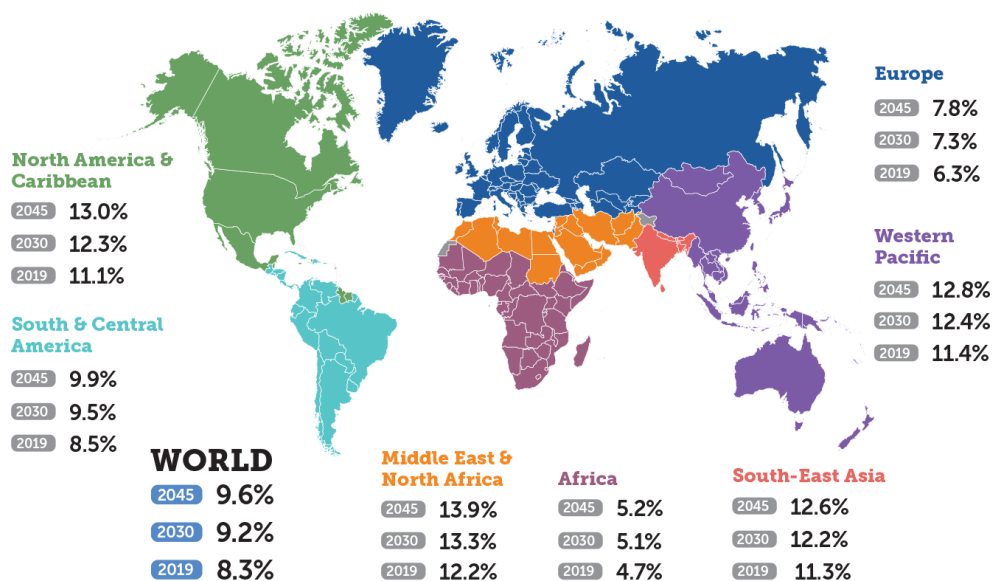
2.1 DIABETES MELLITUS

2.1.1 Epidemiologia

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença comum e muito prevalente que afeta cidadãos de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se que 10,5% da população mundial seja afetada por esta doença (IDF-2019). O DM é causado pela redução na síntese e secreção de insulina e a resistência periférica ao hormônio para captação e utilização de glicose, que por sua vez geram anormalidade no metabolismo dos carboidratos, das gorduras e das proteínas que está ligada ao baixo nível de insulina no sangue ou à insensibilidade dos órgãos-alvo à insulina (Almalki et al., 2019).

Atualmente, quase 500 milhões pessoas em diferentes partes do mundo vivem com diabetes, estima-se que este número aumente para 578 milhões até 2030 e 700 milhões até 2045 (Fig. 1). Na América central e sul, incluindo o Brasil a prevalência ajustada por idade em 2019 é de 8,5% o que pode ser parcialmente atribuído a fatores modificáveis e não modificáveis, com destaque para a idade (≥ 40 anos), a obesidade, o sedentarismo e a presença de outras condições de saúde. No entanto, espera-se que o número de pessoas com diabetes nesta Região aumente em 9,9% até 2045 (IDF, 2019).

Figura 1. Prevalência comparativa do Diabetes ajustada por idade de diabetes em adultos (20–79 anos) em 2019.



For confidence intervals, see full *IDF Diabetes Atlas*, Table 3.4.

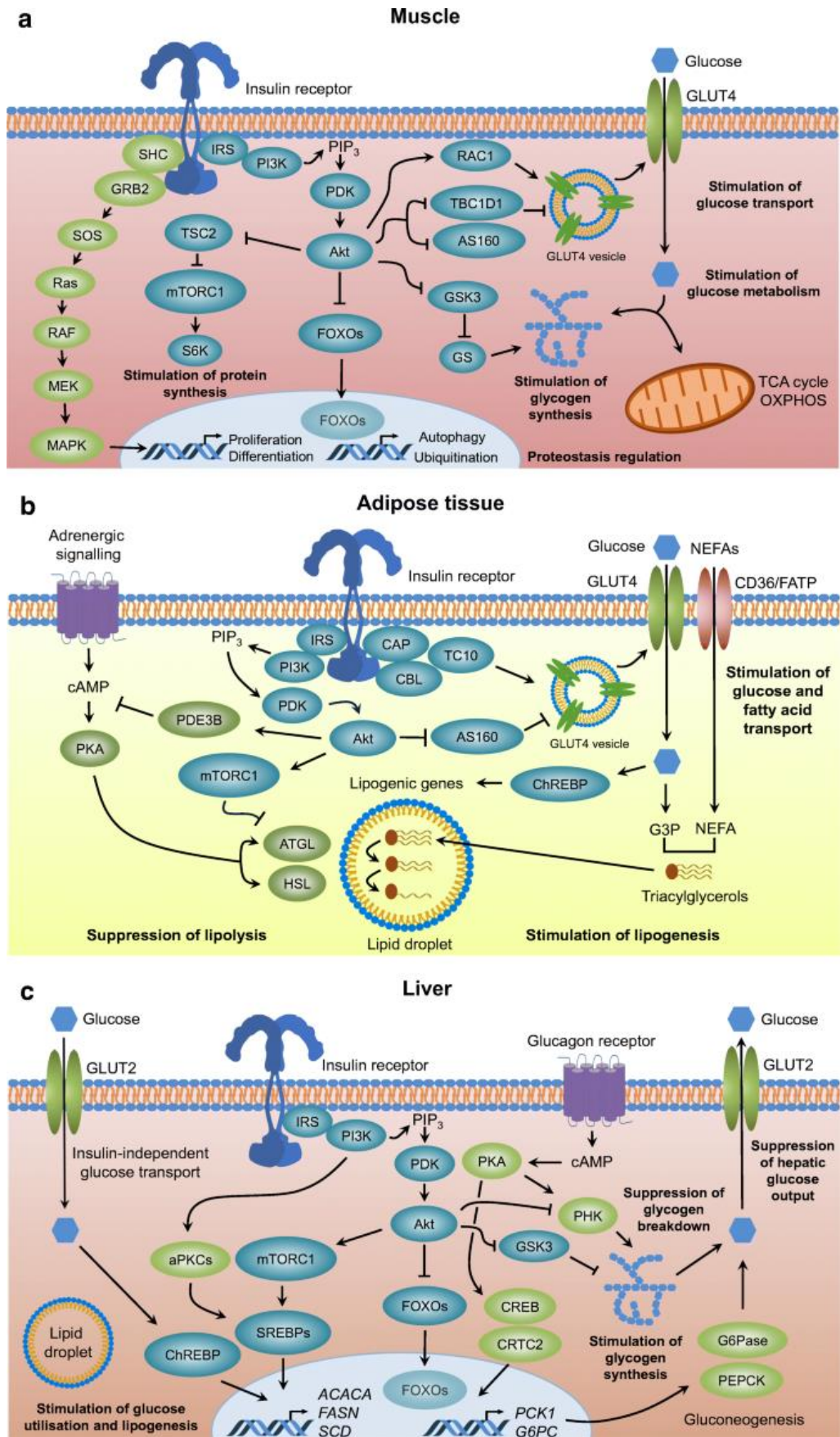
Fonte: IDF 2019.

A descoberta inovadora da insulina há 100 anos (Macleod, 1922) transformou o diabetes de uma sentença de morte em uma condição controlável. No entanto, logo ficou claro que a maioria dos indivíduos com diabetes não são deficientes em insulina, mas têm níveis aumentados de insulina e são resistentes à insulina exógena (Himsworth, 2013). Grandes avanços na compreensão da ação da insulina e da resistência à insulina ocorreram no início da década de 1970, com a demonstração da existência de receptores de insulina na membrana das células (Freychet et al., 1971) e o subsequente reconhecimento de sua atividade intrínseca de tirosina quinase (Kasuga et al., 1982).

Embora os principais componentes envolvidos na transdução do sinal de insulina estejam presentes em praticamente todas as células, os resultados biológicos após a ativação ou interrupção dessa via são altamente dependentes do tipo de célula e do contexto fisiológico (Fig. 2). No músculo esquelético, a insulina promove o transporte e a utilização da glicose, estimula a síntese de glicogênio e inibe o catabolismo de proteínas (Fig. 2a). No tecido adiposo, a insulina promove o transporte de glicose e a lipogênese e inibe a lipólise (Fig. 2b). No fígado, a ação da insulina inibe a produção de glicose e a oxidação de ácidos graxos e estimula a síntese de glicogênio e a lipogênese (Fig. 2c).

Além desses efeitos celulares diretos, a insulina também pode regular o metabolismo indiretamente. Por exemplo, a supressão da lipólise pela insulina na gordura e a inibição do catabolismo de proteínas no músculo reduzem o suprimento de substrato para a gliconeogênese no fígado (Perry et al., 2015; Batista et al., 2021). Nos estados de resistência à insulina, todas ou apenas algumas dessas vias podem ser alteradas, com a combinação exata levando a diferentes apresentações clínicas.

Figura 2. Sinalização da insulina em tecidos clássicos. A ligação da insulina ao receptor de insulina leva à ativação da atividade da tirosina quinase intrínseca e do receptor de insulina multissítio e fosforilação de IRS. O IRS tirosina-fosforilado serve como locais de ancoragem para PI3K levando à formação de PIP3 e ativação de Akt dependente de PDK, que por sua vez promove a utilização de nutrientes, armazenamento e outros processos anabólicos, e concomitantemente suprime as vias catabólicas no (a) músculo esquelético, (b) adiposo tecido e (c) fígado. aPKC, PKC atípica; ATGL, lipase de triglicerídeos adiposos; CAP, proteína associada a Cbl; CBL, proto-oncogene Cbl; ChREBP, proteína de ligação a elementos responsivos a carboidratos; CREB, proteína de ligação ao elemento responsivo a cAMP; CRT2, coativador de transcrição 2 regulado por CREB; FATP, proteína de transporte de ácidos graxos de cadeia longa; G3P, gliceraldeído 3-fosfato; G6Pase, glicose-6-fosfatase; GRB2, proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento; GS, glicogênio sintase; HSL, lipase hormônio-sensível; MAPK, proteínas quinases ativadas por mitógeno; MEK, MAPK quinase; OXPHOS, fosforilação oxidativa; PDE3B, fosfodiesterase 3B; PHK, fosforilase quinase; PKA, proteína quinase A; RAC1, família RAC pequena GTPase 1; RAF, RAF proto-oncogene serina/treonina quinase; Ras, Ras GTPase; SHC, domínio SH2 contendo proteína de transformação; S6K, p70 cinase ribossômica S6; SOS, filho de homólogo sem sete; TBC1D1, membro da família de domínio TBC1 1; TC10, proteína de ligação ao GTP RhoQ relacionada com Rho; TCA, ácido tricarboxílico; TSC2, esclerose tuberosa 2.

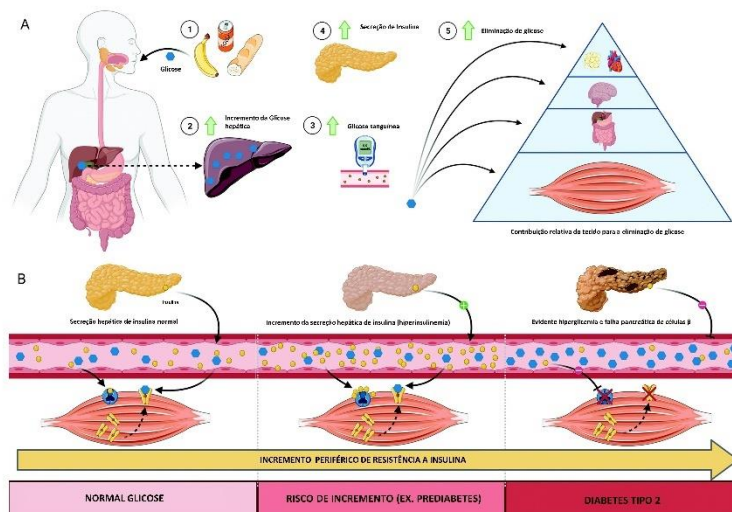


Fonte: Gillen et al., 2021.

2.1.2 Fisiopatologia

O *Diabetes mellitus* (DM), uma das emergências médicas mais cruciais do século XXI, é caracterizado como hiperglicemia persistente devido ao comprometimento da produção de insulina pelas células β pancreáticas e / ou causada por resistência à ação da insulina nos tecidos periféricos (IDF, 2019). Essas anormalidades podem degenerar o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, além de causar diversas complicações macro e microvasculares (Moodley et al., 2015; Yusoff et al., 2015). A hiperglicemia é o resultado da deficiência relativa de insulina, resistência à insulina ou ambas (Almalki et al., 2019), o que torna as células hepáticas incapazes de armazenar glicose (Fig. 3), o que pode estar associado a dislipidemia, produção de radicais livres e alteração do estado redox.

Figura 3. Regulação da glicemia.



V

Fonte: Gillen et al., 2021.

Em humanos, aumento do nível de glicose no sangue, redução da sensibilidade à insulina e aumento da secreção de insulina são observados 13 anos antes do diagnóstico completo do diabetes mellitus tipo 2 (DM2). A duração total desde o início das circunstâncias de resistência à insulina até o DM2 pode ser dividida em três estágios. O primeiro estágio é o longo período compensatório quando a resistência à insulina se

desenvolve, eleva o nível de glicose no sangue e aumenta a massa de células β . O segundo estágio é o período de adaptação quando as células β não estão mais compensando totalmente o aumento da resistência à insulina. Os dois primeiros estágios ocorrem antes que a fase de pré-diabetes seja alcançada. A terceira etapa é o desenvolvimento de pré-diabetes para DM2; Nesta fase, as células β tornam-se disfuncionais e são incapazes de compensar a resistência à insulina, que por sua vez, eleva rapidamente os níveis de glicose no sangue.

O músculo esquelético considerado o órgão-alvo primário para a captação de glicose em humanos, responsável por absorver 70-90% da glicose do sangue em indivíduos saudáveis no estado pós-prandial (Evans et al., 2019). Quando não há níveis elevados de glicose no sangue, mas certo grau de resistência à insulina, estimativas apontam que o músculo esquelético se torna responsável por 80% da depuração de glicose (DeFronzo e Tripathy, 2009). A insulina é um potente estimulador do transporte de glicose para o músculo esquelético (Stanford, 2014). Além disso, esse hormônio inibe a produção e liberação de glicose pelo fígado e promove a captação de glicose da corrente sanguínea também para o tecido adiposo (Rowland et al., 2011).

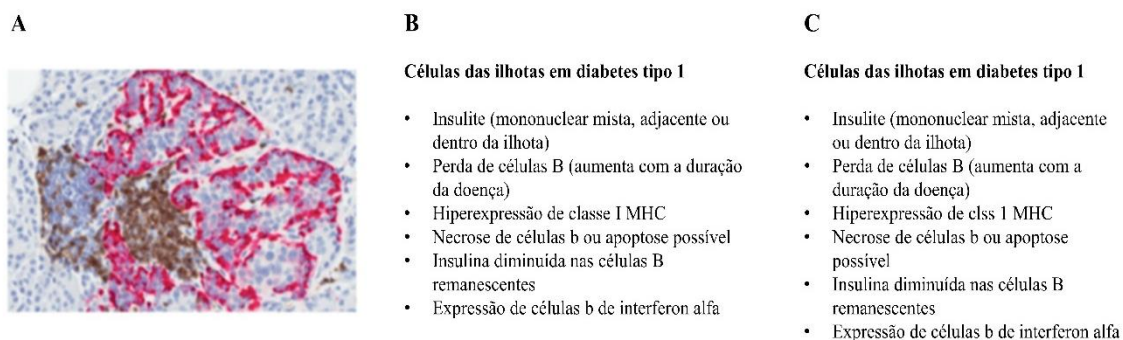
A Resistência à Insulina (RI) está relacionada à obesidade e ao perfil pré-diabético que advém de diversos fatores: (i) quadro de inflamação crônica de baixo grau, que se inicia nos tecidos adiposos e fígado, ocorrendo elevação na produção de citocinas pró-inflamatórias e de importantes mediadores da inflamação que inibem componentes da sinalização insulínica, incluindo o receptor de insulina (IR) e o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), bem como inibem a síntese de triacilgliceróis e o armazenamento de lipídeos via inibição de PPAR γ (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama, peroxisome proliferator-activated receptor- γ) e estimulam a lipólise, levando a um aumento nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres que causam lipotoxicidade, também prejudicial à sinalização da insulina; (ii) disfunção mitocondrial, decorrente da sobrecarga de trabalho da mitocôndria, causando diminuição de sua função e, conseqüentemente, acúmulo de ácidos graxos livres e glicose devido à prejuízos na oxidação destes nutrientes; (iii) hiperinsulinemia, que apesar de ser consequência da resistência à insulina, também pode via feedback negativo inibir a via de sinalização insulínica (Ye, 2013). Além disso, a resistência à insulina também aumenta o risco de insuficiência cardíaca, estimula o crescimento de tumores e diminui as funções de memória que aumentam o risco de doença de Alzheimer.

Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1)

Diabetes tipo 1 resulta na destruição autoimune das células β pancreáticas secretoras de insulina. A presença de um infiltrado inflamatório crônico que afeta as ilhotas pancreáticas no início sintomático do diabetes tipo 1 é a base desta observação (Veld, 2011). O DM1 representa 5% a 10% dos casos de diabetes e decorre da destruição imunomediada seletiva das células-beta das ilhotas pancreáticas. O grau de destruição celular é variável. É rápido e intenso em crianças e adolescentes, ou é de instalação mais lenta, em adultos, que podem reter a função residual das células-beta por até alguns anos após o diagnóstico. É uma das doenças crônicas mais comuns e graves, sendo caracterizada pela presença de autoanticorpos contra antígenos pancreáticos (American Diabetes Association, 2007).

Outro dogma é que em pacientes com doença de longa data, o pâncreas é desprovido de células produtoras de insulina e as células β restantes são incapazes de regeneração. Ambos os conceitos de patogênese do diabetes tipo 1 têm sido debatidos (Gregg et al., 2011; Atkinson et al., 2014). Autores sugerem que, embora a maioria dos pacientes com diabetes tipo 1 de longa data tenham poucas células β , se houver, Evidências de regeneração de células β em bebês e crianças muito jovens (mas não em adolescentes ou adultos) (Keenan et al., 2010). Muito do que entendemos sobre a patogênese do diabetes tipo 1 deriva da análise de amostras pancreáticas, soro e linfócitos de sangue periférico obtidos de pacientes com a doença (Bingley, 2010; Roep e Peakman, 2011). Estudos desses constituintes sugerem que uma série de defeitos funcionais na medula óssea e no timo, no sistema imunológico e nas células β contribuem coletivamente para a fisiopatologia do diabetes tipo 1 (Fig. 4).

Figura 4. Características patológicas do pâncreas em diabetes tipo 1. (A) Infiltrado celular inflamatório em ilhotas (isto é, insulite) observado em um paciente com diabetes tipo 1. A imunohistoquímica mostra a presença intra-ilhotas de células CD3 positivas (marrom) e células alfa produtoras de glucagon (rosa). (B) características histológicas de ilhotas e (C) características patológicas grosseiras do pâncreas associadas à história natural do diabetes tipo 1 (isto é, pré-início, início, pós-início).



Fonte: Atkinson et al, (2014).

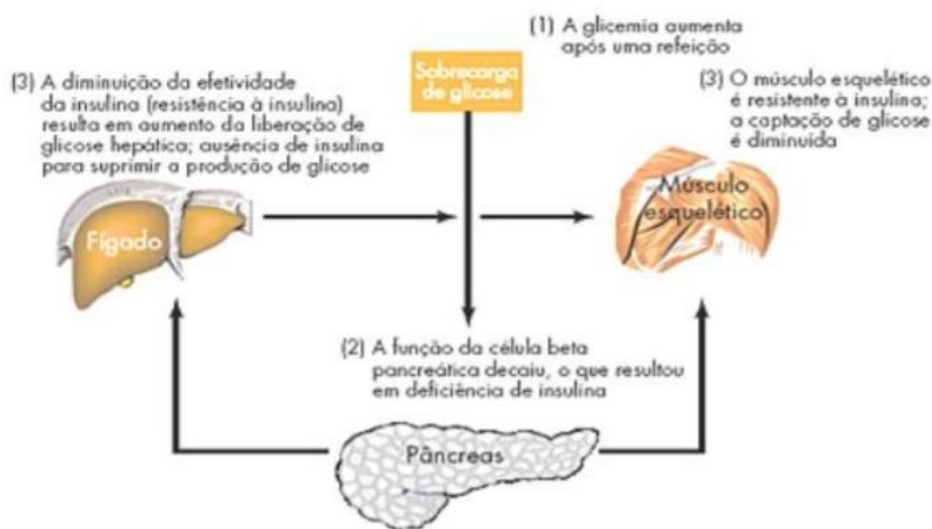
Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2)

O Diabetes *mellitus* tipo 2 é responsável por mais de 90% dos casos de DM e pode ser atribuída aos efeitos do envelhecimento populacional associado a um estilo de vida pouco saudável, como maus hábitos alimentares e vida sedentária, é principalmente um problema de regulação da glicose, caracterizada por resistência à insulina e redução da produção de insulina. (Muneer, 2021; Tan et al., 2019; Lewis et al., 2014). O diabetes tipo 2 é caracterizado por hiperinsulinemia aumentada (Fig. 5), resistência à insulina e falhas nas células β pancreáticas, com até 50% de perda de células no diagnóstico (Holman et al., 2008). A perda de células β ocorre mais rapidamente em pacientes jovens (10-17 anos de idade), o que pode explicar a falha precoce do tratamento em pacientes diagnosticados em uma idade jovem (Today Study Group, 2012). O desenvolvimento de diabetes tipo 2 incluem acometimento do pâncreas (células β e células α), fígado, músculo esquelético, rins, cérebro, pequeno intestino e tecido adiposo (DeFronzo, 2009).

A hiperglicemia inclui outros mecanismos para o desenvolvimento de complicações microvasculares e macrovasculares causadas pela disfunção endotelial, formação de produto final de glicação avançada, hipercoagulabilidade, aumento da reatividade plaquetária e hipereexpressão do co-transportador 2 de sódio-glicose (SGLT-2), todos eles alvos terapêuticos para a modulação de doenças (Chatterjee et al., 2017).

O DM2 geralmente se desenvolve em pessoas com fatores de risco e predisposição genética conhecidos e pode estar relacionado a causas ambientais (Kong et al., 2021; Lewis et al., 2014; McCance et al., 2014;). Um desenvolvimento preocupante é o aumento de DM2 em crianças, provavelmente relacionado à obesidade, idade, etnia e hereditariedade são fatores de risco não modificáveis (Ignatavicius e Workman, 2016).

Figura 5. Características patológicas em diabetes tipo 2.



Fonte: MSD-Merck Sharp & Dohme, (2006).

Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)

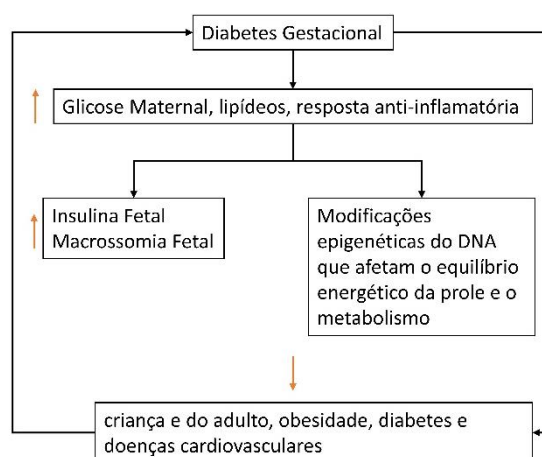
O Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) é uma doença sistêmica que envolve alterações no metabolismo dos carboidratos, indicando assim seus níveis consideravelmente altos, no sangue, durante a gravidez (Saravanan et al., 2020). É uma doença frequente na gestação, presente em cerca de 7% de todas as gestações e varia entre 1% e 14% de acordo com a população estudada e com os critérios diagnósticos utilizados. No Brasil, estima-se que 2,4% a 7,2% de todas as gestantes desenvolvem DMG, o que significa mais de 200.000 casos novos por ano. (Fernandes e Bezerra, 2020; IDF 2019).

A resistência à insulina e a disfunção das células β são as principais características fisiopatológicas do DMG. A sensibilidade à insulina varia significativamente ao longo da gravidez, adaptando-se constantemente às demandas de energia da mãe e do feto (Di Cianni et al., 2003). No geral, a sensibilidade à insulina segue uma tendência

bifásica na gravidez saudável, experimentando um aumento acentuado inicialmente e uma redução acentuada à medida que a gravidez evolui. A adaptação metabólica observada na fase inicial (os dois primeiros trimestres) visa armazenar fontes essenciais de energia, como glicose e ácidos graxos, como depósitos de gordura, necessários para os próximos estágios da gravidez (Filardi et al., 2020).

A síntese de estrogênios e progesterona aumenta progressivamente, juntamente com outras moléculas de origem placentária, como o lactogênio placentário humano e o hormônio de crescimento da placenta humana, contribuindo para a queda progressiva da sensibilidade à insulina. Assim, o estado de resistência à insulina observado na gravidez fisiológica é uma resposta adaptativa que favorece a elevação dos níveis de glicose e ácidos graxos livres no sangue, deslocando as fontes de energia da mãe para o feto (Santangelo et al., 2016; Plows et al., 2018) (Fig. 6). A célula β pancreática compensa amplamente por meio de um aumento na liberação de insulina. A hipertrofia e a hiperplasia da massa de células β , explicadas pelo aumento da proliferação e redução de apoptose, foram relatadas na gravidez humana. No entanto, se ocorrer disfunção das células β , o efeito compensatório é perdido e o GDM se manifesta (Butler et al., 2010).

Figura 6. Desenvolvimento e diabetes gestacional. As consequências metabólicas do diabetes gestacional materno podem aumentar o risco de obesidade, diabetes e distúrbios cardiometabólicos na criança e no adulto, levando a um ciclo transgeracional de diabetes gestacional e mais suscetibilidade cardiometabólica.



Outros tipos de DM

Outros tipos específicos de diabetes, incluindo diabetes monogênica e o que já foi denominado ‘Diabetes secundário’. O diabetes monogênico, como o nome indica, resulta de um único gene, em vez das contribuições de vários genes e fatores ambientais, conforme visto em diabetes tipo 1 e tipo 2 (IDF- 2019; Vaxillaire et al., 2012). Diabetes monogênica é muito menos comum e representa 1,5–2% de todos casos, embora isso possa ser uma subestimação. Muitas vezes é diagnosticado erroneamente como tipo 1 ou tipo 2 diabetes (Murphy et al., 2008). Essas formas monogênicas apresentam um amplo espectro, de diabetes mellitus neonatal (às vezes chamado ‘Diabetes monogênico da infância’), início da maturidade diabetes dos jovens (MODY) e doenças sindrômicas raras associadas ao diabetes. Embora raro, estes podem servir como "modelos de nocaute humano" fornecendo informações sobre a patogênese do diabetes (Cnop et al., 2017).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DIABETES

“Estresse oxidativo” pode ser definido como qualquer distúrbio no equilíbrio de antioxidantes e pró-oxidantes em favor dos últimos devido a diferentes fatores como envelhecimento, ação de drogas e toxicidade, inflamação e / ou dependência (Sies, 2017; Oguntibeju, 2019). É, em geral, formação em excesso e / ou remoção insuficiente de moléculas altamente reativas, como espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Johansen et al., 2005; Oguntibeju, 2019; Yaribeygi et al., 2020). Danos ao DNA, proteínas e outras macromoléculas devido à oxidação têm sido implicados na patogênese de uma ampla variedade de doenças, como câncer, doenças cardíacas e diabetes (Ağgül et al., 2020).

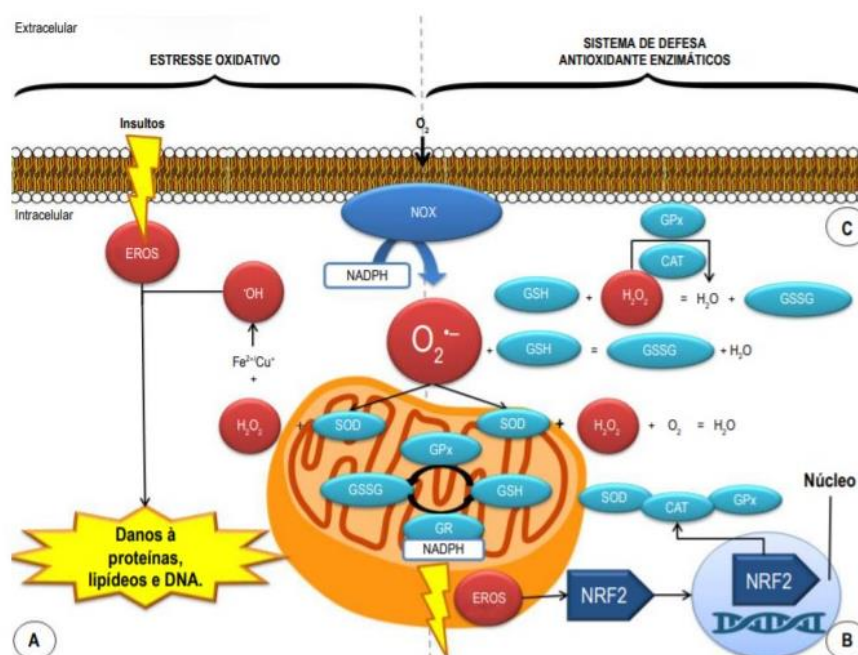
O termo “antioxidante” pode ser rotulado para qualquer substância cuja disponibilidade, mesmo em concentrações mínimas, iniba ou retarde a oxidação de um substrato (Ağgül et al., 2020). Existem várias espécies ou moléculas, que desempenham um papel na defesa antioxidante e podem ser consideradas biomarcadores do estresse oxidativo como a glutathione. Diferentes tipos de antioxidantes biológicos incluem, por exemplo, glutathione (oxidada / reduzida), vitamina C e E, cistina, etc. (Savita Khanna 2000).

São relatadas evidências que apoiam o papel do estresse oxidativo na patogênese do DM tipo 1 e tipo 2. A formação de radicais livres no diabetes por glicação não

enzimática de proteínas, oxidação de glicose e aumento da peroxidação lipídica leva a danos de enzimas, maquinário celular e também aumento da resistência à insulina devido ao estresse oxidativo (Maritim et al., 2003).

Durante o DM o meio hiperglicêmico promoverá a superativação das três principais vias celulares de produção de energia. A hiperestimulação da glicólise e do ciclo de Krebs, resultará na produção exacerbada de dinucleotídeo flavina adenina reduzida (FADH₂) e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), superalimentando a CTE (Rizzato et al., 2021; Forbes e Thorburn, 2018). Esta cadeia é uma fonte de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), sobretudo nas células renais, haja vista o seu grande número de mitocôndrias (Moreira et al., 2020). Nas células renais diabéticas a estimulação de mitocôndrias hiperpolarizadas com alto potencial redox, produzem mais adenosina trifosfato (ATP) e liberam níveis superiores de ânion radical superóxido (O₂^{-*}) através dos complexos I e III. O O₂^{-*} dará origem aos demais tipos de espécies reativas de nitrogênio (ERONs), radicalares e não-radicalares, incluindo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila (OH*) e o peroxinitrito (ONOO⁻), que podem mediar às lesões renais (Fig. 7), (Rizzato et al., 2021).

Figura 7. Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante enzimático em células renais diabéticas. CAT: catalase; EROs: espécies reativas de oxigênio; GPx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione; GSSG: glutathione oxidada; GR: glutathione reduzida; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; NRF2: fator nuclear fator 2 relacionado ao eritróide 2; O₂: oxigênio molecular; NOX: NADPH oxidase; O₂²⁻: ânion radical superóxido; *OH: radical hidroxila; SOD: superóxido dismutase.



Fonte: Rizzato et al., 2021.

2.3 FARMACOLOGIA DO TRATAMENTO DO DIABETES MELLITUS

O tratamento do *diabetes mellitus* visa aliviar os sintomas, melhorar a qualidade de vida e prevenir comorbidades. As estratégias de tratamento são divididas em não farmacológicas, como dieta e exercícios, e farmacológicas, que se dividem em medicamentos orais e insulina (Cheng et al., 2021). Os principais grupos de drogas orais são as sulfonilureias, biguanidas, inibidores da glicosidase intestinal, tiazolidinedionas (TZD) e meglitinidas. Cada grupo de antidiabéticos orais possui características próprias devido ao seu mecanismo de ação, indicações e contraindicações específicas, bem como aos efeitos adversos, como hipoglicemia e ganho de peso, portanto o seu conhecimento é fundamental para o seu uso adequado (Home, 2021).

Farmacoterapia no DM1

O uso de insulina exógena é necessário para estimular a captação de glicose para outros tecidos do corpo, especialmente músculo e tecido adiposo, onde é usado como energia. Também reduz a produção hepática de glicose (gliconeogênese). A insulina é geralmente adicionada a um agente oral quando o controle glicêmico está abaixo do

ideal na dose máxima de medicação oral. O ganho de peso e a hipoglicemia são efeitos colaterais comuns da insulina (Cheng et al., 2021).

A insulina atualmente disponível no mercado é de origem humana. Eles são sintetizados por engenharia genética, usando a técnica do DNA recombinante. Com base na farmacodinâmica, as insulinas são classificadas em: a) ação rápida; b) ação intermediária e; c) de longa duração (Tabela 1). Existem diferentes métodos para estimar a quantidade total de insulina necessária por dia, em pacientes com diabetes tipo 2, geralmente possuem requisitos maiores devido à resistência à insulina (Hoeg-Jensen, 2021).

Tabela 1. Tipos de Insulina Humana

Tipo (humana)	Início (min)	Duração (min)	Efeito Máximo (min)
Regular	0.5-2	2.0-3.0	3.0-6.0
Lispro	0.0-15	1.0-1.5	4.0-4.5
Intermediária	2.0-4.0	4.0-12	10.16
Lenta	1.0-3.0	6.0-12	12-20
Ultralenta	1.0-3.0	6.0-12	12-20

A dose inicial pode ser calculada entre 0,5-0,8 UI / kg / dia. Dois terços são administrados como insulina intermediária e um terço como insulina rápida. A forma mais comum de administração de insulina é o esquema de múltiplas doses, e provavelmente o esquema convencional é aquele que corresponde à administração de insulina regular + insulina. intermediário, antes do café da manhã e do jantar (Cheng et al., 2021; Abdul-Ghani et al., 2021).

Farmacoterapia no DM2

Opções de tratamento farmacológico disponíveis para DM2 foram resumidos na tabela 2, mostrando seus mecanismos de ação, e seus efeitos colaterais. Entretanto, as diversas opções terapêuticas devem ser adaptadas ao indivíduo paciente, combinando eficácia, segurança e o menor custo possível.

Tabela 2. Principais classes agentes hipoglicemiantes orais, mecanismo de ação e efeitos colaterais.

Classe	Agente	Mecanismo de Ação	Efeito Colateral
Sulfonilureas	Primeira Geração: Acetohexamida (Dymelor) Clorpropamida (Diabinese) Tolazamida (Tolinase) Tolbutamida (Orinase) Segunda Geração: Glibenclamida (Micronase) Glipizida (Glucotrol) Glimepiride (Amaryl)	Atuam estimulando a liberação de insulina das células beta do pâncreas e podem melhorar ligeiramente a resistência à insulina em tecidos-alvo periféricos (músculos, gordura).	A hipoglicemia é o efeito colateral mais preocupante das sulfoniluréias. É uma preocupação particular com agentes que são metabolizados em um metabólito ativo com excreção renal significativa. Esses agentes incluem clorpropamida (Diabinese) e gliburida, os quais devem ser evitados em caso de insuficiência renal e usados com cautela em pacientes idosos. A glipizida e a glimepirida estão associadas a uma menor incidência de hipoglicemia. Todas as sulfonilureias foram associadas ao ganho de peso e, portanto, podem não ser a primeira escolha ideal para pacientes obesos.
Meglitinidas	Repaglinida (Prandin) Nateglinida (Starlix)	Estimulam a liberação de insulina das células β -pancreáticas. No	Causa menos efeitos gastrointestinais que a metformina, mas causa ganho de peso,

		entanto, essa ação é mediada por um sítio de ligação diferente no “receptor de sulfonilureia” da célula beta. Ao contrário das sulfonilureias comumente usadas, os meglitinídeos têm um início de ação muito curto e uma meia-vida curta.	rinite/sinusite/faringite, mais episódios de hipoglicemia e dor de cabeça
Biguanida	Metformina (Glucophage)	Atua reduzindo a produção de glicose hepática e, em menor grau, aumentando a sensibilidade à insulina nos tecidos hepáticos e periféricos. Outros efeitos incluem uma redução nos níveis de triglicerídeos no plasma e nos níveis de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL).	A maioria dos efeitos colaterais relacionados (incluindo gosto metálico, desconforto gastrointestinal e náuseas) são transitórios e comumente relatados durante o início da terapia.
Tiazolidinediona	Pioglitazona (Actos) Rosiglitazona (Avandia)	Atuam aumentando a sensibilidade à insulina tanto no músculo quanto no tecido adiposo e, em menor grau, inibindo a produção hepática de	Possui reação idiossincrática. Esta reação é inicialmente caracterizada por níveis elevados de transaminases séricas, que em alguns casos

		glicose. Esses agentes têm um efeito notável na melhoria da resistência à insulina, particularmente quando usados em combinação com outros antidiabéticos, mas não têm efeito na secreção de insulina.	evoluíram para hepatite, insuficiência hepática e morte
Inibidores de Alpha-glucosidase	Acarbose (Precose) Miglitol (Glycet)	Agem inibindo a enzima alfa-glicosidase encontrada nas células da borda em escova que revestem o intestino delgado, que divide os carboidratos mais complexos em açúcares. Como eles inibem a quebra e a subsequente absorção de carboidratos (dextrinas, maltose, sacarose e amido; nenhum efeito na glicose) do intestino após as refeições, o maior impacto desses medicamentos é na hiperglicemia pós-prandial.	A terapia com acarbose tem sido associada a elevações nos níveis de transaminases séricas e o uso deste agente é contra-indicado em pacientes com cirrose hepática

cotransportador de sódio e glicose do tipo 2 (Inibidores de SGLT2)	Canagliflozina, Dapagliflozina, Empagliflozina e Ertugliflozina	Os SGLT2 inibem a reabsorção de glicose e sódio no túbulo contorcido proximal renal, têm ganhado destaque no tratamento da DM, ao reduzirem a glicemia de uma forma insulino-dependente e contribuírem para que haja uma melhora da função das células beta pancreáticas e da sensibilidade à insulina	Os riscos de cetoacidose diabética podem ser aumentados nos pacientes em uso dos inibidores de SGLT2, pois, além da diminuição da dose de insulina que o paciente é submetido, a excreção de glicose que o fármaco promove, pode esconder a hiperglicemia em uma crise de cetoacidose diabética e confundir o paciente e o profissional da saúde, levando a um diagnóstico errado.
Inibidores do peptídeo um tipo glucagon:	exenatida, liraglutida, semaglutida, albiglutida, lixisenatida e dulaglutida	Os agonistas do receptor GLP-1 estimulam os receptores GLP-1 no pâncreas, aumentando assim a liberação de insulina e inibindo a secreção de glucagon.	O uso de agonistas de GLP-1 está associado à perda de peso, o que pode reduzir a RI. A liraglutida é aprovada pela FDA como agente anti-obesidade.
Inibidores de dipeptidil peptidase-4	Sitagliptina, Vildagliptina, Saxagliptina, Linagliptina, Alogliptina.	Os inibidores de DPP-4 prolongam a atividade do GLP-1 endógeno e do polipeptídeo inibidor gástrico (GIP) impedindo sua quebra.	Efeitos colaterais comumente relatados incluem sensação de incômodo na garganta, cefaleia, nasofaringite, infecção do trato respiratório superior. Alguns, mas não todos estudos têm relatado um ligeiro aumento do risco de efeitos colaterais gastrointestinais com sitagliptina. A segurança a

			longo prazo com o inibidor de DPP-4 não foi estabelecida
--	--	--	--

A terapia com insulina, usada no diabetes tipo 1, expandiu seu uso com a indicação no diabetes tipo 2, que pode ser usada sozinha ou em combinação com medicamentos orais, por meio do qual melhores objetivos de controle podem ser alcançados e os objetivos desejados podem ser alcançados (Home, 2021; Islam, 2021). Os ensaios clínicos estabeleceram que a adição de insulina basal à terapia oral existente para redução da glicose atinge um bom controle glicêmico na maioria dos pacientes com diabetes tipo 2 (Riddle et al., 2003; Rosenstock et al., 2008). De acordo com o algoritmo ADA / EASD para o tratamento de diabetes tipo 2, a insulina pode ser iniciada com insulina NPH uma vez ao dia ou um análogo de insulina de ação prolongada (Nathan et al., 2009). Como mencionado anteriormente, o benefício relativo dos análogos de insulina de ação prolongada é limitado a uma redução da hipoglicemia (noturna). Além disso, esta vantagem é relevante apenas para uma minoria, uma vez que a maioria dos pacientes com diabetes tipo 2 iniciando terapia com insulina não apresenta hipoglicemia (Lepore et al., 2000).

Pacientes com DM2 podem precisar de insulina exógena para controlar os níveis de glicose no sangue durante períodos de estresse agudo (ou seja, cirurgia ou doença grave) ou podem usar insulina para complementar seus medicamentos orais para um controle mais rígido (Ignatavicius e Workman, 2016; Lewis et al., 2014). A metformina continua sendo a terapia de primeira linha de escolha para pacientes com DM2, a menos que especificamente contraindicada, por exemplo em pacientes com insuficiência renal.

2.3.1 Terapia combinada

A indicação mais comum para o uso de terapia combinada é a falha secundária aos hipoglicemiantes orais e nas situações em que os objetivos de controle glicêmico não são alcançados, variando desde uma combinação de agentes orais; agentes orais mais insulina; e uso exclusivo de insulina (Chan et al., 2021; Prasanna et al., 2021). Também é sugerido de acordo com estudos anteriores, o tratamento combinado deve ser feito com medicamentos com mecanismo de ação diferente. Pode ser mais eficaz para alcançar e manter as metas de controle glicêmico (70 mg/dL até 99 mg/dL) (Pasquel, et al., 2021).

A justificativa para a terapia combinada está baseada não apenas no insucesso da monoterapia de longa duração, mas também no fato, apoiado em diversos estudos, de ser viável aproveitar o efeito sinérgico dos diferentes mecanismos de ação dos fármacos. A terapia combinada também possibilita o uso de doses menores de medicamentos, o que pode reduzir a frequência ou a gravidade dos efeitos adversos (geralmente dose-dependentes), e com maior eficácia (Chan et al., 2021; Long e Speake, 2021).

Para pacientes em terapia oral, estudos sugerem que o tratamento prévio combinado, usando agentes antidiabéticos orais com um mecanismo de ação diferente, pode ser altamente eficaz para atingir e manter as metas de controle glicêmico (Abdul-Ghani et al., 2021). A terapia de combinação de baixa dose pode estar associada a menos efeitos colaterais do que a monoterapia de alta dose e alcançar um controle glicêmico semelhante ou melhor (tabela 3) (Chan et al., 2021).

Tabela 3. Principais efeitos dos tratamentos combinados de insulina com fármacos orais.

	Sulfonilureia+ Insulina	Metformina+ Insulina	Inibidores de alfaglicosidades +Insulina	Glitazonas+ Insulina
Redução da glicemia	↓Basal 36-45 mg/dL	↓Basal 27mg/dL	Basal sem alteração Pos-pandrial 55mg/dL	↓49 mg/dL
Redução de HbA_{1c}	↓0.7-11%	↓1.1-2.5%	↓0.69%	↓0.4-1.4%
Hipoglicemia	Frequente ↑11%	Sem alteração	Sem alteração	Frequente ↑20%
Mudança de peso	↑2.7kg	↑3.2-3.7kg	Sem dados	↑4%
Doses de Insulina	↓7-42 U/dia	↓29-47 %	↓8%	↓25-29%
Efeito lipídico	↓TG, =CT, =HDL	↓CT e LDL, =HDL e TG	↓TG pos-pandrial, =CT	↓TG, ↑CT, LDL e HDL

Quando os hipoglicemiantes orais não conseguem manter suficientemente o nível sérico de açúcar, pode ser necessário o uso de injeções de insulina isoladamente ou combinado com os hipoglicemiantes orais. É importante salientar que, o tratamento do paciente com diabetes mellitus tipo 2 não é um tratamento terapêutico simples, especialmente no que diz respeito às interações medicamentosas, reações adversas e erros de uso do fármaco, o que poderá dificultar a adesão e a eficácia do tratamento (Britto et al., 2020).

A terapia oral é indicada em todos os pacientes nos quais apenas dieta e os exercícios não alcançam um controle glicêmico aceitável (>99 mg/dL). Embora a resposta inicial possa ser boa, os hipoglicemiantes orais podem perder sua eficácia em uma porcentagem significativa de pacientes. A categoria de medicamentos no tratamento do DM inclui sulfonilureia, biguanida, inibidores da alfa-glicosidase, tiazolidinediona e meglitinida (ver Tabela 3). Esses medicamentos têm vários efeitos colaterais, como sulfonilureia causa ganho de peso devido à hiperinsulenemia (Dorababu et al., 2004; Halim, 2003) biguanida causa fraqueza, fadiga, acidose láctica, inibidor de alfa glucosidase pode causar diarreia enquanto tiazolidinedionas podem aumentar o nível de colesterol LDL.

2.3.2 Alternativas Terapêuticas

Os custos do DM afetam o indivíduo, a família e a sociedade, porém não são apenas econômicos. Os custos intangíveis (p. ex., dor, ansiedade, inconveniência e perda de qualidade e expectativa de vida) também apresentam grande impacto na vida das pessoas com diabetes e seus familiares, o que é difícil de quantificar (Blaschke et al., 2021).

O fármaco de primeira escolha para tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), é a metformina, e vem sendo o anti-hiperglicemiante oral mais prescrito, devido a apresentação relevante do aspecto de toxicidade o tornando benfeitor quanto a sua eficácia clínica (Paiva Filho et al., 2021). A metformina consegue reduzir níveis de glicose, o que resulta na diminuição da gliconeogênese hepática, ajustando um

declínio médio referente a níveis de insulina, promovendo a absorção de glicose no músculo (Asenjo et al., 2020).

O cloridrato de metformina derivada guanidina, é composto por ativo da *Galega officinalis*. Planta medicinal, que tem como sinonímia popular Lilac francês, de utilização por séculos na Europa como tratamento do diabetes desde a época medieval (GRAHAM GG, et al., 2011).

No diabetes, existem algumas alternativas terapêuticas além da metformina, que comprovadamente proporcionam alívio sintomático e auxiliam na prevenção da complicação secundária da doença. Espécies vegetais como *Catharanthus roseus* (Nazarian-Samani et al., 2018), *Fagonia cretica* (Abbas et al., 2019), *Ocimum sanctum* (Malapermal et al., 2017; Nazarian-Samani et al., 2018) tem ações antidiabéticas por mecanismos que envolvem a regeneração das células- β e redução da resistência à insulina. Além de controlar o nível glicêmico no sangue, algumas plantas também possuem atividade antioxidante capazes de promover a redução do colesterol (Nazarian-Samani et al., 2018).

Das 200.000 espécies de plantas nativas do Brasil, estima-se que metade tenha alguma finalidade terapêutica e que apenas 1% dessas espécies com potencial foi alvo de estudos (Guimarães et al., 2021). Nesse contexto, o uso das plantas medicinais passou a ser um recurso importante dos profissionais de saúde, usuários e gestores. O Ministério da Saúde criou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, além de criar a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Em 2008, foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS) abrangendo 71 plantas (Rodrigues, 2021).

Além das políticas públicas criadas pelo Ministério da Saúde, há ainda a RDC nº 26/2014 que divide os produtos derivados de plantas em duas categorias, sendo a primeira sobre os medicamentos fitoterápicos que devem apresentar segurança e eficácia através de ensaios clínicos e, por segundo, os produtos tradicionais fitoterápicos que poderão ser registrados através da comprovação de tradicionalidade (Brasil, 2014).

2.3.3 Plantas medicinais

Durante séculos, muitas plantas foram consideradas uma fonte fundamental de medicamentos antidiabéticos potentes. Em países em desenvolvimento, particularmente, as plantas medicinais são usadas no tratamento do diabetes *mellitus* para superar o alto custo dos medicamentos convencionais para a população (da Cruz Lima et al., 2020). Hoje em dia, os tratamentos de doenças, incluindo diabetes, usando plantas medicinais são recomendados porque essas plantas contêm vários fitoconstituintes, como flavonóides, terpenóides, saponinas, carotenóides, alcalóides e glicosídeos, que podem possuir atividades antidiabéticas (Brito et al., 2020).

De acordo com o Ministério da Saúde 2012, são consideradas plantas medicinais todas as plantas frescas (*in natura*) que são coletadas no momento do uso, as plantas secas que, após coletadas, são estabilizadas que passem pelo processo de secagem (permanecendo íntegras, rasuradas, trituradas ou pulverizadas) e que podem ser usadas como chás caseiros e preparadas de modo artesanal no domicílio (Guimarães et al., 2021).

Nos dias atuais, quase todas as farmácias do mundo prescrevem remédios à base de plantas. Existem países (Reino Unido, (Pharmacopoeia, 2007) Rússia, Alemanha (Blumenthal, 1998)) que possuem farmácias fitoterápicas separadas. A sua aplicação está alicerçada nas experiências da medicina popular (medicina tradicional ou popular) ou nas novas pesquisas científicas e resultados experimentais (medicina convencional). Muitas plantas medicinais são aplicadas por automedicação ou por recomendação de um médico ou farmacêutico. Eles são usados de forma independente ou em combinação com drogas sintéticas (medicina complementar). Para uma terapia adequada e aplicada com sucesso, o conhecimento do diagnóstico preciso da doença, bem como de plantas medicinais, ou seja, o efeito farmacológico de seus componentes é essencial. Drogas vegetais e fitopreparações, mais comumente com componentes ativos definidos, ação verificada e, às vezes, eficácia terapêutica, são aplicados como meios terapêuticos. No maior produtor e consumidor europeu de preparações fitoterápicas - Alemanha, a fitoterapia racional é empregada, baseada em aplicações de preparações cuja eficiência depende da dose aplicada e dos componentes ativos identificados, e sua eficácia foi corroborada por testes experimentais e clínicos. Essas preparações foram fabricadas a partir de extratos de

medicamentos vegetais padronizados e atendem a todos os requisitos de qualidade farmacêutica dos medicamentos (Petrovska, 2012).

O maior desafio no controle do diabetes é a prevenção de várias complicações que continuam sendo a principal causa de mortalidade relacionada ao diabetes. Além disso, a durabilidade limitada a longo prazo da monoterapia e os efeitos colaterais indesejáveis dos medicamentos antidiabéticos atualmente usados fundamentam a necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas (Franco et al., 2020; Kong et al., 2021). Os fitoquímicos representam uma fonte rica de moléculas derivadas de plantas que são de importância fundamental para a identificação de compostos com potencial terapêutico (Kong et al., 2021).

2.4 *Bauhinia* sp.

2.4.1 Caracterização Botânica

O gênero *Bauhinia* dedicado aos irmãos Bahuin, botânicos suíços do séc XVI, está incluído na família Fabaceae de acordo com a lista de espécies da Flora do Brasil (Vaz, 2010) (Fig. 8). A possui ampla distribuição incluindo cerca de 650 gêneros e aproximadamente 18000 espécies, representando uma das maiores famílias de angiospermas. No Brasil ocorrem 200 gêneros e 1500 espécies. Recentes estudos filogenéticos apontam reconhecimento de três subfamílias monofiléticas em Fabaceae: *Caesalpinoideae*, *Cercidae* e *Mimosideae* (Vaz e Tozzi, 2005).

Figura 8. Folhas jovens e adultas, ramo com inflorescência terminal de *Bauhinia cheilantha* (Bong).



Fonte: Sobrinho, (2008).

A *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., comumente conhecida como mororó ou pata-de-vaca, é uma leguminosa comum na Caatinga, que é o principal ecossistema do semiárido brasileiro. A espécie possui importância socioeconômica devido ao seu valor forrageiro e medicinal (Gutiérrez et al., 2021). Dentro do gênero *Bauhinia* encontra-se entre as mais abundantes espécies vegetais utilizadas na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo África, Ásia, América Central e do Sul e de forma mais representativa em áreas tropicais. No Brasil, diversas espécies de *Bauhinia* são usadas pela população com finalidade terapêutica, sendo as mais comuns hipoglicemiantes, antidiabéticas (Cechinel Filho, 2009; Yadava and Tripathi., 2007; Pinafo et al., 2019), diuréticas e atuantes no controle do colesterol (Oliveira et al., 2005; De Sousa et al., 2004; Lino et al., 2004; Lim et al., 2006; Lemus, et al., 1999; Ramos et al., 1992). Além de inseticida (Macedo et al., 2007) e antimalárica (Muñoz et al., 2000; June H, et al, 1996; Yadava and Tripathi., 2007).

2.4.1 Fitoquímica

Estudos fitoquímicos apontam que espécies do gênero *Bauhinia* apresentam alcalóides, taninos, mucilagens, óleos essenciais, heteroglicosídeos, cianogênicos, catecol e ácidos voláteis fixos (Gul et al., 2021). Os flavonoides compõem um grupo economicamente importante, sendo utilizados nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica, esses compostos possuem uma série de propriedades medicinais e, muitas destas, estão sendo testadas empiricamente como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, hipocolesterolemizante.

Espécies do gênero *Bauhinia* biossintetizam alcalóides (Maia Neto et al., 2008), bibenzil (Boonphong et al., 2007; de Sousa et al., 2016b; Góis et al., 2017), cianoglicosídeos (de Almeida et al., 2017), lactonas (de Almeida et al., 2017), derivados de oxepina (Pettit et al., 2006; Góis et al., 2013; de Sousa et al., 2016b), esteróides (de Sousa et al., 2016b; Góis et al., 2017), terpenos (de Sousa et al., 2016b; Góis et al., 2017), e especialmente flavonóides (Cechinel Filho, 2009), e exibem efeitos biológicos relevantes, como analgésicos (Panda et al., 2015; Al-Sayed and Abdel-Daim, 2018), antipirético (Panda et al., 2015), anti-inflamatorio (Panda et al., 2015; Al-Sayed e Abdel-Daim, 2018), antimicrobiano (Boonphong et al., 2007; Panda et al., 2015; Chew et al., 2018), antioxidante (Panda et al., 2015; Pinafo et al., 2019),

antiprotozoário (Boonphong et al., 2007; Garbi et al., 2017), citotóxico (Yuenyongsawad et al., 2013; de Sousa et al., 2016b; Góis et al., 2017; Silva et al., 2020); hipoglicêmico (Cechinel Filho, 2009; Pinafo et al., 2019) e larvicida contra *Aedes aegypti* (Góis et al., 2011; Góis et al., 2013; Barbosa et al., 2014; de Sousa et al. 2016a; Silva et al., 2020).

2.4.2 Toxicologia

Estudos detalhados sobre possíveis efeitos tóxicos presentes no gênero *Bauhinia* mostram que a presença das lectinas é deletéria ou tóxicos aos animais e ao homem (Liener, 1994). As lectinas são resistentes ao tratamento térmico, necessitando de um tempo ou temperatura maiores para a degradação completa. Coelho et al. (2001), demonstraram uma possível inibição de peroxidase tireóidea pelo extrato de *B. forficata*. Sugerindo que o consumo crônico poderia levar ao hipotireoidismo e à formação de bócio endêmico. Torna-se essencial que todas as fontes potenciais de alimento sejam examinadas quanto a sua possível toxicidade (Sousa et al., 2020). Com relação a *B. cheilantha* não possui relatos na literatura que possam comprovar sua segurança toxicológica.

2.4.3 Atividades farmacológicas apresentadas pelas plantas do gênero *Bauhinia*

Compostos isolados da *Bauhinia manca* apresentaram significativa atividade antifúngica contra as espécies *Botrytis cinerea*, *Claviceps viridis*, *Coprinus cinereus*, *Rhizoctonia solani* e *Saprolegnia asterophora*. Os compostos com maior atividade foram (2S)-7,4-dihidroxi flavona, (2S)-4-hidroxi-7-metoxi flavona, (2S)-7,3-dimetoxi-4-hidroxi flavona e (2S)-4-acetoxi-7,3-dimetoxi flavona (Achenbach et al., 1935).

Os extratos hidroalcoólicos e de acetato de etila (10 mg/kg) das folhas, caules, cascas e raízes de *B. splendens* apresentaram considerável efeito analgésico quando analisados no modelo de dor causado pelo ácido acético 0,6% em camundongos, sendo mais eficazes do que a aspirina e o paracetamol, dois fármacos amplamente utilizados na clínica (Cechinel filho et al., 1995).

Efeito antinociceptivo e anti-hiperalgésico do extrato hidroalcoólico obtido de partes aéreas de *B. microstachya* nos modelos de dor induzida pela injeção

intraplantar de capsaicina (CAP) e intraperitoneal de ácido acético em camundongos e na hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de diversos agentes flogísticos, como a carragenina (CAR), bradicinina (BK), capsaicina (CAP), substância P (SP) e adrenalina (ADR). O extrato obtido de *B. microstachya* apresentou significativo efeito antinociceptivo quando analisado na nocicepção química induzida pela capsaicina e pelo ácido acético em camundongos. Além disso, o extrato desta planta também apresentou importante redução da hiperalgesia induzida por CAR, BK, CAP, SP e ADR em ratos, substâncias estas envolvidas na transmissão da dor. (Schmeling et al., 2000).

Bauhinia cheilantha, é apresentada na literatura com propriedades antiinflamatórias, antidiabéticas, sedativas, antiparasíticas, digestivas e expectorantes às partes aéreas da planta (Lorenzi e Matos, 2008), e como tal, sua atividade antinociceptiva foi comprovada cientificamente (Silva et al., 2005). Todavia, ainda são escassos os estudos que investiguem sua atividade biológica. Por exemplo, o efeito hipoglicemiante da fração metanólica do extrato foliar foi testado em ratos diabéticos induzidos por aloxano (Almeida et al., 2006).

No Brasil, plantas pertencentes ao gênero *Bauhinia* são relatadas como importantes agentes antidiabéticos; as folhas e casca dessas plantas são utilizados em diferentes fitopreparações para baixar níveis de glicose (da Silva e Cechinel Filho, 2002; Cavalcanti e Favoreto, 2005; Mali et al., 2007). Porém, o uso das plantas através da medicina popular não é suficiente para que ocorra a validação destas como seguras e eficazes. Neste sentido, os estudos farmacológicos e toxicológicos são necessários para que ocorra a pesquisa entre dose/ risco/ benefício do seu uso (Almeida et al., 2009). Espécies consideradas tóxicas produzem metabólitos secundários que pela inalação, ingestão ou contato podem causar alterações patológicas em homens e animais e, em alguns casos, pode levar a sérios distúrbios no organismo e até mesmo o óbito (Vasconcelos et al., 2009; Jesus & Suchara, 2013).

3 OBJETIVOS

3.4 GERAL

Elaborar uma revisão sistemática da literatura sobre o uso de espécies do gênero *Bauhinia* utilizadas no tratamento do diabetes *mellitus*, assim como avaliar a toxicidade oral aguda e de doses repetidas por 28 dias, atividade antidiabética, antihiperlipidêmica e antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Bauhinia cheilantha* (HaEBcl) em ratos.

3.5 ESPECÍFICOS

- a) Realizar uma revisão sistemática do uso do gênero *Bauhinia* no tratamento do DM;
- b) Identificar as principais fontes de heterogeneidade no efeito do tratamento do gênero *Bauhinia* sobre a diabetes experimental.
- c) Determinar o perfil fitoquímico preliminar do HaEBcl;
- d) Avaliar os efeitos hemolíticos e antioxidante *in vitro* do HaEBcl;
- e) Avaliar a toxicidade *in vivo* oral aguda e de doses repetidas do HaEBcl em camundongos;
- c) Quantificar o efeito do HaEBcl na glicemia pós-prandial, ganho ponderal, volume urinário, ingestão alimentar e hídrica, massa de tecido muscular esquelético e adiposo branco retroperitoneal e epididimal de ratos diabéticos;
- d) Determinar os níveis de glicogênio hepático em ratos diabéticos tratados com o HaEBcl;
- e) Quantificar o perfil bioquímico (alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, globulina, glicemia, hemoglobina glicada, fosfatase alcalina, Gama-GT, glicosúria, lactato, ureia, creatinina, albumina, bilirrubina, ácido úrico e proteínas totais) em ratos diabéticos tratados com o HaEBcl;
- f) Determinar o perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, LDL-C e triglicérides e glicerol) em ratos diabéticos tratados com o HaEBcl;
- g) Avaliar os níveis de malondialdeído (MDA), nitrito, proteínas carboniladas, níveis de glutathiona reduzida e oxidada, assim como a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase em ratos diabéticos tratados com o HaEBcl;

4 CONCLUSÕES GERAIS

A administração oral aguda e subcrônica de extratos de folhas de *Bauhinia cheilantha* (HaEBcl) em camundongos não produziu nenhum sinal de toxicidade oral aguda (*in vitro* e *in vivo*) e sub-aguda em camundongos. O valor estimado da DL50 de HaEBcl é superior a 2.000mg / kg em doses agudas orais e superior a 1.000mg / kg em doses subcrônicas orais para camundongos fêmeas e machos. Em geral, HaEBcl pode ser classificado como seguro, com uma ampla margem de segurança toxicológica.

O HaEBcl tem ações antidiabéticas, antihiperglicemiante e antihiperlipidêmicas, provavelmente por ações semelhantes à insulina no controle do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Além disso, este extrato teve ações hepatoprotetora, além de contribuir para redução do intenso estresse oxidativo típico do DM. O estudo mostrou que *B. cheilantha* pode ser um potencial agente terapêutico ou um suplemento dietético para hiperglicemia associada a complicações diabéticas.

REFERÊNCIAS

- A.G. Tabák, et al., Prediabetes: a high-risk state for diabetes development, *Lancet* 379 (9833) (2012) 2279–2290.
- Abbas, G., Al Harrasi, A., Hussain, H., Hamaed, A., & Supuran, C. T. (2019). The management of diabetes mellitus-imperative role of natural products against dipeptidyl peptidase-4, α -glucosidase and sodium-dependent glucose co-transporter 2 (SGLT2). *Bioorganic chemistry*, 86, 305-315.
- Abdul-Ghani M, Puckett C, Adams J, Khattab A, Baskoy G, Cersosimo E, Triplitt C, DeFronzo RA. (2020). Durability of Triple Combination Therapy Versus Stepwise Addition Therapy in Patients with New-Onset T2DM: 3-Year Follow-up of EDICT. *Diabetes Care*. 2021 Feb;44(2):433-439. doi: 10.2337/dc20-0978. Epub 2020 Dec 3. PMID: 33273042; PMCID: PMC7818318.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Ağgöl, A. G., Gür, F., & Gülaboğlu, M. (2020). Streptozotocin-Induced Oxidative Stress in Rats: The Protective Role of Olive Leaf Extract. *Bulletin of the Korean Chemical Society*.
- Almalki, D. A., Alghamdi, S. A., & Al-Attar, A. M. (2019). Comparative study on the influence of some medicinal plants on diabetes induced by streptozotocin in male rats. *BioMed research international*, 2019.
- Almeida, A. C., Sobrinho, E. M., Pinho, L. D., Souza, P. N. S., Martins, E. R., Duarte, E. R., ... & Costa, J. P. R. (2010). Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Ciência Rural*, 40(1), 200-203.
- Almeida, E. R., Guedes, M. C., Albuquerque, J. F. C., & Xavier, H. (2006). Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. *Fitoterapia*, 77(4), 276-278.
- Al-Sayed, E., Abdel-Daim, M.M., (2018). Analgesic and anti-inflammatory activities of epicatechin gallate from *Bauhinia hookeri*. *Drug Development Research* 79, 157– 164.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, Alexandria, v. 30, Suppl. 1, p. S42-S47, dec. 2007. doi: 10.2337/dc07-S042
- Araújo, M. F. M. D., Gonçalves, T. D. C., Damasceno, M. M. C., & Caetano, J. Á. (2010). Aderência de diabéticos ao tratamento medicamentoso com hipoglicemiantes orais. *Escola Anna Nery*, 14(2), 361-367.
- Asenjo, C. E. C., & Camac, L. A. L., (2020). O uso da metformina na gravidez: uma revisão integrativa da literatura. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, (42), e2082-e2082.
- Asmat, U., Abad, K., & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi pharmaceutical journal*, 24(5), 547-553.

Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(9911), 69-82.

Aye, M. M., Aung, H. T., Sein, M. M., & Armijos, C. (2019). A review on the phytochemistry, medicinal properties and pharmacological activities of 15 selected Myanmar medicinal plants. *Molecules*, 24(2), 293.

Bailey, C. J., & Day, C. (1989). Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes care*, 12(8), 553-564.

Barbosa, P.B.B.M., de Oliveira, J.M., Chagas, J.M., Rabelo, L.M.A., de Medeiros, G.F., Giodani, R.B., da Silva, E.A., Uch[^]oa, A.F., Ximenes, M.F.F.M., (2014). Evaluation of seed extracts from plants found in the Caatinga biome for the control of *Aedes aegypti*. *Parasitology Research* 113, 3565–3580.

BATISTA, Thiago M.; HAIDER, Nida; KAHN, C. Ronald. Defining the underlying defect in insulin action in type 2 diabetes. *Diabetologia*, v. 64, n. 5, p. 994-1006, 2021.

BERTUZZI, Suélen Zanoni., (2019). Síndrome metabólica e complicações cardiovasculares em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

Beutler, E., (1984). A manual of biochemical methods. In: Beutler, E. (Ed.), *Red Cell Metabolism*. Greene & Straton Publishers, Philadelphia, pp. 72–136.

Bigagli, E., & Lodovici, M. (2019). Circulating oxidative stress biomarkers in clinical studies on type 2 diabetes and its complications. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.

Bingley, P. J. (2010). Clinical applications of diabetes antibody testing. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(1), 25-33.

Blumenthal, M. (1999). The complete German commission E monographs. Therapeutic guide to herbal medicines.

Bojadzievski, P. (1992). The health services in Bitola through the centuries. *Bitola: Society of science and art*, 1992, 15-27.

Boonphong, S., Puangsombat, P., Baramée, A., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Kittakoop, P., (2007). Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory, and cytotoxic activities. *Journal of Natural Products* 70, 795–801.

Borse SP, Chhipa AS, Sharma V, Singh DP, Nivsarkar M., (2021). Management of Type 2 Diabetes: Current Strategies, Unfocussed Aspects, Challenges, and Alternatives. *Med Princ Pract*. 2021;30(2):109-121. doi: 10.1159/000511002. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32818934.

Brasil: ANVISA; (2014). [Acceso 11/2021]. p. 34. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf 21. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (CO). Medicamentos homeopáticos, fito. Artículo original de investigación/Original research article.

Brito, V. P., de Freitas, M. C., Gomes, D. C., & de Oliveira, S. V., (2020). A fitoterapia como uma alternativa terapêutica complementar para pacientes com Diabetes Mellitus no Brasil: uma revisão sistemática. *Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar*, 9, 189-204.

Britto, M. H. R. M., da Silva, M. D. L. S., & Gonçalves, M. R., (2020). A importância do profissional farmacêutico na qualidade de vida dos pacientes diabéticos idosos. *Research, Society and Development*, 9(7), e258973777-e258973777.

Brown, W.V., (1994). Lipoprotein disorders in diabetes mellitus. *The Medical Clinics of North America* 78, 143–161.

Butler, A. E., Cao-Minh, L., Galasso, R., Rizza, R. A., Corradin, A., Cobelli, C., & Butler, P. C. (2010). Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia*, 53(10), 2167-2176.

Carroll, N.V., Longley R.W., Roe J.H. (1956). The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.* 583-93.

Cechinel, Filho, V., (2009). Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. *Phytotherapy Research* 23, 1347–1354.

Chakrabarti, S., Biswas, T. K., Rokeya, B., Ali, L., Mosihuzzaman, M., Nahar, N., ... & Mukherjee, B. (2003). Advanced studies on the hypoglycemic effect of *Caesalpinia bonducella* F. in type 1 and 2 diabetes in Long Evans rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(1), 41-46.

Chan JCN, Paldánus PM, Mathieu C, Stumvoll M, Matthews DR, Del Prato S., (2021). Early combination therapy delayed treatment escalation in newly diagnosed young-onset type 2 diabetes: A subanalysis of the VERIFY study. *Diabetes Obes Metab.* 2021 Jan;23(1):245-251. doi: 10.1111/dom.14192. Epub 2020 Sep 29. PMID: 32894637.

Chatterjee, S., Khunti, K., & Davies, M. J. (2017). Type 2 diabetes. *The lancet*, 389(10085), 2239-2251.

Chatterjee, S., Khunti, K., & Davies, M. J. (2017). Type 2 diabetes. *The Lancet*, 389(10085), 2239-2251.

Cheng R, Taleb N, Stainforth-Dubois M, Rabasa-Lhoret R., (2021). The promising future of insulin therapy in diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* May 1;320(5):E886-E890. doi: 10.1152/ajpendo.00608.2020. Epub 2021 Mar 15. PMID: 33719586.

Chew, Y.L., Mahadi, A.M., Wong, K.M., Goh, J.K., (2018). Anti-methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds from *Bauhinia kockiana* Korth. And their mechanism of antibacterial activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 18, 70/1-70/9.

Cnop M, Toivonen S, Igoillo-Esteve M, Salpea P., (2017). Endoplasmic reticulum stress and eIF2 α phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic β cells. *Mol Metab.*;6(9):1024–39

- Cox, M. M., & Nelson, D. L. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Wh Freeman.
- da Cruz Lima, F., & Gallotti, F. C. M. (2020). O EFEITO HIPOGLICÊMICO DO ANACARDIUM occidentale EM QUADROS DE DIABETES MELLITUS. *Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-SERGIPE*, 6(2), 113.
- Daneshgari, F., Leiter, E. H., Liu, G., & Reeder, J. (2009). Animal models of diabetic uropathy. *The Journal of urology*, 182(6), S8-S13.
- Dar, R. A., Shahnawaz, M., & Qazi, P. H. (2017). General overview of medicinal plants: A review. *The Journal of Phytopharmacology*, 6(6), 349-351.
- de Almeida, M.C.S., Souza, L.G.S., Ferreira, D.A., Pinto, F.C.L., de Oliveira, D.R., Santiago, G.M.P., Monte, F.J.Q., Braz-Filho, R., de Lemos, T.L.G., (2017). 7-epi-griffonilide, a new lactone from *Bauhinia pentandra*: complete ¹H and ¹³C chemical shift assignments. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89, 65–71.
- de Sousa, L.M., de Carvalho, J.L., Gois, R.W.S., da Silva, H.C., Santiago, G.M.P., Lemos, T.L.G., Arriaga, A.M.C., Alves, P.B., de Matos, I.L., Militão, G.C.G., da Silva, P.B.N., da Silva, T.G., (2016). Chemical composition, larvicidal and cytotoxic activities of the essential oils from two *Bauhinia* species. *Records of Natural Products* 10, 341–348.
- de Souza, B. V. C., Moreira Araújo, R. S. D. R., Silva, O. A., Faustino, L. C., Gonçalves, M. F. B., Dos Santos, M. L., ... & Nunes, L. C. C. (2018). *Bauhinia forficata* in the treatment of diabetes mellitus: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*, 28(2), 129-138.
- DeFronzo, R. A. (2009). From the triumvirate to the „ominous octet”: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clinical Diabetology*, 10(3), 101-128.
- DEFRONZO, R. A.; TRIPATHY, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes care*, v. 32 Suppl 2, 2009.
- Di Cianni, G., Miccoli, R., Volpe, L., Lencioni, C., & Del Prato, S. (2003). Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 19(4), 259-270.
- Dorababu, M., Prabha, T., Priyambada, S., Agrawal, V. K., Aryya, N. C., & Goel, R. K. (2004). Effect of *Bacopa monniera* and *Azadirachta indica* on gastric ulceration and healing in experimental NIDDM rats.
- Dubowski, K. M. (1962). An o-toluidine method for body fluid glucose determination. *Clin Chem* 9: 215-235.
- Erejuwa, O. O. (2012). Oxidative stress in diabetes mellitus: is there a role for hypoglycemic drugs and/or antioxidants. *Oxidative stress and diseases*, 217, 246.
- EVANS, P. L. et al. Regulation of skeletal muscle glucose transport and glucose metabolism by exercise training. *Nutrients*, v. 11, n. 10, p. 1–24, 2019.

Fernandes, C. N; Bezerra, M. M. M., (2020). O Diabetes Mellitus Gestacional: Causa e Tratamento/The Managemental Diabetes Mellitus: Cause And Treatment. **ID on line Revista de psicologia**, v. 14, n. 49, p. 127-139.

Filardi, T., Catanzaro, G., Mardente, S., Zicari, A., Santangelo, C., Lenzi, A., ... & Ferretti, E. (2020). Non-coding RNA: role in gestational diabetes pathophysiology and complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4020.

Forbes, J. M., & Thorburn, D. R., (2018). Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, 14(5), 291-312.

Franco RR, Mota Alves VH, Ribeiro Zabisky LF, Justino AB, Martins MM, Saraiva AL, Goulart LR, Espindola FS., (2020). Antidiabetic potential of Bauhinia forficata Link leaves: a non-cytotoxic source of lipase and glycoside hydrolases inhibitors and molecules with antioxidant and antiglycation properties. *Biomed Pharmacother*. Mar;123:109798. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109798. Epub 2019 Dec 23. PMID: 31877553.

Freychet P, Roth J, Neville DM Jr (1971) Insulin receptors in the liver: specific binding of (125 I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(8):1833–1837. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.8.1833>

Garbi, M.I., Osman, E.E., Kabbashi, A.S., (2017). Comparison of the antiparasitic activity of Bauhinia rufescens leaves extracts and metronidazole against Giardia lamblia. *American Journal of Bioscience and Bioengineering* 5, 104–108.

Gillen, J. B Stephanie Estafanos, and Alexa Govette. Exercise-nutrient interactions for improved postprandial glycemic control and insulin sensitivity. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 46(8): 856-865.

Góis, R.W.S., de Sousa, L.M., da Silva, H.C., da Silva, F.E.F., Pimenta, A.T.A., Lima, M.A.S., Arriaga, A.M.C., Lemos, T.L.G., Braz-Filho, R., Milit~ao, G.C.G., da Silva, P.B.N., Gonçalves, F.J.T., Santiago, G.M.P., (2017). Chemical constituents from Bauhinia acuruana and their cytotoxicity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 27, 711–715.

Gois, R.W.S., de Sousa, L.M., Lemos, T.L.G., Arriaga, A.M.C., Andrade-Neto, M., Santiago, G.M.P., Ferreira, Y.S., Alves, P.B., de Jesus, H.C.R., (2011). Chemical composition and larvicidal effects of essential oil from Bauhinia acuruana (Moric) against Aedes aegypti. *Journal of Essential Oil Research* 23, 59–62.

Góis, R.W.S., de Sousa, L.M., Santiago, G.M.P., Romero, N., R., Lemos, T.L.G., Arriaga, A.M.C., Braz-Filho, R., (2013). Larvicidal activity against Aedes aegypti of pacharin from Bauhinia acuruana. *Parasitology Research* 112, 2753–2757.

Gokyildiz S; Beji, NK., (2005). The effects of pregnancy on sexual life. *J Sex Marital Ther*. 31(3):201- 15.

Gregg BE, Moore PC, Demozay D, et al. (2012), Formation of a human beta-cell population within pancreatic islets is set early in life. *J Clin Endocrinol Metab*.; 97:3197–206.

Guimarães, B. M., Ramos, K. A., de Souza, M. C., Franco, M. L., de Souza Alves, C. C., de Paula Carli, A., & Coqueiro, J. M., (2021). Práticas terapêuticas com plantas medicinais para o tratamento do Diabetes Mellitus. *Research, Society and Development*, 10(10), e474101018874-e474101018874.

Gul H, Awais M, Saddick S, Ahmed Y, Sher Khan F, Ahmed E, Afzal U, Naqvi SMZA, Asghar Khan M, Gulfraz M, Kaukab Raja G., (2020). Quantification of biochemical compounds in *Bauhinia Variegata* Linn flower extract and its hepatoprotective effect. *Saudi J Biol Sci*. 2021 Jan;28(1):247-254. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.09.056.

Gutiérrez, I. E. M., Nepomuceno, C. F., Ledo, C. D. S., & Santana, J. R. F., (2021). Micropropagation and acclimatization of *Bauhinia cheilantha* (an important medicinal plant). *African Journal of Biotechnology*, 10(8), 1353-1358.

H. Yaribeygi, S. L. Atkin, and A. Sahebkar, (2019). “Mitochondrial dysfunction in diabetes and the regulatory roles of antidiabetic agents on the mitochondrial function,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 234, no. 6, pp. 8402–8410.

Halim, E. M. (2003). Lowering of blood sugar by water extract of *Azadirachta indica* and *Abroma augusta* in diabetes rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41(6), 636-640.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The lancet*, 344(8924), 721-724.

Hassanalilou, T., Payahoo, L., Shahabi, P., Abbasi, M. M., Jafar-abadi, M. A., Bishak, Y. K., ... & Barzegar, A. (2017). The protective effects of *Morus nigra* L. leaves on the kidney function tests and histological structures in streptozotocin-induced diabetic rats.

Himsworth HP (2013) Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. 1936. *Int J Epidemiol* 42(6):1594–1598. <https://doi.org/10.1093/ije/dyt203>

Hoeg-Jensen T., (2021). Review: Glucose-sensitive insulin. *Mol Metab*. Apr; 46:101107. doi: 10.1016/j.molmet.2020.101107. Epub 2020 Oct 31. PMID: 33137487; PMCID: PMC8085547.

Holman, R. R., Paul, S. K., Bethel, M. A., Matthews, D. R., & Neil, H. A. W. (2008). 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *New England journal of medicine*, 359(15), 1577-1589.

Home P., (2021). The evolution of insulin therapy. *Diabetes Res Clin Pract*. Apr 20;175:108816. doi: 10.1016/j.diabres.2021.108816. Epub ahead of print. PMID: 33862058.

Ignatavicius, D.D., & Workman, L. (2016). *Medical-surgical nursing: Patientcentered collaborative care* (8th ed.). St. Louis, MO: Elsevier.
International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas* (2019) 9th edition, Belgium, Brussels: International Diabetes Federation. Disponível em <
https://diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133352_2406-IDF-ATLAS-SPAN-BOOK.pdf> acesso em jan, 2021.

Islam MS. Diabetes: From Research to Clinical Practice. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1307:1-5. doi: 10.1007/5584_2020_553. PMID: 32583142.

Johansen, J. S., Harris, A. K., Rychly, D. J., & Ergul, A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular diabetology*, 4(1), 1-11.

Kasuga M, Zick Y, Blithe DL, Crettaz M, Kahn CR (1982) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system. *Nature* 298(5875):667–669. <https://doi.org/10.1038/298667a0>

Katic, R. (1967). The Serbian medicine from 9 th to 19 th centuries. Beograd: Scientific work, 22-37.

Keenan, H. A., Sun, J. K., Levine, J., Doria, A., Aiello, L. P., Eisenbarth, G., ... & King, G. L. (2010). Residual insulin production and pancreatic β -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. *Diabetes*, 59(11), 2846-2853.

Khanna, S. (2000). Thiol antioxidants: protection against oxidative stress and redox regulation of cellular responses. *Kuopion yliopisto*.

Kong M, Xie K, Lv M, Li J, Yao J, Yan K, Wu X, Xu Y, Ye D., (2021). Anti-inflammatory phytochemicals for the treatment of diabetes and its complications: Lessons learned and future promise. *Biomed Pharmacother*. Jan; 133:110975. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110975. Epub 2020 Nov 16. PMID: 33212375.

Lepore, M., Pampanelli, S., Fanelli, C., Porcellati, F., Bartocci, L., Di Vincenzo, A., ... & Bolli, G. B. (2000). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous injection of long-acting human insulin analog glargine, NPH insulin, and ultralente human insulin and continuous subcutaneous infusion of insulin lispro. *Diabetes*, 49(12), 2142-2148.

Lewis, S.L., Dirksen, S.R., Heitkemper, M.M., & Butcher, L. (2014). *Medical surgical nursing: Assessment and management of clinical problems* (9th ed.). St. Louis, MO: Elsevier.

Lipinski, B. (2001). Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*, 15(4), 203-210.

Long SA, Speake C., (2021). Combination therapy in recent-onset type 1 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. Apr;9(4):191-193. doi: 10.1016/S2213-8587(21)00044-9. Epub 2021 Mar 1. PMID: 33662335.

Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Jr, V. F., Grynberg, N. F., & Echevarria, A. (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química nova*, 25(3), 429-438.

Macleod JJR (1922) Treatment of diabetes mellitus by pancreatic extracts. *Can Med Assoc J* 12(6):425–426

Malapermal, V., Botha, I., Krishna, S. B. N., & Mbatha, J. N. (2017). Enhancing antidiabetic and antimicrobial performance of *Ocimum basilicum*, and *Ocimum*

sanctum (L.) using silver nanoparticles. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6), 1294-1305.

Maritim, A. C., Sanders, A., & Watkins Iii, J. B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 17(1), 24-38.

Mark Percival, (1996). Antioxidants. *Clinical Nutrition insights*. NUT031 1/96 Rev. 10/98.

McCance, K., Huether, S., Brashers, V., Rote, N. (2014). *Pathophysiology: The basis for disease in adults and children* (7th ed.). St. Louis, MO: Mosby.

Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*, 247(10), 3170-3175.

Moreira, L. M., & Lyon, J. P., (2020). Hemoglobina, auto oxidação, geração de radicais livres, lesão tecidual e estresse oxidativo: Interessante correlação associada aos acidentes vasculares. *PUBVET*, 14, 141.

Moussa, S. A. (2008). Oxidative stress in diabetes mellitus. *Romanian J biophys*, 18(3), 225-236.

Muneer M., (2021). Hypoglycaemia. *Adv Exp Med Biol.*; 1307:43-69. doi: 10.1007/5584_2020_534. PMID: 32406022.

Murphy R, Ellard S, Hattersley AT., (2008). Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic betacell diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. Apr;4(4):200–13.

Nathan, D. M., Buse, J. B., Davidson, M. B., Ferrannini, E., Holman, R. R., Sherwin, R., & Zinman, B. (2009). Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*, 32(1), 193-203.

Nazarian-Samani, Z., Sewell, R. D., Lorigooini, Z., & Rafieian-Kopaei, M. (2018). Medicinal plants with multiple effects on diabetes mellitus and its complications: A systematic review. *Current diabetes reports*, 18(10), 1-13.

Oguntibeju, O. O. (2019). Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, 11(3), 45.

Paiva Filho, P. F., da Silva, K. G., Passos, A. C., de Souza, A. B. C., Mota, M. L. B. R., & de Sousa, M. N. A., (2021). USO DA METFORMINA COM ÊNFASE EM PACIENTES CARDÍACOS. *Revista JRG de Estudos Acadêmicos*, 4(9), 257-266.

Panda, P., Das, D., Dash, P., Ghosh, G., (2015). Therapeutic potential of *Bauhinia racemose*- a mini review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 32, 169–179.

Pasquel FJ, Lansang MC, Dhatariya K, Umpierrez GE., (2021). Management of diabetes and hyperglycaemia in the hospital. *Lancet Diabetes Endocrinol.* Mar;9(3):174-188. doi: 10.1016/S2213-8587(20)30381-8. Epub 2021 Jan 27. PMID: 33515493.

Perry RJ, Camporez JP, Kursawe R et al (2015) Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell* 160(4):745–758. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.012>

Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11), 1.

Pettit, G.R., Numata, A., Iwamoto, C., Usami, Y., Yamada, T., Ohishi, H., Cragg, G.M., (2006). Antineoplastic agents. 551. Isolation and structures of bauginiastatins 1-4 from *Bauhinia purpurea*. *Journal of Natural Products* 69, 323–327.

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.

Pharmacopoeia, T. B. (2007). *The British Pharmacopoeia*. 2007 (electronic version). London: British Pharmacopoeia Commission.

Pinafo, M.S., Benedetti, P.R., Gaiotte, L.B., Costa, F.G., Schoffen, J.P.F., Fernandes, G.S.A., Chuffa, L.G.A., Seiva, F.R.F., (2019). Effects of *Bauhinia forficata* on glycaemia, lipid profile, hepatic glycogen content and oxidative stress in rats exposed to Bisphenol A. *Toxicology Reports* 6, 244–252.

Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3342.

Prasanna Kumar KM, Seshadri K, Aravind SR, Deb P, Modi KD, Gopal RA, G VK, Moses CA, Abhyankar M, Revenkar S., (2021). Real-World Observational Study of Glimepiride and Metformin Fixed-Dose Combination Along with Insulin in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus: Indian Experience. *Cureus*. Jan 30;13(1): e13020. doi: 10.7759/cureus.13020. PMID: 33665047; PMCID: PMC7920844.

Rates, S. M. K. (2001a). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5), 603-613.

Rates, S. M. K. (2001b). Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 11(2), 57-69.

Riddle, M. C., Rosenstock, J., & Gerich, J. (2003). The treat-to-target trial: randomized addition of glargine or human NPH insulin to oral therapy of type 2 diabetic patients. *Diabetes care*, 26(11), 3080-3086.

Rizzato, A. C., Silva, V. R. S., & de Brito Soyer, A. (2021). Doença Renal Do Diabetes: A Importância Do Diagnóstico E Tratamento Precoces. *Saúde (Santa Maria)*, 47(1).

Rodrigues, L. O., Mourão, S. C., & Gouvêa, M. M., (2021). Produção científica de 2010 a 2018 sobre o controle de qualidade de espécies vegetais incluídas na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência &*

Tecnologia (Health Surveillance under Debate: Society, Science & Technology)–Visa em Debate, 9(2), 21-27.

Roep, B. O., & Peakman, M. (2011). Diabetogenic T lymphocytes in human type 1 diabetes. *Current opinion in immunology*, 23(6), 746-753.

Rosenstock, J., Davies, M., Home, P. D., Larsen, J., Koenen, C., & Schernthaner, G. (2008). A randomised, 52-week, treat-to-target trial comparing insulin detemir with insulin glargine when administered as add-on to glucose-lowering drugs in insulin-naïve people with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 51(3), 408-416.

ROWLAND, A. F.; FAZAKERLEY, D. J.; JAMES, D. E. Mapping Insulin/GLUT4 Circuitry. *Traffic*, v. 12, n. 6, p. 672–681, 2011.

Santangelo, C., Zicari, A., Mandosi, E., Scazzocchio, B., Mari, E., Morano, S., & Masella, R. (2016). Could gestational diabetes mellitus be managed through dietary bioactive compounds? Current knowledge and future perspectives. *British Journal of Nutrition*, 115(7), 1129-1144.

Saravanan, P., Magee, L. A., Banerjee, A., Coleman, M. A., Von Dadelszen, P., Denison, F., ... & Maternal Medicine Clinical Study Group. (2020). Gestational diabetes: opportunities for improving maternal and child health. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 8(9), 793-800.

Seggelke, S.A., & Everhart, B. (2012). Managing glucose levels in hospital patients. *American Nurse Today*, 7(9), 27-31.

Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715-748.

Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., & Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological measurement*, 28(4), R41.

Stamler, I., Vaccaro, O., Neaton, J.D., Wentworth, D., (1993). Diabetes, other risk factors and 12-yr cardiovascular mortality for ment screened in the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes Care* 15, 434–444.

STANFORD, K. I.; GOODYEAR, L. J. Exercise and type 2 diabetes: Molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. *Advances in Physiology Education*, v. 38, n. 4, p. 308–314, 2014.

Tan, S. Y., Wong, J. L. M., Sim, Y. J., Wong, S. S., Elhassan, S. A. M., Tan, S. H., ... & Candasamy, M. (2019). Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(1), 364-372.

Thorwald, J. (1991). Power and knowledge of ancient physicians. Zagreb: August Cesarec, 10-255.

TODAY Study Group. (2012). A clinical trial to maintain glycemic control in youth with type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*, 366(24), 2247-2256.

- Toplak Galle, K. (2005). Domestic medicinal plants. Zagreb: Mozaic book, 60-1.
- Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*, 86(1), 271-278.
- Vaxillaire M, Bonnefond A, Froguel P., (2012). The lessons of earlyonset monogenic diabetes for the understanding of diabetes pathogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* Apr;26(2):171–87.
- Vaz, A. D. F., Bortoluzzi, R. D. C., & da Silva, L. A. E., (2010). Checklist of *Bauhinia sensu stricto* (Caesalpiniaceae) in Brazil. *Plant Ecology and Evolution*, 143(2), 212-221.
- Wolff, F. R., Broering, M. F., Jurcevic, J. D., Zermiani, T., Bramorski, A., de Carvalho Vitorino, J., ... & Santin, J. R. (2019). Safety assessment of *Piper cernuum* Vell.(Piperaceae) leaves extract: Acute, sub-acute toxicity and genotoxicity studies. *Journal of ethnopharmacology*, 230, 109-116.
- Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., Atkin, S. L., & Sahebkar, A., (2020). Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Ye, Jianping. "Mechanisms of insulin resistance in obesity." *Frontiers of medicine* 7.1 (2013): 14-24.
- Yuenyongsawad, S., Bunluepuech, K., Wattanapiromsakul, C., Tewtrakul, S., (2013). Anticancer activity of compounds from *Bauhinia strychnifolia* stem. *Journal of Ethnopharmacology* 150, 765–769.

ANEXO A– Bauhinia genus: Biochemistry on the antihyperglycemic and dyslipidemic effect, cross-sectional study and meta-analysis.

Alanne Lucena de Brito^{1*}, Widarlane Ângela da Silva Alves², Eduardo Carvalho Lira¹.

Abstract

Genus *Bauhinia*, is used in traditional medicine as a hypoglycemic. Given its high empirical use for therapeutic purposes allied to the high interest in research with plants of this genus, this work aimed to carry out a systematic review of the genus *Bauhinia*, seeking evidence-based information on the influence of the use of this plant in culture. Glycemic and lipid profile in experimental models *in vivo*, based on a secondary survey of experimental studies carried out and published on species of this genus. A strategic search was established and a total of 109 articles were found in the search, after excluding duplicate articles and applying the inclusion criteria, only 16 were evaluated in detail. Glucose dosage was the most performed biochemical determination, found in 93% of the studies. Most articles confirmed the hypoglycemic action of *B. forficata* and *Bauhinia variegata* preparations. As for the influence on lipid parameters, there were conflicting results and, as for oxidative stress, few articles on the subject were found, but the results indicated that the use of the ethanol extract of *Bauhinia variegata* affects the oxidative profile in diabetic animals. Furthermore, it was possible to identify the main sources of effect size heterogeneity, which were pointed out by assays of aspartate aminotransferase, urea, total cholesterol, and triglycerides. Thus, it was possible to demonstrate the pharmacological potential of these plant species.

Key-words: Diabetes; Phytochemical; *Bauhinia sp*; Biochemical profile.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is characterized by persistent hyperglycemia, which is due to compromised insulin synthesis by beta cells of the pancreatic islet and/or loss of insulin action in the target tissue (Barbosa et al. 2018). DM is a major health issue which reached alarming levels. Nowadays, around 463 million people globally were diagnosed with DM in 2019 and this is predicted to increase to 700 million by 2045 (IDF, 2019) Chronic complication of DM are caused largely by persistent hyperglycemia-induced cellular and

molecular impairment associated to macrovascular (cardiovascular disease) and microvascular complication (renal failure, neuropathy and retinopathy), which are leading cause of morbidity and mortality in diabetic patients (Cole and Florez, 2018). However, there are many agents now available to glycemic control, its use has been limited by side effects of medicines. In light of that, the use of plants as functional food or alternative medicines has been widely accepted to prevent and treat DM (Chatterjee et al., 2017, Thaipitakwong et al. 2018).

Nowadays, various synthetic drugs with antidiabetic effects are used in clinical. However, these drugs can cause various undesirable side reactions, including weight gain, hypoglycemia, fluid retention, and heart failure, which limit their applications (Beccuti et al., 2017). Numerous of evidences have indicated that herbal medicines and their active ingredients possess anti-diabetics properties with fewer toxicity and adverse effects (Xu et al., 2018).

Complementary and alternative medicine (CAM) has been increasingly used to treat chronic diseases, including a DM (Nazarian-Samani et al., 2018). In this context, traditional herbal medicine is used across the world for disease treatment. The World Health Organization has recommended that clinicians use plant-based drugs to treat DM and its complications.

Self-care practices relevant to self-management of diabetes include adherence to prescribed treatment and clinical management plans, adopting a healthy lifestyle and having a balanced diet (Abdulaziz et al., 2021). In addition, many patients also use complementary and alternative medicine (CAM) (Chang et al., 2007). The WHO defines CAM as a ‘broad set of health care practices that are not part of that country’s own tradition or conventional medicine and are not fully integrated into the dominant health-care system’ (WHO, 2018).

Bauhinia is a genus of about 200 species that can be found in tropical regions all around the world. Almost all of its organs are used to treat various diseases, such as diabetes and asthma. It is estimated that by 2030, the global population will reach approximately 700 million due to diabetes (IDF, 2019).

Its botanical parts have several biological and therapeutic properties (anti-inflammatory, anti-diabetic, hematinic, immunomodulatory, hemagglutinating, antitumor, antimicrobial, hepatoprotective, antibacterial and antiulcer activity) (Kumar et

al., 2020). The flowers of the *Bauhinia variegata* are commonly used for making pickles since it has a unique property that makes them rich in various nutrients such as fat, protein, and oils. e.g (Sharma, et al., 2020).

Bauhinia species are often used in folk medicine to treat type-2 diabetes (Correa, 1984). *Bauhinia forficata* Link, popularly known in Brazil as "Brazilian Orchid-tree" is a Brazilian native plant and the tea prepared with their leaves has been extensively used in the Brazilian traditional practices for the diabetes treatment (Russo et al., 1990; Cechinel, 2000; Ferreres et al., 2012).

However, *Bauhinia* genus constitutes a promising source for obtaining biopharmaceuticals derived from the production of secondary metabolites of the plant species and/or its endophytic micro-organisms, with biological activities of interest, including anti-inflammatory, antinociceptive activity (Koga et al., 2021). It is necessary to know the research that deals with the main characteristics and its micro-organisms, such as botanical, ethnopharmacological, and phytochemical studies, aiming to guide future biological tests on the bioactive action this plant.

Methods

This systematic review was registered on International prospective register of systematic reviews (PORSPERO) guidelines and checklist (Higgins et al., 2021). A protocol was developed as per the SYRCLE protocol guideline.

Data sources and search strategy

The PubMed, Web of Science, Science direct, SCIELO, Google Scholar and PROSPERO databases were searched along the entire timeline. Open Gray was searched for gray literature. Search terms and an example search strategy are listed in Supplemental Table 1. The review was restricted to studies published in English. Studies that focused on the experimental approach with streptozotocin induction. Variations of the following descriptors were used: SC1: *Bauhinia* Genus; SC2: Diabetes's disease; SC3: Experimental models; (SC4: postprandial glucose).

Study selection

Screening and selection were performed independently by two reviewers and in three phases. Titles and abstracts were selected for inclusion of possible relevant studies,

followed by evaluation of full texts for eligibility. Reference lists of included studies were selected. Whether a title was considered relevant; the study was manually searched and the abstract examined. All triage met the search strategy criteria listed in supplemental table 2.

Data extraction and quality assessment

Data on study characteristics, prevalence of animal use (rats, mice), as well as plant species used were extracted. Two reviewers independently assessed the quality of included studies using the quality assessment tool based on the SYRCLE risk of bias tool for animal studies. Quality assessment in the included studies focused on three fields: clarity of inclusion criteria and study design and sampling, adequacy of approaches to data collection and analysis, and measurement of results. Included studies were considered "high quality" if quality criteria were met for at least 7 items, "low quality" for ≤ 2 scores (Sterne et al., 2019; Higgins et al., 2010). All studies were included regardless of their quality.

Data synthesis and analysis

A quantitative synthesis of aggregated level data on prevalence was carried out. Study-specific results were reported as percent prevalence with exact 95% confidence intervals (95% CI). When sufficient data were available for within-study comparisons of prevalence between dichotomous groups, e.g., Glucose, then relative prevalence ratios (PR) along with 95% confidence intervals were calculated. Meta-analyses of proportions and PRs were performed using random-effects meta-analysis models for all endpoints with the Dersimonian-Laird estimator. Heterogeneity was assessed using the I² statistic, the between-study standard deviation and calculation of 95% prediction intervals (95% PrI) for prevalence in a new study Higgins et al., 2003; Higgins et al., 2009). Data are presented in forest plots that include combined estimates where appropriate. All analyzes were performed R statistical software (version 3.5.1, Vienna, Austria).

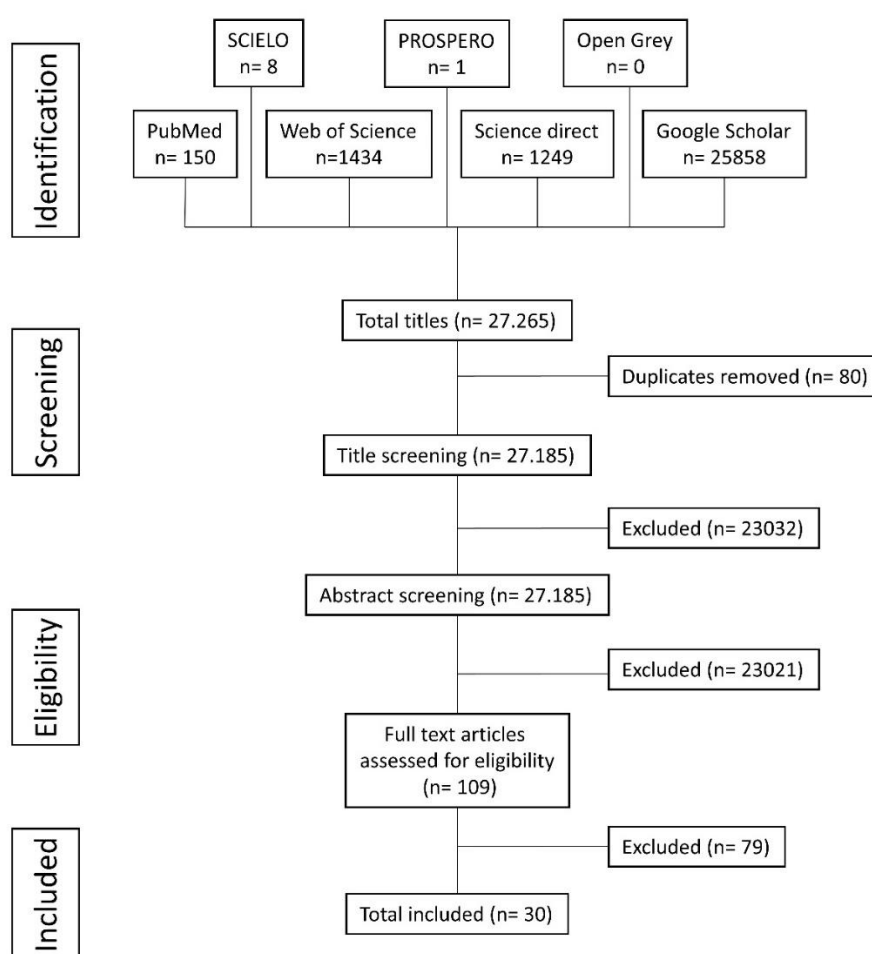
Results

A total of 27,265 exclusive titles were selected, of which 30 articles met the inclusion criteria (Fig. 1). After applying the quality assessment, the studies fell into these categories (8 high quality studies, 22 moderate quality studies, and no low-quality studies). Details of the critical evaluation results are available in Supplementary Table 2.

Study characteristics

The studies included originate from 4 different animal species. Most experiments were recruited to the *wistar* rats. Fifteen of the studies involved treatment with the leaf or bark of the plant in question. The studies included only DMT2 experiments, and five studies used glibenclamide as a positive control, in beyond to metformin and glipizide (Table 2).

Fig 1. Flow diagram of inclusion criteria.



These studies were conducted in different experimental models and using different extractive methods. However, leaves were the most used part of the plant in most experiments. This reflects the fact that the plant genus is widely used empirically by the population in the form of tea from its leaves.

Popular knowledge about the use of this plant as an adjunct in the treatment of diabetes motivated the studies found in the literature. Table 1 shows the studies that evaluated various biochemical parameters in response to the use of the genus *Bauhinia* in different experimental models.

Quality assessment of articles

Table 1 shows the evaluation of the articles according to the points highlighted by West (West et al., 2002). The evaluation of quality criteria for methodological deficiencies in some articles, including: possibility of data extraction (all articles included in the review); experiments not performed on animals (Caro-Ordieres et al., 2020); Review articles (Abdulaziz et al., 2021; Beccuti et al., 2017; Belete, 2020; Chang et al., 2017; Ercole et al., 2014; Higgins et al., 2019); The level of agreement among reviewers regarding data extraction analysis and risk of bias was Substantial agreement (Kappa: 0.6350) (Landis and Koch, 1977).

Table 1. Characterization of studies according to evaluation criteria highlighted by West et al. (2002).

<i>Autor/Year</i>	<i>DOMAINS</i>						
	Sequence generation	Baseline characteristics	Exposure/ Intervention	Random housing	Incomplete outcome data	Statistical Analysis	Results
<i>Kullarni, 2020</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Kullarni, 2016</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Tripathi, 2019</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Pepato, 2002</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Cunha, 2010</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Camaforte, 2019</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Kullarni, 2015</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Kumar, 2017</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Brahmachari, 2015</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Thiruvankatasubramaniam, 2010</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Tiwari, 2014</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Salgueiro, 2015</i>	●	●	●	●	●	●	●

<i>Pepato, 2004</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Sanad, 2012</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Narayan, 2012</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Pinheiro, 2017</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Hado, 2021</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Das, 2012</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Gurjar, 2018</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Brito, 2020</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Hago, 2019</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Elbanna, 2017</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Franco, 2020</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Padgaonkar, 2018</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Gupta, 2015</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Denis, 2018</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Pahwa, 2012</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Abdel-Halim, 2020</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Filho, 2009</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Kour, 2021</i>	●	●	●	●	●	●	●

*  =Yes;  =Partial;  =No information. Kappa: 0. 6350.

Table 2. Study characteristics

Author, year	Journal	Vegetal specie	Part of the plant	(N)	Groups	Animal specie	♂/♀	Weight	Induction dose
Kullarni, 2020	South African Jour. of Botany	<i>B.variegata</i>	leaves	7	C, DM, Dose 250, 500 e 1000mg/kg.	Sprague Dawley	♂	200-220g	55mg/kg STZ
Kullarni, 2016	Biomedicine & Pharmacotherapy	<i>B. variegata</i>	leaves	6	C, DM Dose 250, 500 e 1000mg/kg, DM + glipizide.	Sprague Dawley	♂	180-200g	55mg/kg-DM1/HFD35mg/kg DM2
Tripathi, 2019	Biocatalysis and Agricultural Biotechnology	<i>B.variegata</i>	leaves	6	C, DM, metformin 100 mg/kg, Dose 200mg/kg, 400 mg/kg	Wistar	♂	150-200g	50mg/kg STZ
Pepato, 2002	Jour. of Ethnopharmacology	<i>B. forficata</i>	leaves	?	C, DM, Dose 35.29/7.8 ml/100 g	Wistar	♂	144-160g	40mg/kg STZ

Cunha, 2010	Phytomedicine	<i>B. forficata</i>	leave s	6	C, DM, ODE, SDE, WGE	Wistar	♂	200- 300g	60mg/kg STZ
Das, 2012	Asian Pacific Jour. of Tropical Biomedicine	<i>B. vahlii</i>	bark	6	C, DM, Glibenclamide, Pet. Ether ext, Brnzene Ext, Cholorofom ext, Ethanol ext.	Wistar e Swiss albino	♂	150- 200g e 20-25g	60mg/kg STZ
Camaforte, 2019	Pharmaceutical Biology Oriental	<i>B. holophylla</i>	leave s	8	C, DM, C+400mg7kg ext, Dm+400mg.	Swiss mice	♂	40g	150mg/kg STZ
Kulkarni, 2015	Pharmacy and Experimental Medicine	<i>B. variegata</i>	leave s	5	C, DM, 250, 500 e 1000mg/kg, Glipizide.	Sprague – Dawley	♂	180- 200g	55mg/kg STZ
Kumar, 2017	Clinical Phytoscience	<i>B. racemosa</i>	leave s	6	C, Glibenclamide, 250mg, 500mg7kg	Wistar	♂/ ♀	170- 190g	65mg/kg STZ
Brahmachari, 2015	Exploratory Animal and Medical Research	<i>B. purpurea</i>	bark e leave s	3	C, DM, glibenclamide, BP105, 210,420,115,230,460mg/ kg	Wistar	♂/ ♀	150- 200g	60mg/kg STZ

Thiruvenkatasubramania m, 2010	Der Pharmacia Lettre	<i>B. variegata</i>	leave s	6	C, DM, C+200; C+400; DM+MET, DM+200; DM+400;	Wistar	♂	150- 180g	50mg/kg STZ
Gurjar, 2018	International Jour. of Green Pharmacy	<i>B. variegata</i>	leave s	6	C, DM, DM+250, DM+500, DM+1000, DM+Glipizide	Wistar	♂	180- 240g	150mg Aloxana
Tiwari, 2014	Iranian Jour. of Pharmaceutical Sciences	<i>B. Tomentos a</i>	bark	6	C, DM, 250, 500, 1000, AlcE, DM +glipizide	Wistar	♂	200- 230g	65mg/kg STZ
Salgueiro, 2015	Oxidative Medicine and Cellular Longevity BMC	<i>B forficata</i>	tea of leave s	6	C, DM, C+1mg/ml, Dm+BF1mg/mL	Swiss albino	♂	30-35g	150mg/kg STZ
Pepato, 2004	Complementary and Alternative Medicine	<i>B. forficata</i>	leave s	10	C, DM, glibenclamide, 250mg/kg, (500 mg/kg)	Wistar	♂	130g	50mg/kg STZ
Sanad, 2012	Jour. of Agricultural	<i>B. variegata</i>	leave s	7	C, Glibenclamide, 25 mg / kg, 50 mg / kg, 100 mg / kg, 150 mg / kg.	Swiss albino	-	100- 120g	40mg/kg STZ

Chemistry and
Biotechnology

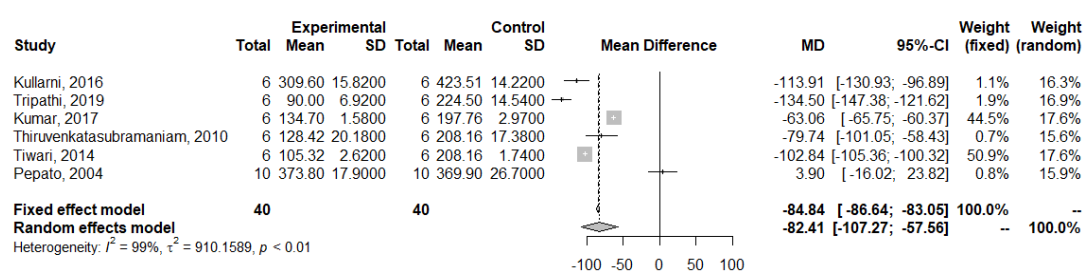
Vegetal species characteristics

Health benefits of dietary flavonoids, including the management of obesity, and diabetes mellitus, are widely known (Caro-Ordieres et al., 2020). In the *Bauhinia* genus it is possible to identify different classes of metabolites of medicinal interest, including terpenes, steroids, alkaloids and especially flavonoids. As noted, *B. forficata*, *B. racemosa* and *B. variegata* are the most frequently studied plants in different parts of the world. Although their phenolic metabolites, in particular flavonoids, seem to be the main active principles detected in these plants, the components responsible for the medicinal properties of another *Bauhinia* spp. are yet to be determined.

Biochemical parameters

The results of the glycemic parameters showed that the use of aqueous, hexane and hydroalcoholic extracts, the n-butanol, benzene and chloroform fraction of different species of the genus *Bauhinia*, was able to reduce the hyperglycemic state in rats and mice, demonstrating the ethnopharmacological value. of this genus for this purpose. Figure 2 shows the potential for heterogeneity of post-pandrial glycemia of different species of the genus *Bauhinia* per study. The significant heterogeneity ($p < 0.01$) was favorable to the treatment ($Q = 0.01$, $df = 2$, $p = 0.99$, $I^2 = 99\%$), with the exception of the study by Pepato et al., (2004), which did not present statistical difference in relation to the diabetic group. The estimate of the overall effect of the studies was observed with the mean difference between groups of -84.84 for the fixed model and -82.41 for the random model.

Fig 2. Forest plot showing postprandial glycemia from treatment with different species of the genus *Bauhinia* in an experimental model of Diabetes.



The treatment of diabetic rats with different extracts from species of the *Bauhinia* genus not only reduced plasma glucose, but also the levels of transaminases, alkaline phosphatase, total proteins, urea and creatinine, which demonstrates a reduction in problems related to carbohydrate and protein metabolism, common in conditions of hyperglycemia, suggesting a possible clinical application of this genus for the treatment of diabetes (Damasceno et al., 2004; Lino et al., 2004; Pepato et al., 2002; Curcio et al., 2012).

Discordant results were found by (Tiwaria et al., 2014; Thiruvengkatasubramaniam and Jayakar, 2010; Kulkarni et al., 2016; Kulkarni et al., 2015; Gurjar et al., 2018) who showed no reduction in albumin and protein levels total after treatment with ethanolic and aqueous extract of the species *B. Tomentosa* and *B. variegata*. This fact can be explained by factors such as the experimental protocol used, the methodology for obtaining extracts, the environmental, seasonal and collection conditions of the plants, in addition to their cultivation and storage. All these factors can qualitatively and quantitatively influence the presence of metabolites characteristic of the genus, important for the development of pharmacological action, such as flavonoids, tannins and phenolic compounds (Silva et al., 2002; Pepato et al., 2010; Souza et al. al., 2010).

Estimates of the effect of biochemical parameters were broadly consistent across all analyzed groups (Fig 3). Studies (Kulkarni et al., 2015; Kulkarni et al., 2016; Gurjar et al., 2018) that reported improvement in liver damage after treatment with *B.variegata*, where alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase have a favorable effect for the treatment (Random MD-3.73; 95% CI -6.03; -1.43 and Random MD-17.88; 95% CI -22.29; -6.71, respectively). Similar effect was shown for creatinine and urea parameters (random MD-0.12; 95% CI -0.13; -0.10 and random MD-8.07 95% CI -9.21; -6.92, respectively).

The evaluation of the heterogeneity of the studies showed that the use of species from the genus *Bauhinia* can improve lipid metabolism Tiwaria et al., 2014; Thiruvengkatasubramaniam and Jayakar, 2010; Pepato et al., 2002; Tripathi et al., 2019; Camaforte et al., 2019; Kulkarni et al., 2016; Gurjar et al., 2018). The overall effect of total cholesterol levels is favorable for treatment (adjusted MD -20.51; 95% CI -21.77; -19.25). Likewise, in triglyceride levels (adjusted MD 18; 95% CI 16.59; 19.41). However, Tiwaria et al., (2014), Thiruvengkatasubramaniam and Jayakar (2010) and Kulkarni et al (2016), showed a reduction in high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels.

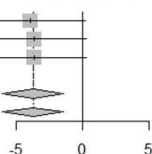
Fig 3. Pooled mean differences for results of alanine aminotransferase-ALT, aspartate aminotransferase-AST, alkaline phosphatase-ALP, total protein-PT, albumin-ALB, creatinine-CR, urea-UR, total cholesterol-CT, triglycerides-TG and high-density lipoprotein-HDL cholesterol.

01 Biochemical parameters

ALT

Study	Total	Experimental Mean	SD	Total	Control Mean	SD	Mean Difference	MD	95%-CI	Weight (fixed)	Weight (random)
Kulkarni, 2015	5	68.73	3.8900	5	72.66	2.7100		-3.93	[-8.09; 0.23]	30.7%	30.7%
Kulkarni, 2016	6	70.02	3.9000	6	73.66	2.9500		-3.64	[-7.55; 0.27]	34.6%	34.6%
Gurjar, 2018	6	70.02	3.9000	6	73.66	2.9500		-3.64	[-7.55; 0.27]	34.6%	34.6%
Fixed effect model	17			17				-3.73	[-6.03; -1.43]	100.0%	--
Random effects model								-3.73	[-6.03; -1.43]	--	100.0%

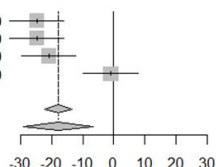
Heterogeneity: $I^2 = 0\%$, $\tau^2 = 0$, $p = 0.99$



AST

Study	Total	Experimental Mean	SD	Total	Control Mean	SD	Mean Difference	MD	95%-CI	Weight (fixed)	Weight (random)
Kulkarni, 2015	6	226.50	8.4400	6	251.30	7.0900		-24.80	[-33.62; -15.98]	24.9%	25.0%
Tripathi, 2019	6	226.50	8.4400	6	251.30	7.0900		-24.80	[-33.62; -15.98]	24.9%	25.0%
Kulkarni, 2016	6	228.90	8.4100	6	249.90	7.0800		-21.00	[-29.80; -12.20]	25.1%	25.0%
Gurjar, 2018	6	248.90	8.4100	6	249.90	7.0800		-1.00	[-9.80; 7.80]	25.1%	25.0%
Fixed effect model	24			24				-17.88	[-22.29; -13.48]	100.0%	--
Random effects model								-17.90	[-29.08; -6.71]	--	100.0%

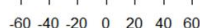
Heterogeneity: $I^2 = 85\%$, $\tau^2 = 110.1283$, $p < 0.01$



ALP

Study	Total	Experimental Mean	SD	Total	Control Mean	SD	Mean Difference	MD	95%-CI	Weight (fixed)	Weight (random)
Kulkarni, 2015	5	152.20	4.9100	5	83.06	3.6900		69.14	[63.76; 74.52]	23.9%	33.3%
Kulkarni, 2016	6	154.50	4.8600	6	167.80	2.1800		-13.30	[-17.56; -9.04]	38.1%	33.3%
Gurjar, 2018	6	154.50	4.8600	6	167.80	2.1800		-13.30	[-17.56; -9.04]	38.1%	33.3%
Fixed effect model	17			17				6.37	[3.74; 9.00]	100.0%	--
Random effects model								14.15	[-35.05; 63.35]	--	100.0%

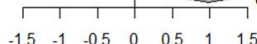
Heterogeneity: $I^2 = 100\%$, $\tau^2 = 1884.6988$, $p < 0.01$



PT

Study	Total	Experimental Mean	SD	Total	Control Mean	SD	Mean Difference	MD	95%-CI	Weight (fixed)	Weight (random)
Kulkarni, 2015	5	7.83	0.1900	5	6.70	0.1500		1.13	[0.92; 1.34]	44.0%	28.9%
Kulkarni, 2016	6	7.79	0.1100	6	6.67	0.3500		1.12	[0.83; 1.41]	23.0%	25.7%
Camaforte, 2019	8	5.60	0.5000	8	5.30	0.4000		0.30	[-0.14; 0.74]	10.1%	19.8%
Gurjar, 2018	6	7.79	0.1100	6	6.57	0.3500		1.22	[0.93; 1.51]	23.0%	25.7%
Fixed effect model	25			25				1.06	[0.92; 1.21]	100.0%	--
Random effects model								0.99	[0.68; 1.30]	--	100.0%

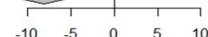
Heterogeneity: $I^2 = 77\%$, $\tau^2 = 0.0745$, $p < 0.01$



UR

Study	Total	Experimental Mean	SD	Total	Control Mean	SD	Mean Difference	MD	95%-CI	Weight (fixed)	Weight (random)
Kulkarni, 2015	5	42.33	1.4100	5	52.91	1.9000		-10.58	[-12.65; -8.51]	30.5%	32.6%
Kulkarni, 2016	6	44.56	1.4100	6	51.52	1.9800		-6.96	[-8.90; -5.02]	34.7%	33.7%
Gurjar, 2018	6	44.56	1.4100	6	51.52	1.9800		-6.96	[-8.90; -5.02]	34.7%	33.7%
Fixed effect model	17			17				-8.07	[-9.21; -6.92]	100.0%	--
Random effects model								-8.14	[-10.45; -5.83]	--	100.0%

Heterogeneity: $I^2 = 75\%$, $\tau^2 = 3.1497$, $p = 0.02$



CR

Study	Total	Experimental Mean	SD	Total	Control Mean	SD	Mean Difference	MD	95%-CI	Weight (fixed)	Weight (random)
Kulkarni, 2015	5	0.82	0.0200	5	0.95	0.0200		-0.13	[-0.15; -0.11]	37.5%	37.5%
Kulkarni, 2016	6	0.84	0.0250	6	0.95	0.0230		-0.11	[-0.14; -0.08]	31.2%	31.2%
Gurjar, 2018	6	0.84	0.0250	6	0.96	0.0230		-0.12	[-0.15; -0.09]	31.2%	31.2%
Fixed effect model	17			17				-0.12	[-0.13; -0.10]	100.0%	--
Random effects model								-0.12	[-0.13; -0.10]	--	100.0%

Heterogeneity: $I^2 = 0\%$, $\tau^2 = 0$, $p = 0.50$

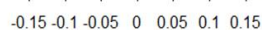
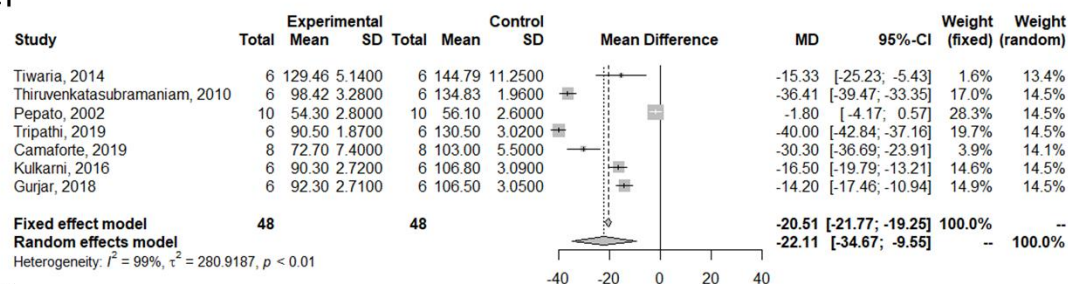


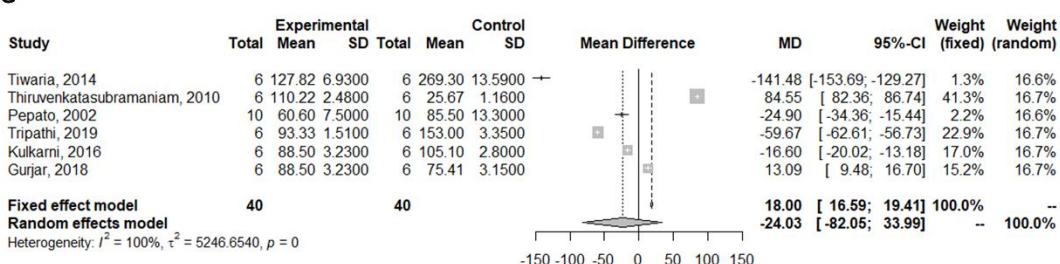
Fig 4. Pooled mean differences for Lipid Profile results for total cholesterol-TC, triglycerides-TG, and high-density lipoprotein-HDL cholesterol.

02 Lipid profile

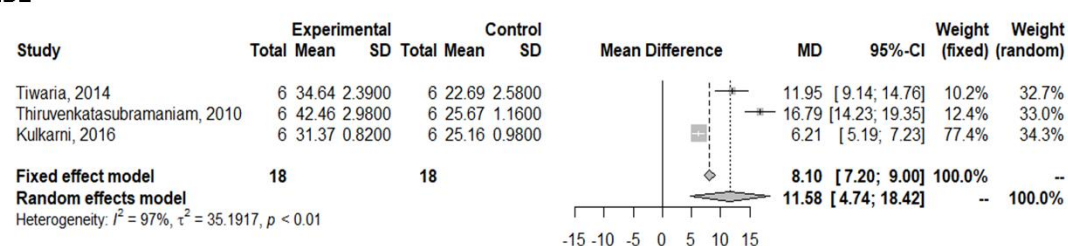
CT



TG



HDL



Discussion

This study provides up-to-date data on the global prevalence of the use of plants of the genus *Bauhinia* in experimental models of diabetes, as reported in the peer-reviewed research literature. Data suggest that groups treated with different extracts and species of this genus improve hyperglycemia and dyslipidemia. However, it was not possible to stratify the results of oxidative stress in relation to diabetes, due to the lack of studies that adequately addressed this issue. Except for the largest study (Kulkarni et al, 2020) the only study in which oxidative stress was addressed according to the inclusion criteria for this review.

These findings that the genus *Bauhinia* has an antidiabetic effect are not surprising. However, this meta-analysis provides an opportunity to systematically estimate the associated absolute and relative effect of these results. One finding that is potentially counterintuitive is that lowering HDL cholesterol compared to diabetics is not a good result when considering the risk of dyslipidemia and cardiovascular disease, which

often accompany patients with diabetes, but more studies are needed to assess these parameters, since there are few articles about it and the results show divergences.

The number of type 2 diabetes cases included in our analysis contributed to the heterogeneity, where it was possible to identify the main sources of effect size heterogeneity, which were pointed out by assays of aspartate aminotransferase, Urea, total cholesterol, and triglycerides.

The resolution of metabolic changes after treatment with species of the genus *Bauhinia* may provide an opportunity to test the effectiveness of interventions for the primary prevention of type 2 diabetes with changes in diet and lifestyle, and the introduction of treatments to prevent or delay the onset of type 2 diabetes. (Narayan et al., 2012). The effectiveness and cost-effectiveness of interventions would need to be tested in clinical trials. In this way, the treatment of diabetes with medicines of plant origin proved to be much safer than synthetic drugs. Furthermore, they are an integral part of many cultures around the world and have gained importance in recent years. India has a rich history of using various potent herbs and herbal components to treat various ailments (Verspohl, 2002).

Conclusions

The present review showed that knowledge of popular origin about medicinal plants is, today, the object of study of several studies, in particular, as a therapeutic alternative for prevalent chronic diseases such as DM. It was observed that several plants widely cultivated in the Brazilian territory have their hypoglycemic effects proven or under analysis, in addition to possible actions on factors secondary to DM, such as oxidative stress and its complications in various organic systems.

However, it was concluded that there is still a long way of research in order to understand more deeply the components of each herbal medicine, its adequate doses, its correct processing, as well as its effects and mechanisms of action in the human body.

References

Abdulaziz S. Alzahrani; Malcolm J. Price; Sheila M. Greenfield; Vibhu Paudyal. Global prevalence and types of complementary and alternative medicines use amongst adults with diabetes: systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Pharmacology* 77:1259–1274; 2021.

Abhishek K. Tripathi, Pushpraj S. Gupta, Sunil K. Singh. Antidiabetic, anti-hyperlipidemic and antioxidant activities of *Bauhinia variegata* flower extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 19, 101142, 2019.

Beccuti G, Monagheddu C, Evangelista A, Ciccone G, Broglio F, Soldati L, Bo S, Timing of food intake: sounding the alarm about metabolic impairments? A systematic review, *Pharmacol. Res.* 125, 132–141, 2017.

Belete, T. M. A recent achievement in the discovery and development of novel targets for the treatment of type-2 diabetes mellitus. *Journal of experimental pharmacology*, 12, 1; 2020.

Brahmachari A: K, Badyopadhyay S.K, Mandal T.K, Brahmachari G, Pattanayal S, Das A.A.K, Batabyal S: Comparative Evaluation of Hypoglycemic Effects Of Two Different Parts Of *Bauhinia Purpurea* Linn. Plant In Stz-Induced Diabetic Albino Wistar Rats. *Explor Anim Med Res*, Vol.5, Issue - 2, p. 120-132, 2015.

Camaforte N.Ap, Saldanha L.L, Vareda P.M.P, Rezende-neto J.M, Senger M.R, Delgado A.Q, Morgan H.J.N, Violato N.M, Pieroni L.G, Dokkedal A.L, Silva-junior F.P. Bosqueiro J.R. Hypoglycaemic activity of *Bauhinia holophylla* through GSK3- β inhibition and glycogenesis activation. *PHARMACEUTICAL BIOLOGY*, VOL. 57, NO. 01, 269–279, 2019.

Caro-Ordieres, T., Marín-Royo, G., Opazo-Ríos, L., Jiménez-Castilla, L., Moreno, J. A., Gómez-Guerrero, C., & Egido, J. The Coming Age of Flavonoids in the Treatment of Diabetic Complications. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 346, 2020.

Chang H, Wallis M, Tiralongo E. Use of complementary and alternative medicine among people living with diabetes: literature review. *J Adv Nurs* 58(4):307–319; 2007.

Chatterjee, S., Khunti, K., & Davies, M. J. Type 2 diabetes. *The Lancet*, 389(10085), 2239-2251; 2017.

Correa, M P. *Dicionário das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, vol. 6, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro; 1984.

Cunha A.M, Menon S, Menon S. Couto A.G, Burger C, Biavatti M.W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. *Phytomedicine* 17, 37–41, 2010.

Ercole FF, Melo LS, Alcoforado CLGC. Revisão integrativa versus revisão sistemática. *Rev Mineira de Enfermagem*, 18(1): 9-12, 2014.

Ferreres, Federico, et al. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. *Food Chemistry*, vol. 134, no 2, p. 894-904; 2012.

Filho, Valdir Cechinel. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, vol. 23, no 10, p. 1347-1354; 2009.

Galvão TF, Pereira MG. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. *Epidemiol. Serv. Saúde Mar*; 23(1): 183-184, 2014.

Gurjar H.P.S, Irchaiya R, Pandey H, Singh P.P. Assessment of antidiabetic potential of leaf extract of *Bauhinia variegata* Linn. in Type-I and Type-II diabetes. *International Journal of Green Pharmacy*, 12 (2) S401, 2018.

Higgins J, Thompson S, Deeks J, Altman D. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 327:557–560, 2003.

Higgins J, Thompson S, Spiegelhalter D. A re-evaluation of random-effects meta-analysis. *J R Stat Soc Ser A Stat Soc* 172:137– 159. 2009.

Landis JR, Koch GG. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 1977. <https://doi.org/10.2307/2529786>.

West S, King V, Carey TS, Lohr KN, McKoy N, Sutton SF, et al. Systems to rate the strength of scientific evidence. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 2002; 47:1–11. R.E.A. Santos et al. 29504410162426102510252616242651525354

Higgins J. P. T., Savović J, Page MJ, Elbers RG, Sterne JAC. Chapter 8: Assessing risk of bias in a randomized trial. In: Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* version 6.2 (updated February 2021). Cochrane, 2021. Available from www.training.cochrane.org/handbook.

Karaman E, Erkin O, Senman S, Yildirim Y. The use of herbal supplements by individuals with diabetes mellitus. *J Pak Med Assoc* 68(4):587–594; 2018.

Koga R. C. R., Santos A. V. T. L. T., Sarquis R. S. F. R., Carvalho J. C. T. *Bauhinia guianensis* Aubl., a Plant from Amazon Biome with Promising Biologically Active Properties: A Systematic Review. *Pharmacogn Rev.* 15(29):76-81; 2021.

Kulkarni Y.A, Garud M.S. *Bauhinia variegata* (Caesalpinaceae) leaf extract: An effective treatment option in type I and type II diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83, 122–129, 2016.

Kulkarni Y.A, Garud M.S. Effect of *Bauhinia variegata* Linn. (Caesalpinaceae) extract in streptozotocin induced type I diabetic rats. *Orient Pharm Exp Med*, 15:191–198, 2015.

Kulkarni Y.A, Laddha A.P. *Bauhinia variegata* leaf extract: An effective management option for diabetic cardiomyopathy. *South African Journal of Botany* 132, 50-58, 2020.

Kumar P, Shaunak I, Verma ML. Biotechnological application of health promising bioactive molecules. In: *Biotechnological production of bioactive compounds*, pp 165–189; 2020.

Kumar V, Rathore K, Jain P, Ahmed Z. Biological activity of *Bauhinia racemosa* against Diabetes and Interlinked Disorders like Obesity and Hyperlipidemia. *Clinical Phytoscience*, 3:7, 2017.

Mbuni, Y. M., Wang, S., Mwangi, B. N., Mbari, N. J., Musili, P. M., Walter, N. O., Hu, G., Zhou, Y., & Wang, Q. “Medicinal Plants and Their Traditional Uses in Local Communities around Cherangani Hills, Western Kenya. *Plants*” (Basel, Switzerland), vol. 9, no. 3, pp. 331, 2020.

Narayan D.S, Jagannath P.V, Chandra D.S. Evaluation of Anti-Inflammatory, Anti-diabetic activity of Indian *Bauhinia vahlii* (stem bark). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S1382-S1387, 2012.

Pepato M.T, Keller E.H, Baviera A.M, Kettelhut I.C, Vendramini R.C Brunetti I.L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 191/197, 2002.

Pepato M.T, Keller E.H, Baviera A.M, Kettelhut I.C, Vendramini R.C Brunetti I.L. Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 4:7, 2004.

Russo, Benedetta, et al. Flavonoids and insulin-resistance: from molecular evidences to clinical trials. *International journal of molecular sciences*, vol. 20, no 9, p. 2061; 2019.

Salgueiro A.C.F, Folmer V, Silva M.P, Mendez A. S.L, Zemolin A.P.P, Posser T, Franco J.L, Puntel R.L, Puntel G.O. Effects of *Bauhinia forficata* Tea on Oxidative Stress

and Liver Damage in Diabetic Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2016, Article ID 8902954, 9, 2016.

Sanad, M. I.; El-Rafey H. H.; Hassan R. A.; Taher M. A.. Evaluation Of Antidiabetic, Antihyperlipidemic And Antioxidant Activities Of The Methanolic Extract Of *Bauhinia Variegata* And *Enterolobium Cyclocarpum* Leaves In Streptozotocin Diabetic Rats. *J. Agric. Chem. and Biotechn.*, Mansoura Univ. Vol. 3 (8): 261 - 275, 2012.

Sharma K., Kumar V., Kumar S., Sharma R., Mehta C. M. *Bauhinia variegata*: a comprehensive review on bioactive compounds, health benefits and utilization. *Advances in Traditional Medicine*. 16 June 2020.

Sterne J A C, Savovic J, Page M J, Elbers R G, Blencowe N S, Boutron I et al. RoB 2: a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials *BMJ* 2019; 366 :l4898 doi:10.1136/bmj.l4898

Thiruvengkatasubramaniam R, and Jayakar. Anti-Hyperglycemic and Anti-Hyperlipidaemic Activities of *Bauhinia variegata* L on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Der Pharmacia Lettre*, 2(5): 330-334, 2010.

Tiwari V, Singh A. Evaluation of Anti-hyperglycemic potential of *Bauhinia Tomentosa* standardized extracts in streptozotocin- induced diabetic rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10 (1): 1- 1, 2014.

Verspohl EJ. Recommended testing in diabetes research. *J Planta Med*; 68: 581-590, 2002.

Vries R.B.M, Hooijmans C.R, Langendam M.W, Luijk J.V, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Wever K.E. A protocol format for the preparation, registration and publication of systematic reviews of animal intervention studies. *Evidence-based Preclinical Medicine* 1, 1, 1–9, e00007, 2015.

Wazaify M, Afifi Fu, El-Khateeb M, Ajlouni K. Complementary and alternative medicine use among Jordanian patients with diabetes. *Complement Ther Clin Pract* 17(2):71–75; 2011.

World Health Organization (2016). WHO Global Report on Diabetes. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565257>. Accessed 14 ago 2021.

World_Health_Orgnization (2018) Traditional, complementary and integrative medicine. https://www.who.int/health-topics/traditional-complementary-and-integrative-medicine#tab=tab_1. Accessed 14 ago 2021.

Xu, Lina, et al. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms. *Pharmacological research*, vol. 130, p. 451-465, 2018.

ANEXO B – Safety assessment of *Bauhinia cheilantha* Bong. Steud leaves extract:
Acute, sub- acute toxicity, antioxidant and antihemolytic evaluations

Alanne Lucena de Britoa, Carla Mirele Tabósa Quixabeiraa, Silvania Tavares Pazb,
Ayala Nara Pereira Gomesc, Thiago Antônio de Souza Araújo, Ulysses Paulino de
Albuquerque, Dayane Aparecida Gomesa, Tania Maria Sarmento Silvac, Eduardo
Carvalho Liraa*

Abstract

Bauhinia cheilantha (Lauraceae), known popularly as pata-de-vaca and mororó has been largely recommended to treat several diseases in folk medicine. However, information on safe doses and use is still scarce. The goal was to evaluate *in vitro* antioxidant and antihemolytic and also acute and sub-acute toxicity effects of hydroalcoholic extract from *B. cheilantha* leaves (HaEBcl). The identification of the compounds in the HaEBcl was performed by ultra-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Antioxidant and hemolytic activity of HaEBcl was evaluated *in vitro*. To study acute toxicity, female mice received HaEBcl in a single dose of 300 and 2.000 mg/kg. Later, sub-acute toxicity was introduced in both female and male mice by oral gavage at 300, 1.000 or 2.000 mg/kg for 28 consecutive days. Hematological and biochemical profiles were created from the blood as well as from histological analysis of the liver. The HaEBcl is rich in flavonoids (quercitrin and afzelin), has no hemolytic effects and moderate antioxidant effects *in vitro*. Acute toxicity evaluation showed that LD50 of HaEBcl was over 2.000mg/kg. Subacute toxicity testing elicited no clinical signs of toxicity, morbidity, or mortality. The hematological and biochemical parameters discounted any chance of hepatic or kidney toxicity. Furthermore, histopathological data did not reveal any disturbance in liver morphology in treated mice. Results indicate that HaEBcl has no hemolytic and moderate antioxidant effects *in vitro*. In addition, a HaEBcl dosage levels up to 2.000 mg/kg is nontoxic and can be considered safe for mammals.

Key-words: Quercitin (PubChem CID; 5280459); Afzelin (PubChem CID 5316673);
Acute toxicity; Sub-acute toxicity; *Bauhinia cheilantha*.

Introduction

The genus *Bauhinia* (Fabaceae, Leguminosae) is composed of large and diversified pantropical plants with about 300 to 350 species, which are known as cow's paw or cow's hoof, because of the shape of their leaves [1,2]. Traditionally, this genus has been used in folk medicine as a remedy for different kinds of diseases, mainly diabetes, pain in general, inflammation, and infections [2,3].

Bauhinia cheilantha (Bong.) Steud. is a shrub or small tree with simple and alternate, leaves split at the apex up to the middle (similar to cow's foot). It is native to the Caatinga (seasonal dry forest), a specific biome from Brazil, where it occurs mainly on stony soils, poor in nutrients, in open formations, and at high altitudes [1]. The areal parts and stem-bark are used in folk medicine in many communities living in the semiarid region of Northeastern Brazil [2]. Some are used to treat diabetes, influenza, pains in general, diabetes, intestinal, stomach and renal problems, as well as a decoction, alcoholic infusion, aqueous infusion, poultice or juice [2,4]. In addition, *B. cheilantha* also has economic and nutritional importance [1]. *B. cheilantha* seeds have a high protein content (~36%), reasonable essential amino acids profile, and low levels of antinutritional compounds [4]. For this reason, this species is widely used for different purposes in local communities in the semiarid region.

However, the general perception that plants, because of their nutritional, medicinal and economic importance, are absent from adverse effects is not only false, but also dangerous. Plants produce bioactive compounds known as secondary metabolites, which play an essential role in defending the plants from biotic and abiotic stress conditions [5]. Even though these molecules can be used for biopharmaceutical purposes, some of them may lead to toxicity, or death in both humans and animals [5,6]. Thus, it is mandatory to trace the toxicological profile of popularly-used herbal medicines.

The aim of this study was to provide scientific data on the safe use of *B. cheilantha*, focusing *in vitro* antihemolytic and antioxidant activity and also acute and sub-acute toxicities through the evaluation of behavioral, biochemical, hematological and histological parameters of the hydroalcoholic extract from *B. cheilantha* leaves (HaEBcl).

Materials and Methods

Plant material and preparation of extract

B. cheilantha leaves were collected in March, 2019 in the town of Altinho, (8°35'13,5" S; 36°5'34,6" W), in the state of Pernambuco, Brazil, and identified by Dr. Ulysses Paulino de Albuquerque (UFPE). A voucher specimen (PEUFR 48653, 46183) has been deposited at the Herbarium of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

The hydroalcoholic extract of *B. cheilantha* leaves (HaEBcl) was prepared by maceration from dried and powdered leaves (100 g) in 100ml of ethanol 80% at room temperature (28 °C) overnight. The HaEBcl was concentrated under pressure, yielding residues of 15.6% in terms of plant material. After preparation, the dried powder extract was stored at room temperature. The HaEBcl was used for preliminary phytochemical analysis and toxicological assays.

Phytochemical analysis

The phytochemical analysis was obtained in negative electrospray mode using an XEVO-G2XSQTOF mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) connected to an ACQUITY UPLC system (Waters, Milford®, MA, USA). The analytical detector was a Waters Acquity PDA detector, which was set to a wavelength range of 200-400 nm. The conditions for obtaining the data by UPLC-ESI-qTOF-MS/MS were set according to Cabrera et al. [7].

The antioxidant activity of HaEBcl.

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay

The radical scavenging activity of HaEBcl was performed against the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) following the methodology of Silva et al. [8]. Stock solution was prepared from the extracts and ethanol fraction in different concentrations (0.10 to 5.0 mg/mL). Through preliminary analysis, appropriate quantities of stock solutions of the samples and 450 µL of the solution of DPPH[•] (23.6 mg/mL in ethanol, EtOH) were transferred to 0.5 mL Eppendorf tubes and the volume was completed with EtOH, following homogenization. Samples were sonicated for 30 min

and placed in a 96-well plate to record the amount of DPPH[•] on a UV-vis (Biochrom EZ Read 2000®) device at a wavelength of 517 nm. Ascorbic acid was used as a positive control and all concentrations were tested in triplicate. The percentage scavenging activity (% SA) was calculated from the equation:

$$\% \text{ SA} = 100 \times \frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})}{\text{Abs}_{\text{control}}}$$

where $\text{Abs}_{\text{control}}$ is the absorbance of the control containing only the ethanol solution of DPPH, and $\text{Abs}_{\text{sample}}$ is the absorbance of the radical in the presence of the sample or standard ascorbic acid.

2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) Scavenging Activity Assay

The 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging action from ethanolic extract of *B. cheilantha* was carried out following the methodology described by Re et al., 1999, in a UV-vis (Biochrom EZ Read 2000) device, using Trolox as the standard compound. The starting concentrations of the solutions of the samples were 0.1–1.0 mg/mL, with the addition of 450 µL of the radical ABTS^{•+} solution to give final concentrations of 2.5–100.0 µg/mL samples. Samples were protected from light and sonicated for 6 min. Absorbance of the samples and the positive control were measured at a wavelength of 734 nm using a microplate of 96 wells. Each concentration was tested in triplicate. The percentage of free radical scavenging activity of ABTS^{•+} was calculated by the equation:

$$\% \text{ SA} = 100 \times \frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})}{\text{Abs}_{\text{control}}}$$

where $\text{Abs}_{\text{control}}$ is the absorbance of the control containing only the ethanol solution of ABTS^{•+} and $\text{Abs}_{\text{sample}}$ is the absorbance of the radical in the presence of the sample or standard ascorbic acid.

The antiradical efficiency was established using linear regression analysis and the 95% confidence interval ($p < 0.05$) obtained using the statistical program GraphPad Prism 5.0. The results were expressed through the value of the average Effective Concentration (EC_{50}), which represents the concentration of the sample necessary to sequester 50% of

the radicals.

In vitro hemolytic assay

The evaluation of the osmotic fragility of red blood cells was performed on a fresh blood sample collected from a healthy rat, using EDTA as anticoagulant [10]. The blood sample was carefully mixed with 0.90% NaCl solution and the mixture was centrifuged (1500 rpm, 15 min). The supernatant was discarded, and this procedure was repeated. The concentrate of red blood cells (5 ml) was added to 1.0 ml of plant extract in different concentrations (corresponding to 0, 25, 50, 100, and 200 mg of plant/ml in 0.9% NaCl solution) and incubated for 60 min at room temperature, with two repetitions for each concentration. Extracts were also prepared of 200 mg/ml containing different concentrations of NaCl (0 up to 0.9%) and incubated with blood samples. The emolytic percentage was determined by measurement of hemoglobin in the supernatants using a commercial kit (BioClin, Belo Horizonte, MG, Brazil) and a spectrophotometer at 540 nm. The experiments were analyzed with paired t-test to verify potential differences between hypotonic and isotonic phases (% concentrations of NaCl) versus relative hemolysis (% hemolysis). The hemolysis rate was calculated as follows:

$$\text{Hemolysis (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{basal}}) / (\text{Abs}_{\text{Total}} - \text{Abs}_{\text{Basal}})] \times 100$$

Experimental animals and ethical statement.

Adult female and male Swiss albino mice (35 ± 3 g, aged 8 – 10 weeks) were obtained from Animal House of the Physiology and Pharmacology Department at Federal University of Pernambuco. Mice were housed with a 12/12 light-dark cycle, $22 \pm 3^\circ\text{C}$ with free access to water and conventional lab chow diet (Purina, Labina®, Brazil). All experiments were performed between 8:00 and 10:00 am. The protocols were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco CEUAUFPE, process #: 23076.004793/2015-42) and conducted in accordance with Guide for the Care and Use Laboratory Animal published by the US National Institutes of Health (NIH publications, 2011).

Acute oral toxicity

The acute toxicity test was performed according to Guideline 423 (acute toxic class method) of the Organization of Economic Co-operation and Development (OECD)

for testing chemicals for acute oral toxicity [11]. After five days of acclimation in a propylene cage, nulliparous and non-pregnant female mice (3 for each group) were fasted for 3h and weighed before extract administration. The HaEBcl was dissolved in saline 0.9% and administered by gavage in mice in single dose using animal feeding needles (100 μ L/100 g b.w.). Animals were randomly divided into three groups with three animals each: (a) treated with saline 0.9% (Control); (b) treated with 300 mg/kg of HaEBcl (HaEBcl300); and (c) treated with 2.000 mg/kg of HaEBcl (HaEBcl2.000).

In the first four hours, all animals were closely observed for piloerection, changes in skin, fur and eyes, toxic effects on the mucous membrane, behavior pattern disorientation, hypoactivity, hyperventilation, asthenia, lethargy, sleep, diarrhea, tremors, salivation, convulsion, coma, motor activity, or death. After this, the animals were continuously observed every 24h daily for 14 days. Parameters such as body weight, food and water intake were monitored daily. On the 14th day, female mice were euthanized by injection of a xylazine (80mg/kg, i.p.) and ketamine (10 mg/kg, i.p.) solution, and the blood and organs were drawn for biochemical and macroscopic analysis. Based on mortality in each group, the LD50 was estimated (Barbosa et al., 2016).

Sub-acute oral toxicity test

The sub-acute toxicity test was conducted according to the Guideline 407 (repeated dose 28-day oral toxicity study in rodent) of the Organization of Economic Cooperation and Development (OECD) to test chemicals for acute oral toxicity [12]. After five days of acclimation in propylene cages, male and nulliparous and non-pregnant female mice were fasted for 3h and weighed before extract administration. The mice were divided into groups of 10, 5 male and 5 female each, to be treated daily over 28 consecutive days by gavage using animal feeding needles (100 μ L/100 g b.w.) The groups were as follows: (a) treated with saline 0.9% (Control); (b) treated with 300 mg/kg of HaEBcl (HaEBcl300); (c) treated with 1.000 mg/kg of HaEBcl (HaEBcl1.000); and (d) treated with 2.000 mg/kg of HaEBcl (HaEBcl2.000).

Animals were weighed weekly and observed for behavioral changes, food and water intake, and general morphological aspect. At the end of the treatment, all animals were anesthetized by intraperitoneal administration of ketamine and xylazine mixture (80 mg and 10 mg/kg, respectively), and euthanized by cervical dislocation. Blood samples were collected for biochemical and hematological analysis and the organs were weighed.

and stored for histopathology (liver).

Biochemical and hematological analysis

Blood collecting

On the 14th and 28th days after treatment, fasted mice rats were anesthetized as described previously; blood was drawn by the retro-orbital technique with or without heparin for both hematological and serum biochemical analysis.

Hematological analysis

On the 14th and 28th days, hematological parameters included red blood cells (RBC), hemoglobin concentration (HBG), hematocrit (HCT), red cell volume distribution (RDW), platelet count (PLT), mean platelet volume (MPV), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), lymphocytes (LYM), and white blood cells (WBC). These were determined by an automatic hematology analyzer (SDH-20, Labtest®, Brazil).

Serum biochemistry

The serum levels of alanine (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), albumin, total protein (TP), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE) were measured with kits from Labtest® in accordance with manufacture's protocol.

Organ mass and histopathological analysis

On the 14th and 28th days, all mice were necropsied after blood collection for anatomical localization and gross examination of visible changes in the organs (aspect, color and size). Selected organs including lungs, heart, liver, kidney, testicles, uterus, ovaries, spleen, adipose tissue, stomach, *soleus* and *extensor digitorum longus* (EDL) muscle. were carefully excised and trimmed of fat and connective tissue before being weighed. The organ weight values were normalized by tibia length. On the 14th and 28th day of treatment, the specimens of liver were fixed in 10% formalin buffer solution for 24 hours at room temperature and washed for four hours with tap water. They were then

dehydrated stepwise using 70~100% EtOH. Dehydrated tissues were made transparent through addition of xylene. Tissues were added to pre-heated paraffin for sufficient infiltration, then cooled, and formed into paraffin blocks before being cut into 5 μm sections using a microtome (Leica® RM 2025, Heidelberg, Germany). The paraffin was removed, and specimens were dehydrated and stained with hematoxylin-eosin for observation with an inverted optical microscope (Leica®, Heidelberg, Germany) coupled to a video camera (Leica® DFC 280, Wetzlar, Germany). The specimens of liver were photographed and analyzed by an experienced pathologist for any cellular damage or change in morphology.

Statistical analysis

The data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. The one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test was employed to analyze the data between treated groups and their respective control groups. *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Phytochemical analysis

The hydroalcoholic extract from *B. cheilantha* was analyzed by ultra-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the profiling and structural characterization of the compounds. The UPLC-DAD chromatograms at 340 nm and base peak ion (BPI) chromatograms of extract are presented in figures 1 and 2, respectively. The compounds were identified based on their characteristic UV-Vis spectra peaks and mass detection as well as the accurate mass measurement of the precursor and product ions. All the compounds detected are listed on table 1. The principal compounds 3 (quercitrin) and 4 (afzelin) were compared with standard samples (Figures 1 and 2).

Four compounds were identified as quercetin glycosides (1, 2, 3 and 5) and two were identified as glycosides of kaempferol (4 and 6). Observation of glycosidic residues pentoside (136 Da), rhamnosyl (146 Da) and glucosyl (162 Da) were cleaved sequentially and generated characteristic aglycone fragments compared to the available literature. Peaks 3 and 4 were compared to the standard and identified as quercitrin and afzelin,

respectively. The mass spectra are shown in figure 2. Compounds 1 and 2 were identified as quercetin hexoside, m/z 463.0818 and quercetin-pentoside m/z 433.0710 $[M-H]^-$ with specific fragmentation at m/z 301.0218 $[M-H-hexose]^-$ and m/z 301.0281 $[M-H-pentose]^-$, corresponding to radical loss from deprotonated molecules, respectively. Compounds 5 and 6 at m/z 599.1011 $[M-H]^-$ and 583.1001 $[M-H]^-$ were identified as quercetin and kaempferol galloyl rhamnosides, respectively. The main fragmentation at m/z 301.0291 and m/z 285.0348 resulted from the loss of a galloyl-rhamnoside moiety.

Antioxidant activity of HaEBcl

As shown in table 2, the radical scavenging activity of the HaEBcl was performed using the radical scavenging abilities of DPPH and ABTS. The HaEBcl was able to inhibit the activity of DPPH radicals ($EC_{50} = 409.5 \mu g/mL$) and also perform an antioxidant activity for ABTS ($EC_{50} = 104 \mu g/mL$).

Hemolytic activity

The result presented in figure 3 showed that HaEBcl did not disrupt the red cell membrane and also preserved the integrity of the erythrocyte membrane in various NaCl concentrations.

Acute oral toxicity (single dose evaluation of HaEBcl)

In acute toxicity testing, administration of a single oral dose of HaEBcl did not produce mortality or any toxic signs or symptoms at the different doses under study. No skin irritation, fur, eyes, mucous membrane toxic effects, piloerection, disorientation, hypoactivity, hyperventilation, asthenia, lethargy, sleep, diarrhea, tremors, salivation, convulsion, coma, motor activity, or death were registered. In addition, body weight gain and food and fluid consumption differences among the groups treated with HaEBcl were not observed (figure 4). Likewise, the macroscopic analysis revealed that HaEBcl did not produce any alteration in organ color, size, shape, or texture, compared to the control.

As shown in tables 3, oral acute toxicity of single dose of the HaEBcl did not produce relative weight organ alteration when compared to control group. In addition, neither any biochemical nor hematological parameters evaluated were statistically

different in oral acute and a single dose treated mice when compared to control group at 14th day of experiment (tables 4 and 5).

Histopathological examination of organs from animals treated with animals with different doses showed normal architecture, suggesting non-harmful changes and morphological disorders induced by single oral dose of HaEBcl at 14th day of treatment (figure 5).

Sub-acute oral test (repeated dose 28-day oral toxicity)

General signs and mortality

All animals survived until scheduled necropsy. The sub-acute oral test was conducted over four weeks (28 days) with three different doses: 300, 1.000 and 2.000 mg/kg/day and control group. The daily observation did not reveal any sign of toxicity, altered behavior or mortality.

Body weight gain, food and fluid intake, and relative organ weight.

Body weight gain, food and fluid intake were compatible with physiological development for females and males during 28 days of treatment (figure 6). The relative tissue weights were not altered by hydroalcoholic extract of *B. cheilantha* leaves (table 6). The organ mass analysis of the target tissues of the treated animals did not show significant ($p < 0.05$) changes when compared with the control group for either sex (table 6).

Biochemical parameters

The treatment with HaEBcl during 28 consecutive days in doses of 300, 1000 and 2.000mg/kg did not change in any biochemical profile in mice of both sexes, as shown in table 7.

Hematological parameters

The oral sub-acute toxicity study did not produce any significant effect on the hematological parameters, after 28 days daily administration (table 8).

Histopathological parameters

B. cheilantha leaves from the sub-acute oral toxicity treatment did not produce any significant ($p < 0.05$) effect on the histopathological examinations of tissues on any of the harvested organs, indicating no treatment-related changes in the treated and control groups (Figure 7).

Discussion

Species belonging to the *Bauhinia* genus are used around the world in traditional medicine for treating dysentery, diarrhea, colds, diabetes, and inflammation [2,13,14,15]. Despite their positive biological effects, the absence of toxicological activity of this and other vegetal species should always be confirmed. Extract of *B. cheilantha* has been used in traditional medicine as a hypoglycemic agent [16]. Despite the popular use and the confirmed biological effects [4,16], there are no studies about its toxicology safety. This study is the first report on the safe use of the hydroalcoholic extract of *B. cheilantha* leaves in mice. We provided clear evidence that HaEBcl did not show any sign of toxicity, neither acute nor sub-acute symptoms *in vivo*. There was moderate antioxidant without hemolytic activity *in vitro*.

Assessment of toxic effect of natural products plays a crucial role in the guarantee for traditional use, in which hemolytic activity is first step towards providing information about the interaction between the active compounds and biological entities at cellular levels [17]. HaEBcl did not display hemolytic activity, probably because it stabilized the red blood cell membrane, reducing hypotonic solution-induced hemolysis. Mammalian cytotoxicity assays were also performed by hemolysis test [18]. Non-toxic effects of the plant extract, shown by absence of hemolytic activity, have also been reported by other researchers [18,19]. It is not clear about what the precise mechanism of plant extract is that stabilizes the erythrocyte membrane. The alteration of the erythrocyte membrane permeability and increase in movement of water and ions cause excessive accumulation of fluid in the cell, allowing the release of hemoglobin [20]. It is possible that HaEBcl and its constituents may interreact with phospholipid and protein cellular membrane of the red blood cells. It is well-known that flavonoids protect erythrocyte membrane

stability against hypotonic lysis [21]. In addition, stabilization of the erythrocyte membrane, by reducing the release of lytic enzymes, may contribute towards its anti-inflammatory property. Although this aspect was not the aim of this study, it should be noted that the antihemolytic activity can be associated with an anti-inflammatory property [20]. This suggests that HaEBcl, then, may be used to combat inflammation in the future, with no toxic effects.

Considering the complexity of the phytochemical composition of plant extract, total antioxidant properties need to be evaluated, using at least two methods [22]. Here, we performed DPPH radical and ABTS scavenging antioxidant tests, which showed a moderate antioxidant activity which may be explained, at least in part, by the presence of flavonoids (quercitrin and afzelin), well-known natural antioxidant molecules [13,23,24]. Both DPPH and ABTS scavenging activities reflect a hydrogen-donating ability to form non radical species which in turn prevents the lipid peroxidation of cellular components [13]. The antioxidant property has been demonstrated in *Bauhinia* genus, such as *B. variegata* [14] and *B. vahalii* [13]. Here, we show that HAEBcl has the ability to scavenge free radicals and may be used as potential natural antioxidant to prevent biological damage caused by oxidative stress. This reinforces the potential use of the HaEBcl in biomedical applications.

Rodent models have been instrumental in helping to answer questions related to traditional use of the plants: in this case, toxicity [25]. Here, HaEBcl had no acute toxic effect in the evaluated doses for Swiss mice with respect to behavior, biochemical, histological, hemolysis activity, and body weight gain, food intake or sudden death. In addition, the non-acute toxicity effect could also suggest that the LD50 of this extract is greater than 2.000mg/kg administered by oral route in mice. In accordance with OECD guidelines, HaEBcl is classified in category 5, as nontoxic [11]. To the best of our knowledge, there is no scientific report about toxicity of *B. cheilantha*, however *B. holophylla* [26], *B. acuminata* [27] and *B. purpurea* [15] have no acute toxic effect either.

Regulatory authorities require precise biochemical, hematological and histopathological analyses to characterize the toxicological properties of any substance intended for prolonged use [28]. Thus, repeated-dose oral toxicity (sub-acute) may be evaluated after initial information on toxicity has been obtained by acute testing [29]. This strategy may determine the absolute toxic dose and target organ toxicity, and highlight biochemical, hematological and histopathological repercussions in mice. Sub-acute toxicity testing, in our study, elicited no clinical signs of toxicity, morbidity, or

mortality in any of the evaluated doses (300 mg/kg; 1.000 mg/kg and 2.000 mg/kg), which may lead to the inference that these doses could be safely employed in disease treatment. Our data corroborates other studies showing no signs of sub-acute toxicity by hydroalcoholic extracts *Piper cernuum* [10], *B. purpurea* [15] and [30] *Verbena litoralis* up to 1.000mg/kg and 2.000mg/kg, respectively, during at least 28 days.

The 28-day oral sub-acute test revealed that HaEBcl had no deaths or clinical signs of toxicity in any dose evaluated. Body weight and food intake were similar for all the doses evaluated. HaEBcl compromised neither the metabolism of macronutrients and animal growth nor affected intra and extracellular dehydration in mice [31]. In addition, the absence of organ weight modifications, which are a simple and sensitive means for detecting harmful effects of xenobiotics [10] reaffirming the non-toxicity effect of HaEBcl in subacute oral tested mice.

The analysis of blood parameters is relevant for risk evaluation, since changes in the hematological system have a higher predictive value for human toxicity, when data are translated from animal studies [30,32]. In this sub-chronic study, HaEBcl did not elicit any changes in either white or red blood cells, nor in any of the hematological parameters evaluated, illustrating that this extract did not adversely affect animal health.

The liver plays a pivotal role in drug metabolism and biotransformation, and its function and structure must be evaluated in toxicity evaluation. Serum biomarkers are used to assess liver function and damage [32]. An increase in serum content of alanine and aspartate transaminases, as well as reduction in albumin and total protein, are strong indicators of hepatic injury [33]. HaEBcl did not produce any alteration in serum biomarker of the liver function, which was confirmed by the preservation of the normal liver architecture. An increase in serum creatinine and urea levels indicates impaired kidney functions [32]. Similarly, HaEBcl did not alter the kidney functions in any dose evaluated in the oral acute and sub-chronic experiments with mice. It has been demonstrated the protective effect of the *B. variegata* and *B. hookeri* in acute liver and kidney injury induced by thioacetamide [34] and carbon tetrachloride [35] in rats. Taken together, our results suggest that daily administration of HaEBcl in the tested doses does not produce any significant toxicity in female and male mice.

Conclusion

Based on oral acute and sub chronic administration in mice, it may be concluded that hydroalcoholic extract from *B. cheilanta* leaves has no clinical signs of toxicity effect

or mortality in evaluated doses administered to mice. The DL50 value of HaEBcl is of up to 2.000mg/kg in oral acute and up to 1.000mg/kg in oral sub chronic doses for both female and male mice. In general, HaEBcl may be classified to be safe, with a broad safety margin for therapeutic use. In addition, HaEBcl has a potential radical scavenger and the presence of quercitrin and afzelin. This work provides valuable data for the safe use of HaEBcl which should be essential for future pharmacological studies. HaEBcl has a high potential for use in food and drug products, with remarkable benefits for human health.

Conflicts of interest

The authors declare there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant no. 424800/2018-7). We acknowledge the National Institute of Science and Technology - Ethnobiology, Bioprospecting and Nature Conservation (INCT), which is certified by CNPq and financially supported by the Science and Technology Support Foundation of the State of Pernambuco (FACEPE, grant no. APQ-0562-2.01/17) for the partial funding of the study. The English text of this paper has been revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip - TESL (Cambridge University).

References

1. Ana C.C. Silva, Diogo G. Oliveira, Population structure and spatial distribution of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. in two fragments at different regeneration stages in the caatinga, in Sergipe, Brazil, *Rev. Arv. Viçosa*, 2015, **39**, 431-437.
2. Valdir C. Filho, Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*, *Phytother. Res.*, 2009, **23**, 1347 – 1354.

3. Sarahbelle L. Cartaxo, Martha M.A. Souza, Ulysses P. Albuquerque, Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil, *J. Ethnopharmacol.*, 2010, **131**, 326-362.
4. Daniel C. Teixeira, Davi F. Farias, Ana F.U. Carvalho, Mariana R. Arantes, José T.A. Oliveira, Daniele O.B. Sousa, Mirela L. Pereira, Hermogenes D. Oliveira, Manoel Andrade-Neto, Ilka Vasconcelos, Chemical composition, nutritive value, and toxicological evaluation of *Bauhinia cheilantha* seeds: a legume from semiarid regions widely used in folk medicine, *Biomed. Res. Int.*, 2013, 67881.
5. Tasiu Isah, Stress and defense responses in plant secondary metabolites production, *Biol. Res.*, 2019, **52**, 39.
6. Sheeja M. Dicson, Muniasamy Samuthirapandi, Archunan Govindaraju, Pandima D. Kasi, Evaluation of *in vivo* and *in vitro* safety profile of the Indian traditional medicinal plant *Grewia tiliaefolia*, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2015, **73**, 241-247.
7. Sonia P. Cabrera, Celso A. Camara, Tania M.S. Silva, Chemical constituents of flowers from *Geoffroea spinosa* Jacq. (Leguminosae), a plant species visited by bees. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2020, **88**, 1 – 3.
8. João P. Silva, Filipe M. Areias, Fernanda M. Proença, Olga P. Coutinho, O.P., Oxidative stress protection by newly synthesized nitrogen compounds with pharmacological potential, *Life Sci.*, 2006, **78**, 1256 – 1267.
9. Roberta Re, Nicoletta Pellegrini, Anna Proteggente, Ananth Pannala, Min Yang, catherine Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying in improved ABTS radical cation. Decolorization assay, *Free Radic Biol Med.*, 1999, **26**, 1231-1237.
10. Fellippe R. Wolff, Milena F. Broering, Jocilene D. Jurcevic, Taylin Zermiani, Adriana Bramorski, Josiane C. Vitorino, Angela Malheirs, José R. Santin, Safety assessment of *Piper cernuum* Vell. (Piperaceae) leaves extract: Acute, sub-acute toxicity and genotoxicity studies, *J. Ethnopharmacol.*, 2018, **10**, 109-116.
11. Organization for economic cooperation and development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423, Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris. 2001.
12. Organization for economic cooperation and development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 407, Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris. 2001.

13. Kandhasamy Sowndhararajan, Sun Chul Kang, Free radical scavenging activity from different extracts of leaves of *Bauhinia vahlii* Wight & Arn, *Saudi J. Biol. Sci.*, 2013, **20**, 319 – 325.
14. Neha Sharma, Anket Sharma, Gaurav Bhatia, Marco Landi, Marian Brestic, Bikram Singh, Jatinder Singh, Satwinderjeet Kaur, Renu Bhardwaj, Isolation of phytochemicals from *Bauhinia variegata* bark and their *in vitro* antioxidant and cytotoxic potential, *Antioxidants*, 2019, **8**, 492.
15. Sunil Kumar, Rohit Kumar, Y K. Gupta, Surender Singh, *In vivo* anti-arthritis activity of *Bauhinia purpurea* Linn bark extract, *Indian J. Pharmacol.*, 2019, **51**, 25 – 30.
16. Edvaldo R. Almeida, Guedes MC, Albuquerque JFC, Hugo H. Xavier, Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats, *Fitoterapia*, 2006; **77**: 276 – 278.
17. Suganthi N, Muniasamy S, Archunan G, Safety assessment of methanolic extract of *Terminalia chebula* fruit, *Terminalia arjuna* bark and its bioactive constituent 7-methyl gallic acid: *In vitro* and *in vivo* studies, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2018, **92**, 347 – 357.
18. Solranny C.C. Silva, Elton M.A. Braz, Fernando A.A. Carvalho, Carla A.R.S. Brito, Lucas M. Brito, Humberto M. Barreto, Edson C.S. Filho, Durcilene D.A. Silva, Antibacterial and cytotoxic properties from esterified *Sterculia gum*, *J. Biol. Macromol.*, 2020, **164**, 606 – 615.
19. Diana F.S. Aquino, Tamaeh A. Monteiro, Claudia, A.L. Cardoso, Silvia C.H. Vieira, Maria M.C. Vieira, Kely P. Souza, Jaime Amaya-Farfan, Gessika C.B.C. Carvalho, Carolina S. Moura, Priscila N. Morato, Investigation of the antioxidant and hypoglycemic properties of *Alibertia edulis* (L.C. Rich) A.C. Rich. leaves, *J. Ethnopharmacol.*, 2020, **253**.
20. Faraza Javeda, Qaiser Jabeena, Naveed Aslam, Ambreen M. Awanc, Pharmacological evaluation of analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of ethanolic extract of *Indigofera argentea* Burm. F, *J. Ethnopharmacology.*, 2020, **15**, **256**.
21. Sudip Chaudhuri, Anwesha Banerjee, Kaushik Basu, Bidisa Sengupta, Pradeep K. Sengupta, Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects, *Int J Biol Macromol.*, 2007, **41**, 42-8.

22. Ines B. Rejeb, Nahla Dhen, Mohamed Gargouri, Abdennacer Boulila, Chemical composition, antioxidant potential and enzymes inhibitory properties of *Globe artichoke* by-products, *Chem. Biodivers.*, 2020, **6**.
23. Karina L. Silva, Valdir C. Filho, Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico, *Quim Nova*, 2002, **25**, 449–454.
24. Ebru D. Sezer, Latife M. Oktay, Elif Karadadas, Hikmet Memmedov, Nur S. Gunel, Eser Soznem, Assessing Anticancer Potential of Blueberry Flavonoids, Quercetin, Kaempferol, and Gentisic Acid, Through Oxidative Stress and Apoptosis Parameters on HCT-116 Cells, *J. Med. Food*. 2019, **22**, 1118 – 1126.
25. Serge S. Atsafack, Jules-Roger Kuiate, Raymond S. Mouokeu, Martin L.K. Mogtomo, Alembert T. Tchinda, Tamoku J. Dieu, Huguette M. Nana, Rébecca M.E Etame. Lucie Biyiti, Rosalie A.N. Ngane, Toxicological studies of stem bark extract from *Schefflera barteri* Harms (Araliaceae). *BMC Complement. Alter. Med.*, 2015, **15**, 44.
26. Rozza AL, Cesar DA, Pieroni LG, Saldanha LL, Dokkedal AL, De-Faria FM, Souza-Brito AR, Vilegas W, Takahira RK, Pellizzon CH, Antiulcerogenic activity and toxicity of *Bauhinia holophylla* hydroalcoholic extract, *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, 2015, 1 – 9.
27. Ashika V. Padgaonkar, Sachin V. Suryavanshi, Vaishali Y. Londhe, Yogesh A. Kulkarni, Acute toxicity study and anti-nociceptive activity of *Bauhinia acuminata* Linn. Leaf extracts in experimental animal models, *Biomed. Pharmacother.*, 2018, **97**, 60 – 66.
28. Lidiane S. Branquinho, Joyce A. Santos, Claudia A.L. Cardoso, Jonas S. Mota, Ubirajara L. Júnior, Cândida A.L. Kassuya, Arielle C. Arena, Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves, *J. Ethnopharmacol.*, **198**, 372-378.
29. Nazari, S., Rameshrad, M., Hosseinzadeh, H., Toxicological effects of *Glycyrrhiza glabra* (Licorice): A review, *Phytother. Res.*, 2017, **31**, 1635-1650.
30. Rachel de Lima, Camille G. Guex, Andreia R.H. Silva, Cibele L. Lhamas, Karen L.S. Moreira, Rosana Casoti, Rafaela C. Dornelle, Maria I.U.M. Rocha, Marcelo L. Veija, Liliane F. Bauermann, Melânia P. Manfron, Acute and subacute toxicity and chemical constituents of the hydroethanolic extract of *Verbena litoralis* Kunth, *J. Ethnopharmacol.*, 2018, **224**, 76 – 84.

31. Sana Aouachria, Sabah Boumerfeg, Abderrahim Benslama, Faycel Benbacha, Thoraya Guemmez, Seddik Khenouf, Lekhmici Arrar, Abderrahmane Baghiani, Acute, sub-acute toxicity and antioxidant activities (*in vitro* and *in vivo*) of *Reichardia picroide* crude extract, *J. Ethnopharmacol.*, 2017, 208, 105 – 116.
32. Humberto M. Barbosa, Jailson N. Nascimento, Thiago A. Araújo, Filipe S. Duarte, Ulysses P. Albuquerque, Jeymesson R. Vieira, Edson R. Santana, Ricardo Yara, Cláudia S.A. Lima, Dayane A. Gomes, Eduardo C. Lira, Acute toxicity and cytotoxicity effect of ethanolic extract of *Spondias tuberosa* Arruda bark: hematological, biochemical and histopathological evaluation, *An. Acad. Bras. Cienc.*, **88**, 1993-2004.
33. John R. Senior, Alanine aminotransferase: A clinical and regulatory tool for detecting liver injury—Past, present, and future, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2012, **92**, 332–339.
34. Samir A.E. Bashandy, Sally A. El Awdan, Samy M. Mohamed, Enayat A.A. Omara, *Allium porrum* and *Bauhinia variegata* mitigate acute liver failure and nephrotoxicity induced by thioacetamide in male rats, *Indian J. Clin. Biochem.*, 2020, **35**, 147 – 157.
35. Eman Al-Sayed, Mohamed M. Abdel-Daim, Omnia E. Kilany, Maarit Karonen, Jari Sinkkonen, Protective role of polyphenols from *Bauhinia kookeri* against carbon tetrachloride-induced hepato- and nephrotoxicity in mice, *Ren. Fail.*, 2015, **37**, 1198 – 1207.

Figures

Figure 1 – Chromatogram of hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves analyzed by UPLC-DAD

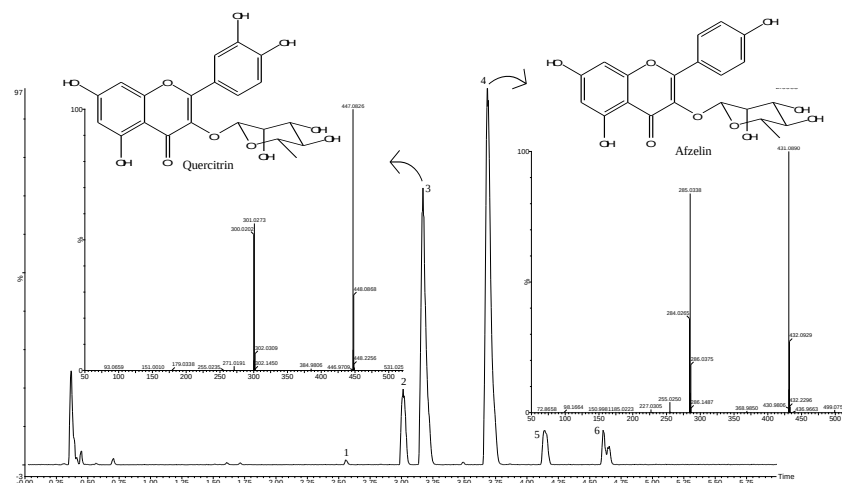


Figure 2 – ESI base peak ion (BPI) chromatogram of hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves analyzed by UPLC-qTOF-MS.

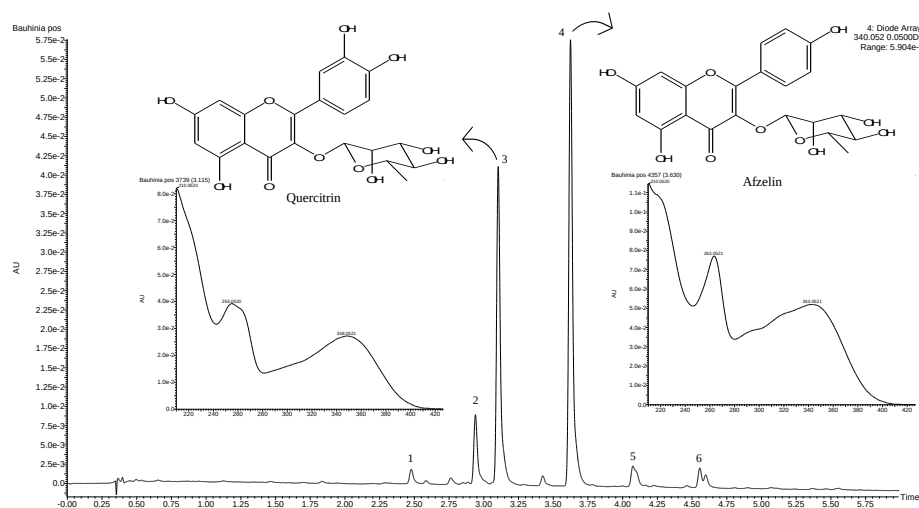


Figure 3 – *In vitro* hemolytic effect of hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves (0 – 200mg/ml) on female mice erythrocyte.

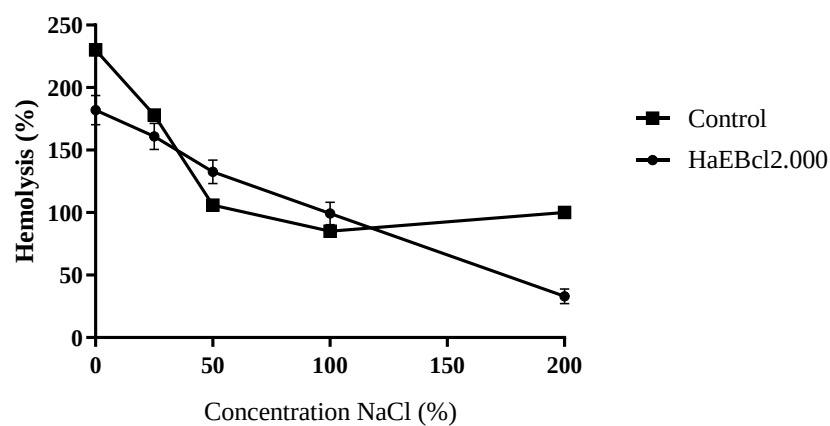


Figure 4 – Effect of hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves through an oral acute toxicity test (single dose) on body weight gain (A), food intake (B) and fluid intake (C) in female Swiss mice.

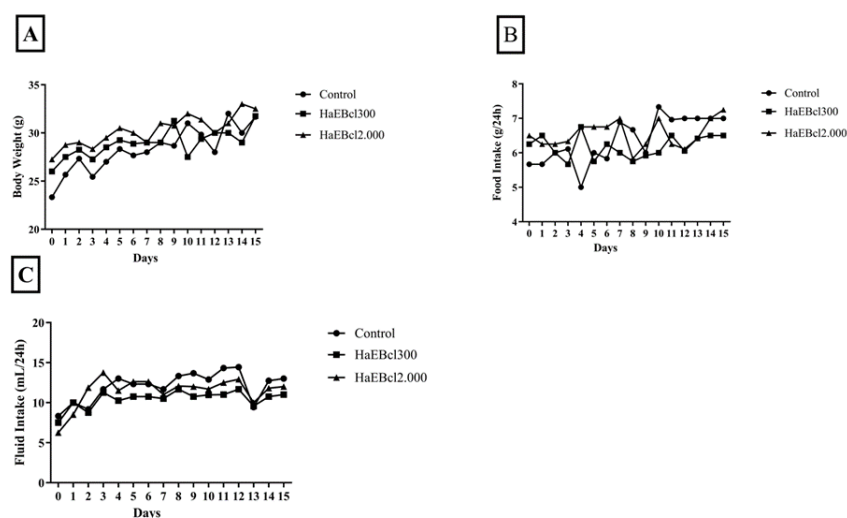


Figure 5 – Histological examination of liver sections from mice treated orally with hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves (300 or 2.000mg/kg) at 14 day in acute single dose toxicity study.

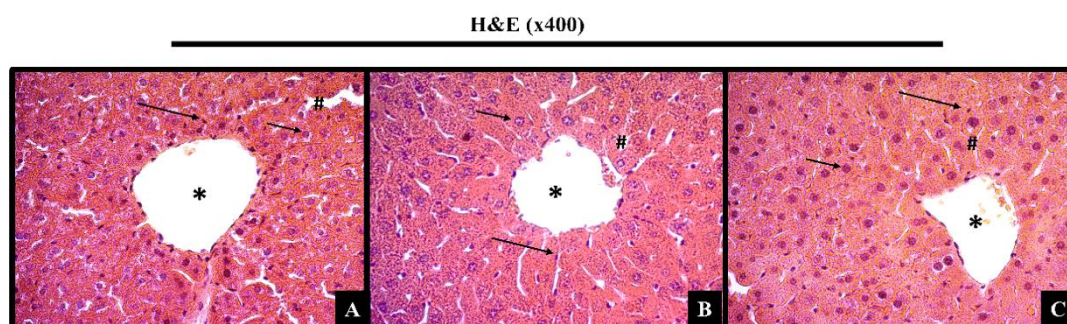


Figure 6 – Effect of sub-acute oral toxicity evaluation of (28 days) of hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves on body weight gain (A and B), food intake (C and D) and fluid intake (E and F) in female and male Swiss mice.

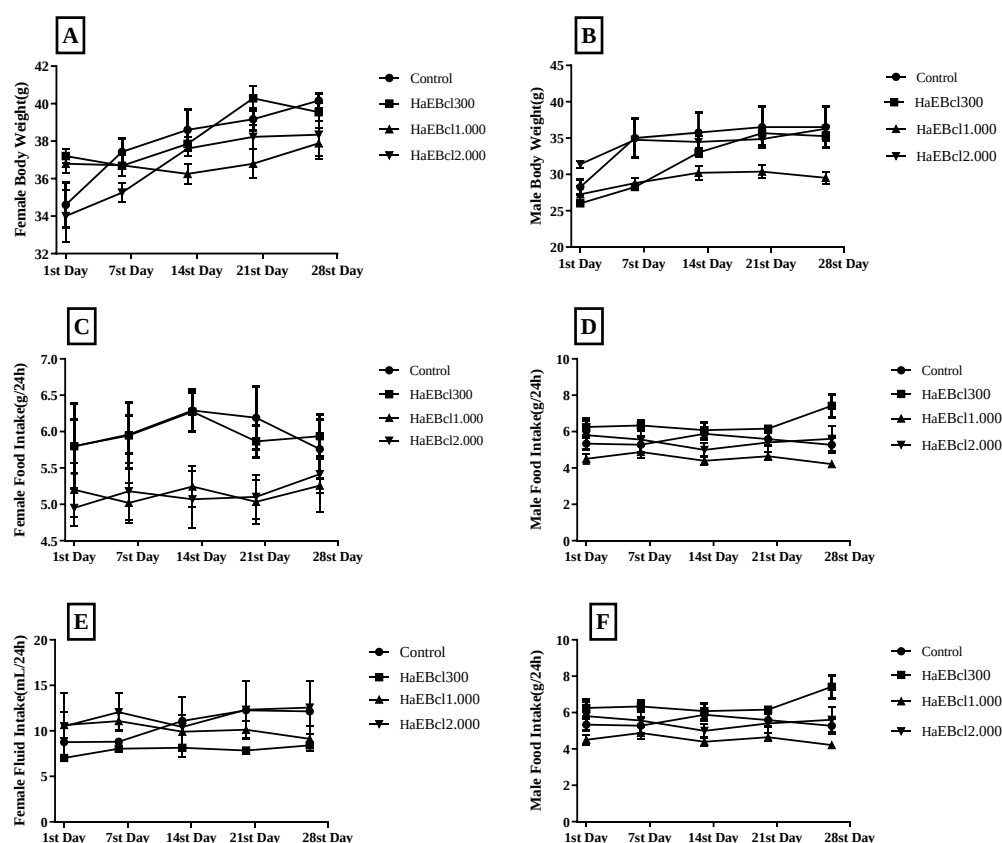
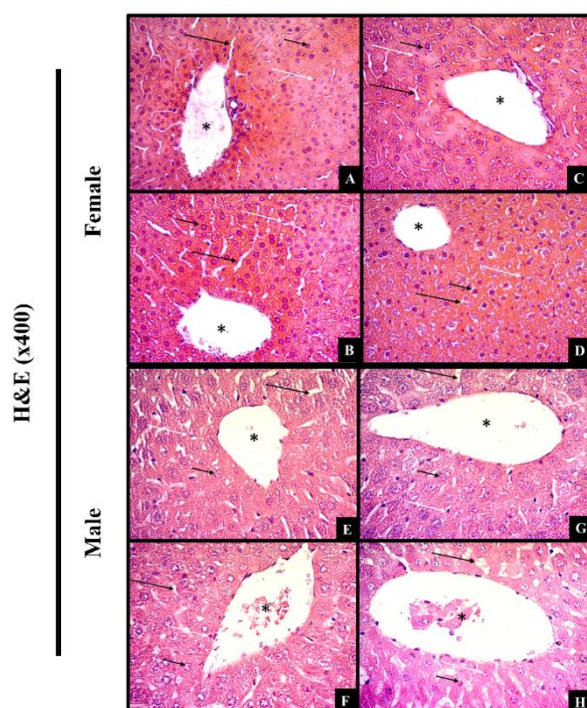


Figure 7 – Histological examination of liver sections from mice treated orally with hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves (300 or 2.000mg/kg) after 28-day sub-acute toxicity study.



Tables

Table 1 – Characterization of compounds from hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves by UPLC/qTOF-MSE.

Compound	RT (min)	UV λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z) experimental	[M-H] ⁻ (m/z) calculated	MS/MS	Identification
1	2.55	349	463.0818	463.0882	301.0218 [M-H-hexose] ⁻	Quercetin hexoside
2	3.01	352	433.0710	433.0776	301.0281 [M-H-pentose] ⁻ , 300.0197 [M-2H-pentose] ⁻ , 271.0391 [M-2H-CO-pentose] ⁻	Quercetin pentoside
3	3.17	255, 349	447.0983	447.0932	301.0277 [M-H-rhamnose] ⁻ , 300.0207 [M-2H-rhamnose] ⁻ , 271.0187 [M-2H-CO-rhamnose] ⁻	Quercitrin*
4	3.68	263, 344	431.0914	431.0983	285.0342 [M-H-rhamnose] ⁻ , 284.0269 [M-2H-rhamnose] ⁻ , 255.0257 [M-	Afzelin*

					2H-CO-rhamnose] ⁻	
5	4.14	348	599.1011	599.1042	445.1307 [M-2H-galloyl] ⁻ , 301.0291 [M-2H-galloyl-rhamnose] ⁻	Quercetin-galloyl-rhamnoside
6	4.61	265, 347	583.1001	583.1093	285.0348 [M-2H-galloyl-rhamnose] ⁻	Kaempferol-galloyl-rhamoside

Table 2 – Determination of antioxidant activity according to EC₅₀ (µg/ml) values of hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves, ascorbic acid and TROLOX samples by DPPH and ABST methods.

Sample	DPPH	ABTS
	EC ₅₀ µg/ml (confidence interval)	EC ₅₀ µg/ml (confidence interval)
<i>Bauhinia cheilantha</i>	409.5 (401.4-420.6)	104.0 (93.0-114.1)
<i>Ascorbic Acid</i>	1.6 (1.4-1.8)	-
<i>Trolox</i>	-	4.1 (3.7-5.8)

*Ascorbic acid and TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were used as reference antioxidants for DPPH and ABTS analysis, respectively.

Table 3 – Effects of hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves by an oral acute toxicity test on absolute total weight gain (g) and relative organ weight in female mice treated at 14th day.

Parameters	Study group
------------	-------------

	Control	300mg/kg HaEB. <i>B.</i> <i>cheilantha</i>	2000mg/kg HaEB. <i>B.</i> <i>cheilantha</i>
Weight gain (g)	28.31±0.58	28.90±0.36	30.24±0.39
Tibia (mm)	18.67±0.7	18.25±0.25	18.25±0.48
Liver (mg/mm)	10.0±0.67	10.0±0.5	102.2±0.5
Kidneys (mg/mm)	2.12±0.17	2.51±0.19	2.26±0.11
Heart (mg/mm)	0.73±0.03	0.80±0.02	0.80±0.06
Lung (mg/mm)	1.04±0.07	1.06±0.10	1.05±0.11
Stomach (mg/mm)	1.42±0.07	1.87±0.13	1.90±0.11
Spleen (mg/mm)	0.73±0.03	0.82±0.6	0.86±0.6
Uterus (mg/mm)	0.49±0.07	0.44±0.04	0.38±0.05
Ovaries (mg/mm)	0.15±0.01	0.15±0.02	0.10±0.01
Adipose tissue (mg/mm)	2.68±0.28	3.53±0.36	3.40±0.15
EDL (mg/mm)	0.04±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01
Soleus (mg/mm)	0.03±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01

Results are expressed as Mean ± SEM. One Way ANOVA variance test was performed followed by Bonferroni test. The difference among groups were considered statically when $p < 0.05$.

Table 4 – Effects of hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves on oral acute toxicity test in biochemical parameters in female mice treated at 14th day.

Parameters	Study group		
	Control	300mg/kg HaEB. <i>B. cheilantha</i>	2000mg/kg HaEB. <i>B.</i> <i>cheilantha</i>
ALT (U/L)	48.00±4.42	61.30±1.85*	61.47.50±2.92*
AST(U/L)	109.40±11.41	93.52±12.08	100.40.71±4.44
AST: ALT Ratio	1.69±0.30	1.53±0.20*	1.64±0.11
TP (g/dL)	5.76±0.23	5.45±0.05	5.65±0.06
Albumin (g/dL)	2.16±0.17	1.90±0.04	2.02±0.23
Urea (mg/dL)	73.13±3.18	70.80±6.664	70.50±4.76
Creatinine (mg/dL)	0.50±0.005	0.55±0.03	0.45±0.05

Results are expressed as Mean $\pm$ SEM. One Way ANOVA variance test was performed followed by Bonferroni test. The difference among groups were considered statically when $p < 0.05$. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE), and total protein (TP).

Table 5 – Effects of hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves on oral acute toxicity test in hematological parameters in female mice treated at 14th day.

Parameters	Study group		
	Control	300mg/kg HaEB. <i>B. cheilantha</i>	2000mg/kg HaEB. <i>B. cheilantha</i>
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	7.15 $\pm$ 0.23	5.33 $\pm$ 0.36	6.71 $\pm$ 0.26
WBC ($10^9/\text{L}$)	3.70 $\pm$ 0.70	2.93 $\pm$ 0.91	3.50 $\pm$ 1.14
LYM (mm^3)	8.83 $\pm$ 0.15	8.65 $\pm$ 1.47	8.39 $\pm$ 0.50
HGB (g/dL)	9.73 $\pm$ 0.48	7.68 $\pm$ 0.57	8.65 $\pm$ 0.30
MCH (%)	13.60 $\pm$ 0.31	13.05 $\pm$ 0.13	12.90 $\pm$ 0.20
MCHC (g/dL)	25.27 $\pm$ 0.52	12.90 $\pm$ 0.20	24.90 $\pm$ 0.21
VCM (fL)	54.00 $\pm$ 0.00	53.00 $\pm$ 0.71	51.75 $\pm$ 0.48
HCT (%)	38.53 $\pm$ 1.41	31.18 $\pm$ 2.17	34.65 $\pm$ 1.33
RDW% (%)	15.23 $\pm$ 0.07	14.85 $\pm$ 0.21	12.75 $\pm$ 1.16
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	619.67 $\pm$ 72.65	582.25 $\pm$ 18.89	716.75 $\pm$ 49.30
VPM (fL)	6.90 $\pm$ 0.55	6.80 $\pm$ 0.85	6.15 $\pm$ 0.61
Segmentados (mm^3)	435.67 $\pm$ 88.79	358.00 $\pm$ 40.64	432.33 $\pm$ 56.67
Monócitos (mm^3)	68.15 $\pm$ 12.97	40.00 $\pm$ 7.01	85.21 $\pm$ 21.70
Eosinófilos (mm^3)	85.12 $\pm$ 43.32	96.11 $\pm$ 38.22	51.24 $\pm$ 33.20

Results are expressed as Mean $\pm$ SEM. One Way ANOVA variance test was performed followed by Bonferroni test. The difference among groups were considered statically when $p < 0.05$. Red blood cells (RBC), hemoglobin concentration (HGB), hematocrit (HCT), red cell volume distribution (RDW), platelet count (PLT), mean platelet volume (MPV), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), white blood cells (WBC), and lymphocytes (LYM).

Table 6 – Effect of sub-acute oral toxicity evaluation of hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves on absolute total body weight gain and relative organ weight in female and male Swiss mice treated for 28 consecutive days.

Sex	Parameters	Study group			
		Control	300mg/kg HaEB. <i>B.</i> <i>cheilantha</i>	1000mg/kg HaEB. <i>B.</i> <i>cheilantha</i>	2000mg/kg <u>HaEB.</u> <i>B.</i> <i>cheilantha</i>
Female	Weight gain (g)	36.66±0.49	33.15±0.52	29.59±0.48	35.58±0.88
	Tibia (mm)	19.3±0.33	16.25±0.48	19.25±0.48	19.20±0.37
	Liver (mg/mm)	8.36±0.60	9.51±0.38	6.71±0.23	7.38±0.67
	Kidneys (mg/mm)	2.09±0.09	1.84±0.04	1.90±0.03	1.99±0.14
	Heart (mg/mm)	0.82±0.03	0.73±0.05	0.73±0.02	0.89±0.08
	Lung (mg/mm)	1.48±0.13	0.96±0.06	1.04±0.17	1.49±0.25
	Stomach (mg/mm)	1.99±0.09	1.80±0.09	0.98±0.03	1.57±0.31
	Spleen (mg/mm)	0.52±0.09	0.69±0.05	0.42±0.08	0.54±0.08
	Uterus (mg/mm)	0.62±0.05	0.56±0.04	0.67±0.13	0.72±0.34
	Ovaries (mg/mm)	0.11±0.02	0.23±0.04	0.16±0.02	0.34±0.18
	Adipose tissue (mg/mm)	8.91±1.32	7.93±0.95	12.70±1.46	9.29±2.17
	EDL (mg/mm)	0.89±0.17	0.69±0.18	0.75±0.23	0.98±0.16
	Soleus (mg/mm)	0.47±0.06	0.35±0.03	0.27±0.06	0.41±0.06
Male	Weight gain (g)	37.99±0.95	38.00±0.79	36.97±0.23	36.68±0.87
	Tibia (mm)	17.20±0.80	20.20±0.86	18.60±0.93	18.50±0.87

Liver (g/100g)	13.04±2.86	13.89±0.83	13.44±0.63	13.79±0.72
Kidneys (mg/mm)	5.22±0.23	4.78±0.34	4.45±0.34	4.06±0.49
Heart (mg/mm)	1.64±0.08	1.37±0.04	1.17±0.07	1.44±0.03
Lung (mg/mm)	3.31±0.33	2.98±0.11	2.29±0.10	2.59±0.25
Stomach (mg/mm)	3.57±0.49	2.49±0.27	2.56±0.25	3.30±0.72
Spleen (mg/mm)	1.15±0.15	0.96±0.08	0.76±0.09	1.03±0.13
Testicles (mg/mm)	1.35±0.07	1.29±0.09	1.37±0.12	1.08±0.13
Adipose tissue (mg/mm)	7.83±0.43	8.59±0.82	5.71±0.60	6.36±0.36
EDL (mg/mm)	0.11±0.07	0.37±0.050	0.31±0.07	0.26±0.13
Soleus (mg/mm)	0.15±0.09	0.06±0.01	0.05±0.02	0.26±0.04

Results are expressed as Mean ± SEM. One Way ANOVA variance test was performed followed by Bonferroni test. The difference among groups were considered statically when $p < 0.05$. Weight gain, weight of heart, liver, and kidneys as normalized by tibial length, adipose tissue, *soleus* muscles and *extensor digitorum longus* (EDL).

Table 7 – Effect of sub-acute oral toxicity evaluation of hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves on biochemical parameters in female and male Swiss mice treated for 28 consecutive days.

Sex	Parameters	Study group			
		Control	300mg/kg HaEB. <i>B.</i> <i>cheilantha</i>	1000mg/kg HaEB. <i>B.</i> <i>cheilantha</i>	2000mg/kg HaEB. <i>B.</i> <i>cheilantha</i>
Female	ALT (U/L)	103.52±6.91	88.5±2.57	100.60±5.73	83.50±5.22
	AST(U/L)	118.70±4.33	100.10±8.67	110.23±9.65	90.71±8.97
	AST: ALT	1.16±0.06	1.82±0.03	1.14±0.03	1.25±0.07
	Ratio				

	TP (g/dL)	7.08±0.52	6.01±0.4	6.57±0.17	6.92±0.29
	Albumin (g/dL)	1.95±0.09	1.82±0.10	2.62±0.09**	2.70±0.07**
	Urea (mg/dL)	65.92±1.05*	54.37±3.43	46.13±3.05	54.8±2.52
	Creatinine (mg/dL)	0.45±0.04	0.26±0.01	0.25±0.02	0.38±0.01
Male	ALT (U/L)	105.58±6.88	98.88±6.04	101.21±1.04	99.39±3.16
	AST(U/L)	145.50±8.94	144.77±14.38	135.15±12.75	147.25±13.00
	AST: ALT Ratio	1.39±0.10	1.55±0.16	1.39±0.11	1.47±0.16
	TP (g/dL)	3.56±0.04	3.57±0.03	3.53±0.04	3.48±0.04
	Albumin (g/dL)	2.11±0.13	1.99±0.04	2.08±0.15	1.84±0.04
	Urea (mg/dL)	79.36±3.47	73.03±4.11	65.21±2.29	81.38±3.21**
	Creatinine (mg/dL)	0.85±0.01	0.69±0.01	0.81±0.05**	0.58±0.05

Results are expressed as Mean ± SEM. One Way ANOVA variance test was performed followed by Bonferroni test. The difference among groups were considered statically when $p < 0.05$. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE), and total protein (TP).

Table 8 – Effect of sub-acute oral toxicity evaluation of hydroalcoholic extract of *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. leaves on hematological parameters in female and male Swiss mice treated for 28 consecutive days.

Sex	Parameters	Study group			
		Control	300mg/kg HaEB. <i>B. cheilantha</i>	1000mg/kg HaEB. <i>B. cheilantha</i>	2000mg/kg HaEB. <i>B. cheilantha</i>
Female	RBC($10^6/\text{mm}^3$)	8.01±0.10	5.68±0.13	7.61±0.11	7.70±0.22
	WBC ($10^9/\text{L}$)	5.50±0.70	3.35±1.25	2.50±0.10	3.71±0.40
	LYM (mm^3)	5.40±0.70	3.70±0.52	1949.31±53.1	3107.60±391.62

	HGB (g/dL)	15.21±0.20	6.28±0.21	13.40±0.10	13.71±0.34
	MCH (%)	18.90±0.22	11.13±0.50	32.91±0.60	30.45±0.60
	MCHC (g/dL)	31.41±0.70	20.88±1.16	34.06±0.90	30.31±0.92
	VCM (fL)	60.01±1.72	53.50±0.50	53.61±1.63	59.10±1.75
	HCT (%)	48.30±1.61	30.30±0.89	40.80±0.91	45.24±1.00
	RDW% (%)	15.00±0.30	13.03±0.59	13.15±0.43	16.94±0.15
	PLT (10 ³ /mm ³)	474.00±69.41	933.00±135.25	532.25±134.66	522.20±199.95
	VPM (fL)	4.90±0.05	6.37±2.26	4.95±0.15	4.87±0.30
	Neutrophils (mm ³)	515.00±43.87	497.00±87.51	483.00±53.60	527.00±88.43
	Monocytes (mm ³)	68.15±12.97	40.00±7.01	46.30±16.80	85.21±21.70
Male	RBC (10 ⁶ /mm ³)	7.86±0.12	8.29±0.17	7.81±0.17	8.42±0.14
	WBC (10 ⁹ /L)	1.38±0.28	1.82±0.11	1.96±0.27	2.02±0.30
	LYM (mm ³)	1.32±0.25	1.78±0.11	1.98±0.34	1.85±0.25
	HGB (g/dL)	14.2±0.27	14.4±0.13	13.76±0.42	14.7±0.26
	MCH (%)	18.4±0.40	17.38±0.32	17.86±0.79	17.45±0.26
	MCHC (g/dL)	35.42±0.27	34.54±0.39	36.02±0.85	35.00±0.44
	VCM (fL)	51.02±0.90	50.34±0.56	50.02±1.28	49.92±0.69
	HCT (%)	40.08±0.74	41.74±0.44	39.1±0.69	42.05±0.45
	RDW (%)	17.00±0.16	17.18±0.21	16.6±0.23	17.68±0.33
	PLT (mm ³)	673.8±22.89	766.8±33.44	709.0±13.59	719.5±51.33
	VPM (fL)	4.84±0.06	4.84±0.04	4.66±0.15	4.875±0.06
	Neutrophils (mm ³)	825.00±32.91	681.00±20.80	720.00±24.15	720.00±30.82
	Monocytes (mm ³)	55.00±0.23	67.00±0.33	45.00±0.50	50.00±0.50

Results are expressed as Mean ± SEM. One Way ANOVA variance test was performed followed by Bonferroni test. The difference among groups were considered statically when $p < 0.05$. Red blood cells (RBC), hemoglobin concentration (HBG), hematocrit (HCT), red cell volume distribution (RDW), platelet count (PLT), mean platelet volume

(MPV), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), white blood cells (WBC), and lymphocytes (LYM).

ANEXO C –Antidiabetic, hypolipidemic and antioxidant effect of the ethanolic extract of the leaves of *Bauhinia cheilantha*

Alanne Lucena de Brito¹, Silvania Tavares Paz², José Carlos da Silva Junior¹, Thiago Antônio de Sousa Araújo³, Eduardo Carvalho Lira¹.

Abstract

Bauhinia cheilantha is a plant native to Brazil and popularly known as “Pata-de-vaca”. The leaves and stem bark are used in folk medicine for various purposes, especially against diabetes. The aim of the present study was to investigate the effect of hydroalcoholic extract of *B. cheilantha* leaves on antidiabetic and antioxidant effects in STZ-induced diabetic rats. Efficacy was compared with a standard hypoglycemic agent, insulin. The rats were divided into four groups (control, diabetic, HaEBcl 150mg/kg, HaEBcl 300mg/kg, insulin). Experimental DM was induced by intravascular injection through jugular injection of streptozotocin 40mg / kg, and after five days diabetes induction, animals with postprandial glucose values equal to or greater than 250mg / dL were considered diabetic. Rat blood plasma was used to determine the biochemical profile (alanine transaminase-ALT, aspartate transaminase-AST and alkaline phosphatase-ALP, bilirubin, creatinine, urea) and oxidative activities (superoxide dismutase-SOD, glutathione-GSH, glutathione reductase- GSSG, nitrite and malondialdehyde -MDA) and lipid profile (cholesterol, HDL, LDL, triglycerides and total lipids). We found that diabetic rats presented liver and kidney misfunction, as it is assessed by the increased levels of AST, ALT, creatinine, urea, and uric acid. Furthermore, STZ induced diabetic dyslipidemia in rats, with increased lipid levels, and its effect on the redox system, causing greater release of free radicals. The treatment based on HaEBcl extract, significantly decreased the glucose concentration in diabetic animals between 1.7 and 1.2 times, improving the levels of AST and ALT. In addition, diabetic rats presented an improved lipid profile after the treatment. Finally, the *in vivo* data confirm this antidiabetic effect mainly due to an oxidative stress decrease and an antioxidant activity reinforcement.

Keywords: postprandial hyperglycemia; Oral tolerance; test medicinal plants; Lipid profile; Streptozotocin.

1. Introdução

Diabetes *mellitus* (DM) é um dos problemas de saúde pública mais comuns (Dzydzan et al., 2019). DM está entre 10 causas de mortalidade em todo o mundo com aproximadamente 4,2 milhões de mortes em 2019. De acordo com o relatório da IDF, 578 milhões de pessoas em todo o mundo terão sido afetadas pelo DM em 2030 (IDF-2019). O diabetes mellitus tipo 2 é um distúrbio metabólico complexo que resulta de defeitos na secreção de insulina e disfunção das células β . A destruição contínua de células β leva à perda progressiva de insulina secretora, culminando em uma falta absoluta de insulina (Hart e Powers, 2019).

As classes atualmente disponíveis de agentes terapêuticos são usadas isoladamente ou em combinações, mas novas opções de tratamento são necessárias, devido aos efeitos colaterais causados como hipoglicemia, ganho de peso, problemas gastrointestinais e náuseas (Belete, 2020). Nesse contexto, as preparações fitofarmacêuticas tradicionais, há muito utilizadas na medicina popular para o tratamento do diabetes, poderiam ser consideradas Patel et al. (2012); Infante-Garcia e Garcia-Alloza (2019). Os flavonóides podem interagir com vários alvos diferentes envolvidos na evolução do diabetes, como α -glicosidase, cotransportador de glicose ou aldose redutase (Nicolle et al., 2011), bem como ter efeitos positivos na prevenção de várias patologias (Xu et al., 2018; Caro-Ordieres et al., 2020; Hussain et al., 2020).

Atualmente, mais de 200 espécies, o gênero *Bauhinia* encontra-se entre as mais abundantes espécies vegetais utilizadas na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo África, Ásia, América Central e do Sul e de forma mais representativa em áreas tropicais. No Brasil, diversas espécies de *Bauhinia* são usadas pela população com finalidade terapêutica, sendo as mais comuns hipoglicemiantes, antidiabéticas (Cechinel Filho, 2009; Pinafo et al., 2019; June H, et al, 1996; Yadava and Tripathi., 2007), diuréticas e atuantes no controle do colesterol (Oliveira et al., 2005; De Sousa et al., 2004; Lino et al., 2004; Lim et al., 2006; Lemus, et al., 1999; Ramos et al., 1992). Além de inseticida (Macedo et al., 2007) e antimalarial (Muñoz et al., 2000; June H, et al, 1996; Yadava and Tripathi., 2007).

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal e preparação do extrato

Folhas de *B. cheilantha* foram coletadas em março de 2019 na cidade de Altinho, (8 ° 35'13,5 "S; 36 ° 5'34,6" W), no estado de Pernambuco, Brasil, e identificadas pelo

Dr. Ulysses Paulino de Albuquerque (UFPE). Um exemplar de comprovante (PEUFR 48653, 46183) foi depositado no Herbário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

O extrato hidroalcoólico de folhas de *B. cheilantha* (HaEBcl) foi preparado por maceração de folhas secas e pulverizadas (100 g) em 100ml de etanol 80% à temperatura ambiente (28 °C) durante a noite. O HaEBcl foi concentrado sob pressão, gerando resíduos de 15,6% em termos de material vegetal. Após a preparação, o extrato em pó seco foi armazenado à temperatura ambiente.

2.2. Animais

Foram utilizados ratos machos jovens da linhagem Wistar (180±10g) provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais, em ambiente controlado com ciclos claro-escuro de 12 horas (ciclo claro: 06h00 às 18h00) e temperatura (23°C ± 2), alimentados com dieta balanceada para ratos (LABINA 5002, 23% de proteínas; 4% de gorduras; 50% carboidratos e 23% e outros componentes) e oferecida água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil (protocolo número 23076.016693/2014-88).

2.3. Design Experimental

Os ratos foram divididos em quatro grupos da seguinte forma:

Grupo I. Ratos controle recebendo tampão de citrato 0,1 M (pH 4,5).

Grupo II. Ratos diabético.

Grupo III. Ratos diabéticos tratados com HaEBcl (150 mg / kg / dia) em solução salina por via oral por 28 dias.

Grupo IV. Ratos diabéticos tratados com HaEBcl (300 mg / kg / dia) em solução salina por via oral por 28 dias.

Grupo V. Ratos diabéticos tratados com insulina (1,5 U/2xdia) por 28 dias.

Os animais foram mantidos em gaiola metabólica para aferição da massa corporal, do volume urinário e da ingestão diária de ração e água. Após uma semana de acomodamento nas gaiolas, foi realizado o processo de indução de DM. Ao final do

experimento, amostras de sangue foram coletadas da ponta da cauda de cada rato. Essas amostras de sangue foram usadas para analisar a glicose plasmática. Ao final do período experimental, os ratos foram anestesiados e eutanasiados, e as amostras de sangue utilizadas para as análises bioquímicas foram coletadas.

2.4. *Indução do diabetes mellitus (DM)*

Os animais foram previamente submetidos ao jejum noturno por 12h, em seguida anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilasina (14mg/kg) na proporção de (0,1mL/100g). O DM experimental foi induzido por injeção intravascular pela jugular de estreptozotocina (STZ, 40mg/kg, Sigma Aldrich®, EUA), dissolvida em tampão citrato (pH 4,5). Cinco dias após a indução do DM, os animais com valores de glicemia pós-prandial igual ou superior a 250mg/dL foram considerados diabéticos. Os animais controles foram submetidos à injeção intravascular de tampão citrato. (Barbosa *et al*, 2018).

2.5. *Testes Bioquímicos*

A cada 7 dias a partir do início do tratamento, a glicemia pós-prandial, glicosúria e ureia urinária foram mensuradas. Ao término do tratamento, amostras de soro foram obtidas para análise dos seguintes parâmetros bioquímicos: glicemia pós-prandial e de jejum, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), globulina, hemoglobina glicada (HbA1c), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamil transferase (γ -GT), glicosúria, lactato, ureia, creatinina, albumina, bilirrubina (Direta, Total e indireta), ácido úrico, proteínas totais, triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e associado à lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) através de kits comerciais (Labtest®, Lagoa Santa, MG). Os níveis de globulina foram determinados a partir da diferença entre albumina e proteínas totais. A glicosúria foi determinada pelo método da ortotoluidina (Dubowski, 1962). Glicogênio hepático e muscular foram determinados pelo método gravimétrico da antrona descrito por Carrol *et al.*, (1955).

2.6. *Massa de tecidos*

A massa dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI), músculos esqueléticos *soleus* e extensor longo dos dedos (EDL) foram determinados e expressos em mg/mm, normalizado pelo comprimento da tíbia.

2.7. Estimativa da peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica foi medida pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBAR) com malondialdeído (MDA) (Uchiyama e Mihara, 1978). Em resumo, a amostra de tecido do fígado foi dissecada e imediatamente lavada com solução salina gelada para remover o excesso de sangue. Os homogenatos de tecido (20% p / v) foram preparados em tampão de fosfato de potássio 50 mM frio (pH 7,4), usando um homogeneizador de vidro-Teflon (Ika). O reagente TBAR foi adicionado a 1,0mL de sobrenadante e a mistura foi incubada a 95°C por 1 hora e resfriada em água corrente antes da adição de 1mL de n-butanol. Após mistura completa, foi centrifugado a 4000 *g* (15 minutos a 4°C). A camada orgânica foi transferida para um tubo transparente e a absorbância foi medida a 532 nm com um espectrofotômetro (Genesys 10S Uv-Vis, Thermo Scientific®). A taxa de peroxidação lipídica foi expressa como μ moles de MDA formado / mg de proteína.

2.8. Medição de superóxido dismutase (SOD) e Catalase

O método de Misra e Fridovich (1972) foi usado para medir a atividade antioxidante da SOD no sangue total, seguindo a cinética da inibição da auto-oxidação da adrenalina a 480 nm. A atividade da catalase foi determinada pelo método de Aebi (1984), monitorando o desaparecimento de H₂O₂ medindo a diminuição na absorbância a 240 nm (coeficiente de extinção de 0,036 / mM por cm) em espectrofotômetro (Genesys 10S Uv-Vis, Thermo Scientific®). Seguindo a cinética da auto-oxidação do peróxido de hidrogênio a 240 nm, ambas expressas como U / mg de proteína.

2.9. Atividade de glutathiona reduzida (GSH) e Glutathiona Oxidase (GSSG)

As concentrações de GSH foram medidas no sangue total como μ mol / g Hb (hemoglobina; Beutler, 1984). A redução de GSSG a GSH se forma por meio da reação catalisada pela enzima glutathiona redutase. Nesta reação, 1,0 mol de NADPH é oxidado para cada mol de redução de GSSG. A atividade GSH é calculada pela queda

na densidade óptica do sistema em 340 nm espectrofotometricamente (Genesys 10S Uv-Vis, Thermo Scientific®) após a oxidação do NADPH.

2.10. *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada usando o software Graph pad Prism®, versão 8.0. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (M $\pm$ EPM). Kolmogorov-Smirnov foi usado para teste de normalidade. A análise de variância (Anova two way- para tempo e tratamento) foi empregada para analisar os dados entre os grupos tratados e os seus respectivos grupos controle (diabéticos e não diabéticos) seguido de *post test* Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. *Efeitos do extrato de HaEBcl na glicemia e nos parâmetros metabólicos gerais, massa de órgãos e tecidos de ratos diabéticos.*

A estreptozotocina (STZ) induziu um aumento de, aproximadamente, 4 vezes na glicemia pós-prandial dos ratos ($433,2 \pm 18,7$ vs $100,1 \pm 2,7$ mg/dl do controle, $p < 0,001$). Valores que se mantiveram elevados ao longo dos 28 dias de tratamento (figura 1). Os animais diabéticos mostraram os sinais clássicos do diabetes como a polifagia, polidipsia e poliúria, assim como menor redução de ganho na massa corporal ao longo do experimento (figura 2). O tratamento com HaEBc na menor dose reduziu a hiperglicemia (20%), assim como a polifagia (30%), poliúria (37%) e polidipsia (41%), assim como o tratamento HaEBc na maior dose reduziu a hiperglicemia (57%), assim como a polifagia (46%), poliúria (52%) e polidipsia (29%). O grupo tratado com insulina reduziu a hiperglicemia (34%), assim como a polifagia (21%), poliúria (56%) e polidipsia (43%). Além disso, a quantidade de ureia e glicose encontrada nas amostras de urina foram atenuadas por HaEBc, a julgar pelos valores encontrados em grupos de diabéticos tratados com a maior dose de HaEBc (Tabela 1).

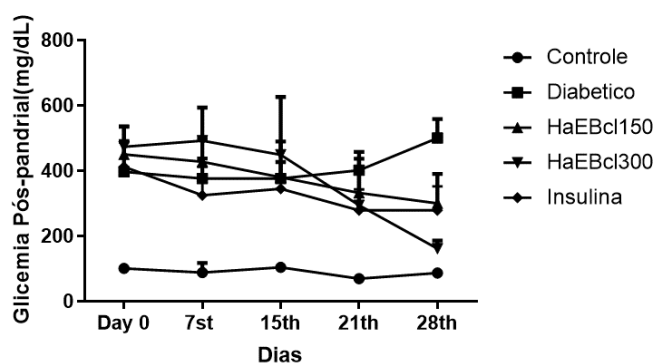


Figura 1. Efeito do extrato etanólico folhas de *Bauhinia cheilantha* na glicemia pós-prandial de ratos STZ-Diabéticos

Os animais diabéticos, mostraram um menor ganho de massa corporal (252.72 ± 10.41 g, $p < 0,001$). Quando comparamos os grupos tratados e controle, os grupos que receberam o tratamento com extrato de *Bauhinia cheilantha* (HaEBcl150 e HaEBcl300) exibiram valores maiores no ganho de massa corporal com $p < 0,001$. Entre os grupos tratados, tanto o grupo HaEBcl150 quanto HaEBcl300 tiveram maior ganho de massa corporal que o grupo diabético ($p = 0,009$ e $p = 0,003$) (Tabela 1). Os grupos tratados (HaEBcl150 e HaEBcl300) apresentaram maior ingestão hídrica do que o grupo diabético e tratado com Insulina ($p < 0,0001$). Os grupos HaEBcl150 e HaEBcl300 apresentaram menor diurese quando comparados com o grupo Diabético ($p < 0,0001$), ao longo dos 28 dias de tratamento.

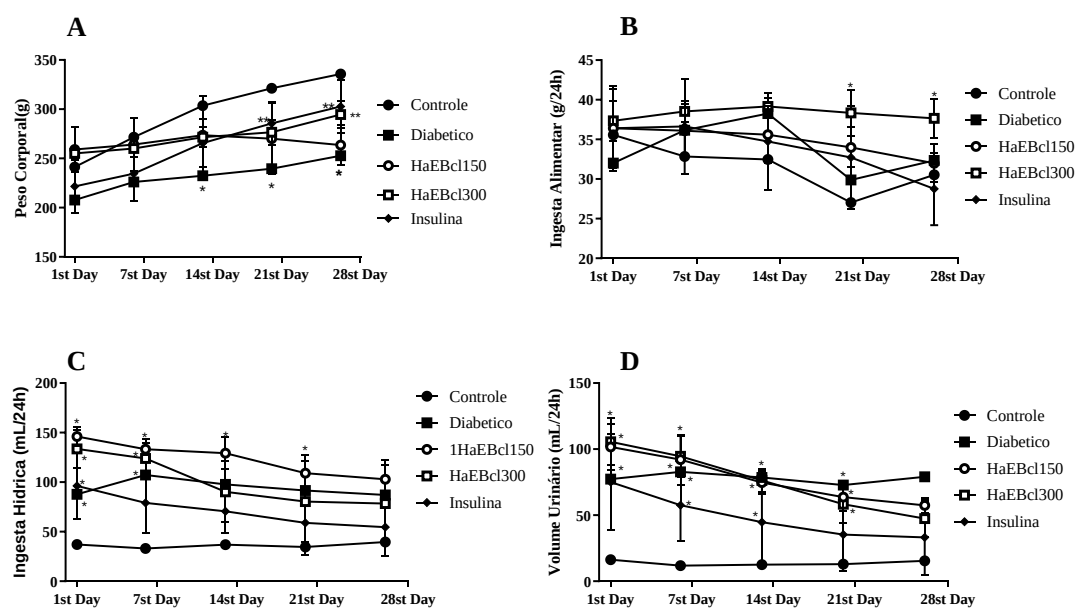


Figura 2. Efeito do extrato etanólico folhas de *Bauhinia cheilantha* no peso corporal

(1A), ingestão de alimentos (1B) e líquidos (1C), volume urinário (1D), em experimento sub-crônico durante o tratamento de 28 dias. Cada ponto representa as médias $\pm$ S.E.M. de 4 a 5 animais. * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle; ** $P < 0,001$ em relação ao grupo Diabético.

Tabela 1. Efeito do extrato etanólico folhas de *Bauhinia cheilantha* no ganho de massa corporal, ingestão alimentar e hídrica e volume urinário de ratos diabéticos após 28 dias de administração.

Parâmetros	Grupos									
	0 dia					28º dia				
	Controle	Diabético	HaEBcl150	HaEBcl300	Insulina	Controle	Diabético	HaEBcl150	HaEBcl300	Insulina
Massa corporal final (g)	241,3±15,2	207,7±10,4	258,0±13,5	255,1±2,9	221,6±12,1	335,8±15,1	252,7±10,4	263,5±11,9*	294,6±7,1**	302,8±12,2**
Ingestão alimentar total(g)	40,0±1,1	32,0±5,3	36,4±2,2	37,3±1,4	36,4±2,4	30,5±1,2	32,4±3,1	32,0±1,1	37,7±1,5	28,8±2,1
Ingestão hídrica total (ml/24h)	75,0±15,0	87,8±2,3	146,0±5,7**	133,5±9,5**	96,2±14,9	39,5±2,0	103,0±2,6	87,0±11,5**	78,5±19,5	54,6±13,0
Volume urinário total (ml/24h)	16,3±1,2	81,2±17,8*	118,3±11,7*	120,5±9,3**	75,0±16,3**	15,4±1,3	97,0±22,1	57,4±3,3	47,4±6,8**	33,2±12,7**
Ureia urinária (mg/24h)	472,7±5,6	982,8±29,9*	1208,2±16,7**	903,12±32,7**	852,65±65,3**	577,2±9,3,2	1149,5±95,9*	804,26±26,3**	798,4±11,6*	782,85±47,3**

Glicosúria	-	14962,9±1	533,8±136,4	491,97±101,	1514,5±71,2	-	2765,0±16	266,88±196,	341,15±158,	13010,0±178,7
(mg/24h)		70,3	**	8**	**		0,7	5**	2**	**

Os resultados são apresentados como a média ± Erro padrão. (n: 4-5)

* P <0,05 em relação ao grupo controle;

** P <0,001 em relação ao grupo Diabético.

Adicionalmente, o HaEBc apresentou perda de músculo esquelético glicolítico (EDL e tibial anterior) e gordura (retroperitoneal e epididimal) em ratos diabéticos sem afetar outros órgãos como coração e fígado (Tabela 2). O glicogênio hepático também foi preservado pelo tratamento com HaEBc (300 mg / kg) em animais diabéticos (Tabela 3). Em animais de controle, o HaEBc não levou a nenhuma alteração nos parâmetros metabólicos.

Tabela 2. Efeito do extrato etanólico folhas de *Bauhinia cheilantha* no peso dos órgãos de ratos diabéticos após 28 dias de administração.

Parâmetros	Grupos				
	Controle	Diabético	HaEBcl150	HaEBcl300	Insulina
Massa corporal (g)	335.81±5.17	252.72±10.41	278.11±12.44**	266.95±7.81**	297.88±14.17**
Fígado (mg/mm)	10.72±0.31	9.87±0.72	11.17±0.23	10.22±0.25	11.43±0.36
Rins (mg/mm)	3.20±0.09	3.09±0.22	3.23±0.08	3.32±0.11	3.28±0.12
Coração(mg/mm)	1.16±0.06	1.03±0.08	1.12±0.02	1.01±0.03	1.07±0.04
Pulmão(mg/mm)	1.96±0.04	1.88±0.25	2.24±0.16	2.22±0.16	1.66±0.09
Intestino(mg/mm)	28.82±3.05	30.69±4.68	28.16±2.07	27.69±1.55	28.79±1.70
Pâncreas(mg/mm)	0.94±0.37	0.71±0.21	1.03±0.038	1.12±0.09	0.71±0.09
Estômago(mg/mm)	1.92±0.17	1.86±0.11	2.25±0.04	2.17±0.04	2.17±0.10
Baço(mg/mm)	0.73±0.01	0.63±0.04	0.76±0.06	0.67±0.02	0.71±0.05
Testículos(mg/mm)	4.03±0.21	4.09±0.32	3.72±0.23	4.09±0.24	3.81±0.27
Tecido Ad.	3.34±0.64	2.66±0.77	0.97±0.12**	1.56±0.38**	4.28±0.82
Retroperitoneal(mg/mm)					
Tecido Ad. Epidídimal (mg/mm)	4.46±0.99	3.65±1.12	3.11±0.16	2.81±0.15**	5.71±0.58**
Soleus (mg/mm)	0.08±0.01	0.06±0.00	0.09±0.01**	0.08±0.01**	0.07±0.01
EDL (mg/mm)	0.11±0.00	0.07±0.01	0.09±0.00**	0.09±0.01**	0.08±0.01

Tibial Anterior(mg/mm)	0.59±0.04	0.36±0.02	0.51±0.02**	0.50±0.06**	0.47±0.03**
-------------------------------	-----------	-----------	-------------	-------------	-------------

Os resultados são corrigidos pelo comprimento da tíbia (mm) expressos como a média ± Erro padrão. (n: 4-5).

* P <0,05 em relação ao grupo controle;

** P <0,001 em relação ao grupo Diabético.

3.2. Efeitos do extrato de HaEBcl em biomarcadores séricos metabólicos, hepáticos e renais de ratos diabéticos

A STZ afetou significativamente a hemoglobina glicada (14% vs 2.56% do grupo controle, $p < 0,05$) e diminuiu após o tratamento com o extrato das folhas de *B. cheilantha* (Tabela 3). Comparações de Frutosamina, HaEBcl150 e HaEBcl300 de maior redução (35 $\mu\text{mol/L}$ e 133 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente com relação ao grupo diabético, $p < 0,05$) e níveis de Frutosamina para o grupo tratado com Insulina ($p < 0,001$) não apresentou diferença significativas. Além disso, todos os grupos tratados com HaEBcl exibiram valores menores de glicerol que o grupo diabético e insulina ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Os grupos que receberam o extrato apresentaram menor percentual de glicogênio hepático que os grupos diabético e insulina ($p < 0,05$; $p < 0,001$) (Tabela 3).

Tabela 3. Marcadores Glicêmicos de ratos controle e diabéticos tratados ou não com extrato hidroalcóolico de *Bauhinia cheilantha* (150mg/kg; 300mg/kg) durante 28 dias de experimento.

Parâmetros	Grupos				
	Controle	Diabético	HaEBcl150	HaEBcl300	Insulina
Hemoglobina Glicada (%)	2.56 $\pm$ 0.63	14.08 $\pm$ 0.30 *	8.33 $\pm$ 1.02* *	9.23 $\pm$ 1.10**	10.88 $\pm$ 0.43 **
Frutosamina ($\mu\text{mol/L}$)	232.48 $\pm$ 13.73	393.62 $\pm$ 35.36	293.30 $\pm$ 16.39	230.28 $\pm$ 19.19**	312.33 $\pm$ 38.20
Glicerol ($\mu\text{mol/L}$)	103.20 $\pm$ 2.51	122.24 $\pm$ 9.95	83.80 $\pm$ 6.85***	77.78 $\pm$ 2.25**	98.90 $\pm$ 4.19
Glicogênio Hepático (%/g de tecido)	4.11 $\pm$ 0.51	3.32 $\pm$ 0.63	5.93 $\pm$ 0.63* *	8.69 $\pm$ 0.64**	4.90 $\pm$ 0.17

Todos os valores são expressos como média e erro padrão (n: 4-5).

** p <0,05 em comparação ao Grupo Controle.

*** p <0,001 em comparação com o Grupo Diabético. ANOVA de uma via seguida pelos testes de comparação múltipla de Tukey. HaEBcl150: Extrato hidroalcóolico de *Bauhinia cheilantha* na dosagem de 150mg/kg; HaEBcl300: extrato hidroalcóolico de *B. cheilantha* na dosagem de 300mg/kg.

Ratos diabéticos apresentaram integridade hepática prejudicada (Tabela 4), conforme avaliado pelos níveis aumentados de AST (165.40 ± 4.50 mg/dL, p <0,001) e ALT (150.08 ± 16.05 mg/dL, p <0,05), em comparação com o grupo controle AST (109.00 ± 12.20) e ALT (59.90 ± 4.31 mg/dL, p <0,001). O tratamento HaEBcl150 e HaEBcl300 causou uma melhora significativa nos níveis de AST (140.60 ± 12.40 mg/dL, 103.80 ± 9.50 mg/dL, p <0,001, respectivamente) e ALT 98.8 ± 6.26 mg/dL, 95.52 ± 10.66 mg/dL, p <0,001, respectivamente), em comparação com o DM não tratado. Além disso, os animais tratados com insulina não apresentaram redução significativa nesses níveis.

Além disso, os danos renais causados pela STZ são evidenciados, pelos níveis séricos alterados de creatinina, ureia e ácido úrico. Onde após o tratamento de HaEBcl, foi observado uma melhora significativa ($\approx 78\%$, p <0,001), nos níveis de creatinina, ($\approx 11\%$, p <0,001) ureia, e ácido úrico ($\approx 36\%$, p <0,001). Os animais tratados com insulina obtiveram a redução dos marcadores de dano renal ($\approx 57\%$, p <0,001, creatinina; $\approx 5\%$, p <0,001 nos níveis plasmáticos de ureia e $\approx 7\%$, p <0,001, ácido úrico).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de ratos controle e diabéticos tratados ou não com extrato hidroalcóolico de *Bauhinia cheilantha* (150mg/kg; 300mg/kg) durante 28 dias de experimento.

Parâmetros	Grupos				
	Controle	Diabético	HaEBcl150	HaEBcl300	Insulina
ALT	59.90 ± 4.31	150.08 ± 16.05	88.83 ± 6.26	95.52 ± 10.66	147.80 ± 26.54
(U/L)			**	**	4
AST	109.00 ± 12.20	165.40 ± 4.50	140.60 ± 12.40	103.80 ± 9.50	134.20 ± 15.40
(U/L)	20	0	40	**	0

AST:ALT (U/L)	1.64±0.10	1.32±0.22	1.34±0.18	1.56±0.17	1.55±0.71
PT (U/L)	5.90±0.26	9.58±0.82*	6.70±0.09*	6.73±0.49**	5.64±0.44**
			*		
Albumina (g/dL)	2.56±0.11	3.14±0.35	2.37±0.29*	2.29±0.13**	3.09±0.29*
			*		
Ureia (mg/dL)	50.55±2.25	73.68±5.07	66.24±3.32	63.22±7.98	69.96±2.42
		*			
Creatinin a (mg/dL)	0.69±0.05	1.39±0.16*	0.30±0.02*	0.38±0.06**	0.63±0.12**
			*		
Fosfatase Alcalina (U/L)	47.22±3.43	161.38±14.57	35.50±4.82**	50.83±6.81*	60.80±14.41**
				*	
Gama-GT (μmol/L)	5.60±2.16	37.40±1.48	9.10±1.17*	12.43±1.45*	20.00±2.97*
			*	*	
Globulina (g/dL)	3.46±0.37	6.88±0.80	4.33±0.23*	1.23±0.34**	3.78±0.19
			*		
Bilirrubin a Total (mg/dL)	0.31±0.05	0.77±0.11	0.42±0.03*	0.30±0.02**	0.32±0.05**
			*		
Bilirrubin a Direta (mg/dL)	0.04±0.02	0.16±0.03	0.11±0.02	0.15±0.05	0.10±0.06
Bilirrubin a Indireta (mg/dL)	0.09±0.04	0.61±0.10	0.29±0.06*	0.19±0.07**	0.22±0.02**
			*		
Ácido Úrico (μmol/L)	3.70±0.08	4.15±0.11	2.60±0.06*	2.58±0.08**	3.85±0.05
			*		

Todos os valores são expressos como média e erro padrão (n: 4-5).

* p <0,05 em comparação ao Grupo Controle.

** p <0,001 em comparação com o Grupo Diabético. ANOVA de uma via precedida pelos testes de comparação múltipla de Tukey. HaEBcl150: Extrato hidroalcolólico de

Bauhinia cheilantha na dosagem de 150mg/kg; HaEBcl300: extrato hidroalcólico de *B. cheilantha* na dosagem de 300mg/kg.

Verificou-se que STZ causou alterações nos níveis de ureia, creatinina e ácido úrico (73.68 ± 5.07 mg/dL, $p < 0,05$; 1.39 ± 0.16 , $p < 0,05$; 4.15 ± 0.11 mg/dL, $p < 0,001$; respectivamente). Após o tratamento, as intensidades de vários parâmetros foram atenuadas (Tabela 3). Enquanto o consumo diário de HaEBc em ambas as doses, faixas de enzimas e bilirrubina tornaram-se normais e resultados significativos foram observados para HaEBcl300 (0.30 ± 0.02 , $p < 0,001$). Além disso os níveis de creatinina, ureia e ácido úrico foram reduzidos para ambas as dosagens de tratamento.

3.3. Efeitos do extrato de HaEBcl no perfil lipêmico plasmático e no conteúdo de lipídios hepáticos totais de ratos diabéticos.

A STZ induziu a dislipidemia diabética em ratos, com elevação dos níveis de colesterol total (≈ 140 mg/dL, $p < 0,05$), hipertrigliceridemia (≈ 202 mg/dL, $p < 0,05$), sem alterações nos níveis de HDL. O tratamento com o HaBcl reduziu os níveis de CT (70%) em ambas as doses estudadas, assim como reduziu os níveis de TG elevou os níveis de HDL de modo dependente (Tabela 5). Além disso, o aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de lipídeos hepáticos e proteínas carboniladas foram observados em ratos diabéticos quando comparados com ratos controle. A administração de HaEBcl150 ou HaEBcl300 os ratos diabéticos tendem a trazer os níveis de lipídios hepáticos para perto do normal.

Tabela 5. Perfil Lipídico de ratos controle e diabéticos tratados ou não com extrato hidroalcólico de *Bauhinia cheilantha* (150mg/kg; 300mg/kg) durante 28 dias de experimento.

Parâmetros	Grupos				
	Controle	Diabético	HaEBcl150	HaEBcl300	Insulina
Colesterol	$34.80 \pm 4.$	140.79 ± 8.5	44.06 ± 4.69	$50.73 \pm 7.07^*$	$93.81 \pm 3.25^{**}$
Total	26	7*	**	*	
(mg/dL)					

HDL	17.03±2.	21.92±1.00	32.50±2.01	42.49±2.85*	34.30±9.04*
(mg/dL)	21		**		
LDL	54.63±6.	59.66±4.05	54.45±0.45	54.41±0.18	57.67±0.95
(mg/dL)	37				
Triglicerídeos	38.35±1.	202.92±3.9	85.46±3.03	65.68±11.71	112.38±11.14
(mg/dL)	98	6	**	**	**
Lipídeos Totais	1.02±0.0	1.09±0.06	0.98±0.02*	1.25±0.07	1.08±0.06
(g/mL)	1		*		

Todos os valores são expressos como média e erro padrão (n: 4-5).

* p <0,05 em comparação ao Grupo Controle.

** p <0,001 em comparação com o Grupo Diabético. ANOVA de uma via precedida pelos testes de comparação múltipla de Tukey. HaEBcl150: Extrato hidroalcolico de *Bauhinia cheilantha* na dosagem de 150mg/kg; HaEBcl300: extrato hidroalcolico de *B. cheilantha* na dosagem de 300mg/kg.

3.4. Efeitos do extrato de HaEBcl em biomarcadores hepáticos do estresse oxidativo em ratos diabéticos

Durante o estudo atual, o efeito da STZ nos níveis dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SOD, CAT e GSH) no tecidos hepático diminuíram significativamente (p <0,05) associados a elevação significativa (p <0,05) da peroxidação lipídica (MDA) no grupo diabético em relação ao grupo controle (Figura 3). O tratamento com extrato ou HaEBc, melhorou as enzimas antioxidantes, GSH, e diminuiu o nível de MDA no fígado em comparação com o grupo diabético (2,28±0,08, p <0,05). A administração oral do extrato diminuiu significativamente (1,12±0,19 mg/pt, p <0,05; 1,25±0,16 mg/pt, p <0,05) os níveis de MDA dos ratos diabéticos tratados nas doses diferentes (HaEBcl150 e HaEBcl300, respectivamente). O estudo apresentou uma diferença substancial nas atividades das enzimas SOD nas doses de HaEBcl150 ou HaEBcl300 (29,00±2,07; 32,60±2,16 U/mg, p <0,05 respectivamente) e CAT (0,04±0,002; 0,07±0,006 U/mg, p <0,05 respectivamente), a diferença observada foi significativa (p <0,001) no fator redox GSH:GSSG dos ratos que receberam altas doses de o extrato (300 mg / kg). Além disso, a elevação do conteúdo de nitrito causada pelo diabetes foi reduzida pelo tratamento.

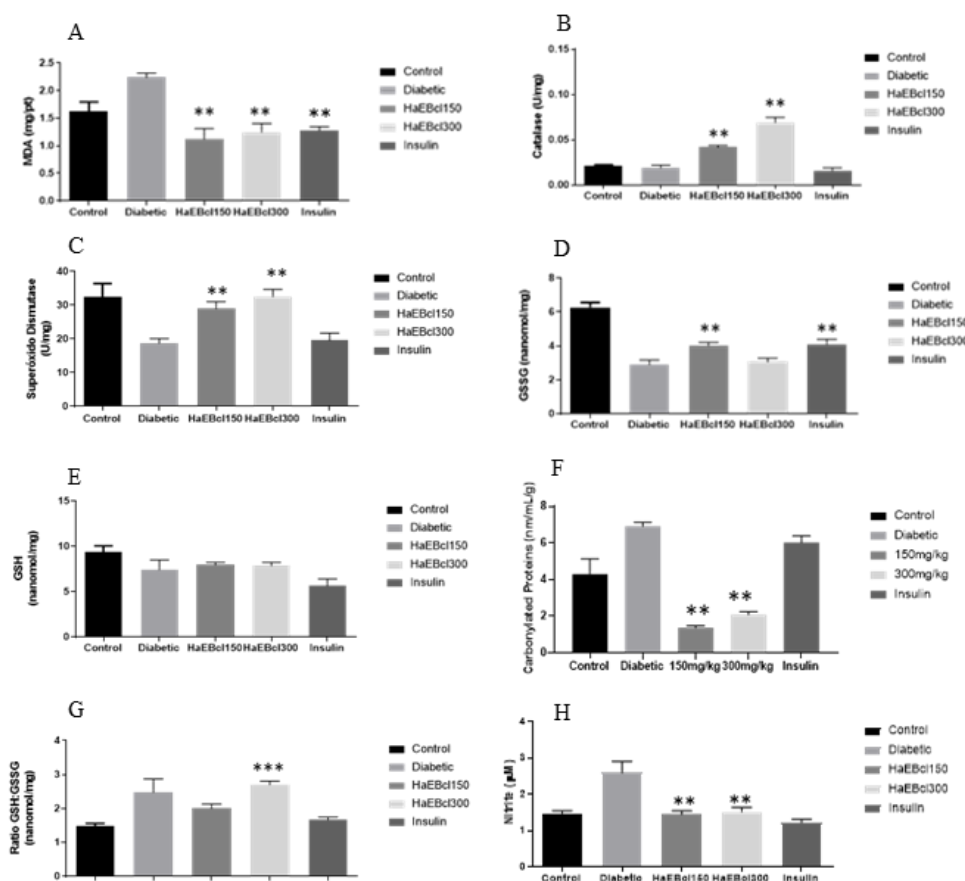


Figura 3. Efeito do extrato etanólico folhas de *Bauhinia cheilantha* nos níveis de Ácido tiobarbitúrico-TBA(3A), catalase (3B), Superóxido dismutase (3C), Glutathiona oxidase-GSSG (3D); Glutathiona Redutase (3E), Proteínas Carboniladas (3F), relação GSH/GSSG (3G), e nitrito (3H), no tecido hepático para todos os grupos de estudo. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SEM. Designações: ** - $P < 0,05$ em relação ao grupo controle; *** - $P < 0,001$ em relação ao grupo Diabético.

4. Discussão

4.1. Efeitos do extrato de HaEBcl sobre a ingesta hídrica, alimentar e peso dos órgãos em ratos STZ-Diabéticos.

Ratos diabéticos podem apresentar perda de peso corporal e diminuição da taxa de crescimento (Hsu, 2022; Galsgaard et al, 2019). Esse retardo de peso pode estar relacionado à redução da captação de glicose causada pela falta de insulina após a injeção de STZ (Galsgaard et al, 2019). A administração de HaEBcl pode iniciar a captação de glicose pelos tecidos periféricos e, assim, melhorar o metabolismo da glicose como uma

das principais fontes de energia (Ibrahim et al., 2016). Efeitos semelhantes foram reportados por Brahmachari et al. (2015), utilizando extrato das folhas de *Bauhinia purpúrea* durante 28 dias de tratamento.

A redução no volume urinário (diurese osmótica) e a ingestão hídrica (polidipsia) estão intimamente relacionadas aos níveis glicêmicos, sobretudo pelos mecanismos de reabsorção renal de glicose. O que pode estar relacionado com decorrente da redução da hiperglicemia por alterações de sensibilidade à insulina periférica (Barbosa et al., 2018). O que se refere ao aumento do consumo de água e alimentos no diabetes foi confirmado com achados semelhantes relatados por Pinheiro et al. (2017), no tratamento de Diabetes induzido por STZ com *B. holophylla* durante 21 dias de tratamento.

4.2. Efeitos do extrato de HaEBcl em marcadores glicêmicos em ratos STZ-diabéticos.

HaEBcl reduziu a hiperglicemia pós-prandial em animais diabéticos. A redução na hiperglicemia pós-prandial pode estar associada à menor produção hepática de glicose, isto é, menor atividade gliconeogênica, acompanhada, ou não, de maior glicogenólise (Camaforte et al., 2019), o que pode ser considerado pela preservação dos estoques de glicogênio hepático nos animais tratados com HaEBcl150 e HaEBcl300. É bem compreendido o efeito anabólico e anti-catabólico da insulina no metabolismo do glicogênio, sobretudo por estimular a ação do glicogênio sintase e inibir a glicogênio fosforilase, enzimas envolvidas na síntese e degradação destes carboidratos, respectivamente (Ibrahim et al., 2016).

As enzimas ALT e AST são encontradas principalmente nos hepatócitos e, quando níveis elevados são detectados, é possível confirmar o diagnóstico de lesão hepática (Pratt e Kaplan 2000). Nosso estudo apresentou atividades de ALT e AST reduzidas em grupos de diabéticos, sugerindo que essa planta melhorou a integridade hepática devido ao diabetes. Além disso o dano renal gradual é uma das principais consequências da hiperglicemia. Esse funcionamento inadequado do rim leva a uma elevação da ureia no sangue (Ishraq, 2014). A concentração sérica elevada de creatinina e ureia no estado diabético indica disfunção renal. O ácido úrico sérico está comprovadamente associado à doença renal; a razão por trás da alta concentração de ácido úrico em um paciente diabético pode ser o resultado da inibição da reabsorção de ácido úrico no túbulo proximal (Pavani e Anoop, 2011). Com base nos resultados observados, o extrato hidroalcolico

da folha de *B. cheilantha* realiza ações de melhoria no fígado e nos rins; isso é evidente pela capacidade do extrato hidroalcóolico da planta de reduzir e normalizar a concentração de creatinina, uréia, ácido úrico e enzimas hepáticas (ALP, AST, ALT) no sangue. Estudos prévios têm demonstrado efeitos semelhantes, utilizando extrato da folha de *Bauhinia variegata* (Kulkarni e Laddha, 2020) durante 28 dias de tratamento.

A redução da bilirrubina direta e da bilirrubina total após o tratamento com o extrato HaEBcl aos animais diabéticos sugerem melhora na integridade hepática e renal em ratos diabéticos (Yao et al., 2019). O papel protetor da bilirrubina como biomarcador da função hepática, pode ser atribuído por efeito indireto na redução da produção de superóxido dependente de NADPH e da produção de ROS induzida por glicose elevada (Barbosa et al., 2021).

4.3. Efeitos do extrato de HaEBcl em biomarcadores séricos para as funções renais e hepáticas.

Alguns estudos mostraram uma tendência biológica do nível de colesterol HDL para acompanhar os níveis de colesterol total (Kiss et al. 2006, Turner et al. 2004). Nossos resultados mostraram redução dos níveis de HDL-colesterol nos grupos tratados, o que pode indicar alterações metabólicas no fígado em decorrência do tratamento, seja pela redução de sua produção ou função. Além disso, um aumento nos lipídios totais do fígado em ratos diabéticos induzidos por STZ pode indicar um aumento na síntese de lipídios e na capacidade de armazenamento, o que pode ter causado um aumento nos triglicerídeos e fosfolipídios séricos. Ravi et al. (2005) relataram que uma variedade de desarranjos nos mecanismos metabólicos e regulatórios devido à deficiência de insulina é responsável pelo acúmulo de lipídios.

4.4. Efeitos do extrato de HaEBcl em biomarcadores séricos e tecido hepático no estresse oxidativo.

Em condições fisiológicas, os metabólitos ativos do oxigênio são neutralizados por vários componentes do sistema de defesa antioxidante. Supomos que existem duas maneiras principais de explicar esses resultados: O extrato de HaEBcl pode reduzir a produção de ROS devido aos níveis mais baixos de glicose no sangue, ou seja, antocianinas, e podem agir como eliminadores de radicais livres. Além disso, algumas

espécies ainda apresentaram ação hipoglicêmica, por exemplo *B. variegata* (Silva et al. 2002, Pepato et al. 2004, Lino et al. 2004, Frankish et al. 2010). Rozza et al. (2015) verificaram que o extrato hidroalcoólico de *Bauhinia holophylla* (150 mg / Kg) aumentou as atividades da glutathione peroxidase (GSH-Px) e da glutathione redutase (GSSG) e o nível reduzido de glutathione (GSH), sugerindo uma atividade antioxidante de *B. holophylla*.

O aumento no nível de produtos reativos a TBA no plasma sanguíneo em condições de diabetes tem um efeito citotóxico sobre os fosfolípidios da membrana, o que leva à formação e acúmulo de MDA (Gao et al., 2012). A administração do extrato de HaEBcl leva à diminuição da peroxidação lipídica nos animais com diabetes. Os resultados sugerem que os componentes ativos na composição do extrato de HaEBcl podem reduzir o nível de produtos reativos a TBA, controlando a glicose sanguínea e as reações de glicação, além de sua atividade antioxidante.

Conclusões

Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados abriram a perspectiva de que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Bauhinia cheilantha* apresentou ações antidiabéticas, antihiperglicemiantes, antihiperlipidêmicas, provavelmente por mecanismos que envolvem a redução do intenso estresse oxidativo típico do DM. Portanto, *B. cheilantha* é um candidato potencial para o tratamento de condições hiperglicêmicas. No entanto, devido às limitações experimentais, esses resultados devem ser confirmados em um grande ensaio clínico multicêntrico, e esforços devem ser feitos nessa direção.

Referências

Belete, T.M., (2020). A recent achievement in the discovery and development of novel targets for the treatment of type-2 diabetes mellitus. J. Exp. Pharmacol. 12, 1–15.

Beutler, E., (1984). A manual of biochemical methods. In: Beutler, E. (Ed.), Red Cell Metabolism. Greene & Straton Publishers, Philadelphia, pp. 72–136.

Camaforte, N. A. D. P., Saldanha, L. L., Vareda, P. M. P., Rezende-Neto, J. M., Senger, M. R., Delgado, A. Q., ... & Bosqueiro, J. R. (2019). Hypoglycaemic activity of *Bauhinia holophylla* through GSK3- β inhibition and glycogenesis activation. *Pharmaceutical biology*, 57(1), 269-279.

Caro-Ordieres, T., Marín-Royo, G., Opazo-Ríos, L., Jiménez-Castilla, L., Moreno, J.A., Gomez-Guerrero, C., Egido, J., (2020). The coming age of flavonoids in the treatment of diabetic complications. *J. Clin. Med.* 9, 346–376.

Carroll, N.V., Longley R.W., Roe J.H. (1956). The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.* 583-93.

DA SILVA BARBOSA, Anne Karynne et al. Efeitos sobre biomarcadores hepáticos eo consumo alimentar de ratos Wistar suplementados com Whey Proteins. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 12, p. e282101220563-e282101220563, 2021.

de Moura Barbosa, H., Amaral, D., do Nascimento, J. N., Machado, D. C., de Sousa Araújo, T. A., de Albuquerque, U. P., ... & Lira, E. C. (2018). *Spondias tuberosa* inner bark extract exert antidiabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 227, 248-257.

de Sousa Lino, C., Diógenes, J. P. L., Pereira, B. A., Faria, R. A. P. G., Neto, M. A., Alves, R. S., ... & Viana, G. S. B. (2004). Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(1), 125-127.

Dubowski, K. M. (1962). An o-toluidine method for body fluid glucose determination. *Clin Chem* 9: 215-235.

Frankish, N., de Sousa Menezes, F., Mills, C., & Sheridan, H. (2010). Enhancement of insulin release from the β -cell line INS-1 by an ethanolic extract of *Bauhinia variegata* and its major constituent roseoside. *Planta medica*, 76(10), 995-997.

Galsgaard, K. D., Winther-Sørensen, M., Pedersen, J., Kjeldsen, S. A., Rosenkilde, M. M., Albrechtsen, N. J. W., & Holst, J. J. (2019). Glucose and amino acid metabolism in mice depend mutually on glucagon and insulin receptor signaling. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*.

Gao, D., Li, Q., Gao, Z., & Wang, L. (2012). Antidiabetic effects of Corni Fructus extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei medical journal*, 53(4), 691.

Hart, N.J., Powers, A.C., (2019). Use of human islets to understand islet biology and diabetes: progress, challenges and suggestions. *Diabetologia* 62 (2), 212–222.

Hsu, André Keng Wei. "Jejum intermitente pré-laparotomia em ratos diabéticos, efeitos na glicose, achados laboratoriais e histopatológicos." (2022).

Hussain, T., Tan, B., Murtaza, G., Liu, G., Rahu, N., Kalhor, M. S., ... & Yin, Y. (2020). Flavonoids and type 2 diabetes: Evidence of efficacy in clinical and animal studies and delivery strategies to enhance their therapeutic efficacy. *Pharmacological research*, 152, 104629.

Infante-Garcia, C., Garcia-Alloza, M., (2019). Review of the effect of natural compounds and extracts on neurodegeneration in animal models of diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 2320, 2533.

International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas (2019) 9th edition, Belgium, Brussels: International Diabetes Federation. Disponível em <https://diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133352_2406-IDF-ATLAS-SPAN-BOOK.pdf> acesso em jan, 2021.

Ishraq, AASA (2014). Detection level of urea, sugar, creatinine and hematology in patients of diabetic mellitus type II. *J. Med. Medic. Sci.* 5(7):154-156.

Kiss, A., Takaku, M., Damasceno, D. C., Campos, K. E., Sinzato, Y. K., Lima, P. O., & Volpato, G. T. (2006). Efeito do extrato aquoso de *Allium sativum* L. sobre parâmetros bioquímicos de ratas com diabetes induzido por Streptozotocin. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 24-30.

Kulkarni, Y. A., & Laddha, A. P. (2020). *Bauhinia variegata* leaf extract: An effective management option for diabetic cardiomyopathy. *South African Journal of Botany*, 132, 50-58.

Nicolle, E., Souard, F., Faure, P., Boumendjel, A., (2011). Flavonoids as promising lead compounds in type 2 diabetes mellitus: molecules of interest and structure-activity relationship. *Curr. Med. Chem.* 18, 2661–2672.

Patel, D.K., Prasad, S.K., Kumar, R., Hemalatha, S., (2012). An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pac J Trop Biomed* 2, 320–330.

Pavani, B; Anoop, S. (2011). Association between serum uric acid levels and diabetes mellitus. *Int. J. Endocrinol.* Volume 2011: 1-6.

Powers A. C. And D'Alessio D. (2011). Endocrine Pancreas and Pharmacotherapy of Diabetes Mellitus and Hypoglycemia. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC, Goodman & Gilman. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th ed., New York: McGraw-Hill, p. 1237-1273.

Rozza, A. L., Cesar, D. A. S., Pieroni, L. G., Saldanha, L. L., Dokkedal, A. L., De-Faria, F. M., ... & Pellizzon, C. H. (2015). Antiulcerogenic activity and toxicity of *Bauhinia holophylla* hydroalcoholic extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

Silva, F. R. M. B., Szpoganicz, B., Pizzolatti, M. G., Willrich, M. A. V., & de Sousa, E. (2002). Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 83(1-2), 33-37.

Turner, B., Mølgaard, C., & Marckmann, P. (2004). Effect of garlic (*Allium sativum*) powder tablets on serum lipids, blood pressure and arterial stiffness in normo-lipidaemic volunteers: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *British journal of nutrition*, 92(4), 701-706.

Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*, 86(1), 271-278.

Wolff, F. R., Broering, M. F., Jurcevic, J. D., Zermiani, T., Bramorski, A., de Carvalho Vitorino, J., ... & Santin, J. R. (2019). Safety assessment of *Piper cernuum* Vell.(Piperaceae) leaves extract: Acute, sub-acute toxicity and genotoxicity studies. *Journal of ethnopharmacology*, 230, 109-116.

Xu, L.J., Yu, M.H., Huang, C.Y., Niu, L.X., Wang, Y.F., Wu, C.Z., Yang, P.M., Hu, X., (2018). Isoprenylated flavonoids from *Morus nigra* and their PPAR γ agonistic activities. *Fitoterapia* 127, 109–114.

Yao, Q., Jiang, X., Kou, L., Samuriwo, A. T., Xu, H. L., & Zhao, Y. Z. (2019). Pharmacological actions and therapeutic potentials of bilirubin in islet transplantation for the treatment of diabetes. *Pharmacological research*, 145, 104256.

APÊNCICE A- (Syrclé's tool for assessing risk of bias)

Intention-to-treat	Unique ID	Study ID	Experimental	Comparator	Outcome	Weight	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
	ID1	Study1	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID2	Study2	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID3	Study3	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID4	Study4	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	•	!	+
	ID5	Study5	Experimental	Diabetic group	Non-effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID6	Study6	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID7	Study7	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID8	Study8	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	•	!	+
	ID9	Study9	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID10	Study10	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	•	!	+
	ID11	Study11	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID12	Study12	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID13	Study13	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID14	Study14	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	•	!	+
	ID15	Study15	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	•	!	+
	ID16	Study16	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID17	Study17	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID18	Study18	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID19	Study19	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID20	Study20	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID21	Study21	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID22	Study22	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID23	Study23	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID24	Study24	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID25	Study25	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID26	Study26	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID27	Study27	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID28	Study28	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID29	Study29	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+
	ID30	Study30	Experimental	Diabetic group	Effectiveness	1	+	!	+	+	•	+	!	!	!	+

Low risk
 Some concerns
 High risk

D1 Sequence generation
D2 Baseline characteristics
D3 Allocation concealment
D4 Random housing
D5 Blinding
D6 Random outcome
D7 Blinding
D8 Incomplete outcome data
D9 Selective outcome reporting
D10 Other sources of bias

APÊNCICE B- (Research strategy)

SYSTEMATIC REVIEW SEARCH STRATEGY

Item #	Section/Subsection/Item	Description	Check for approval
A. General			
1.	Title of the review	<i>Bauhinia genus: Biochemistry on the antihyperglycemic and dyslipidemic effect, cross-sectional study and meta-analysis.</i>	
2.	Authors (names, affiliations, contributions)	Alanne Lucena de Brito¹, Widarlane Ângela da Silva Alves¹, Francisco Borja Ruiz reverter², Eduardo Carvalho Lira¹. ¹Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco (UFPE) ²Department of chemistry and physics, Federal University of Paraiba (UFPB)	
4.	Contact person + e-mail address	Alanne Lucena de Brito Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil. E-mail: alannylucena@gmail.com	
C. SEARCH STRATEGY			
Search and study identification			
5.	Split research question into critical search components. SC1: Intervention/exposure SC2: Disease of interest/health problem SC3: Animal/animal species/population studied (SC4: Outcome measures)	What are the effects of Bauhinia genus in Biochemical and lipidic profile, phytochemical profile on animal models for Diabetes Mellitus disease? SC1: Bauhinia Genus SC2: Diabetes's disease SC3: Experimental models (SC4: postprandial glucose)	
6.	Identify relevant search terms for search component 1 (SC1)	Standardized subject terms: [Bauhinia], [hyperglycemic], [diabetic mice], [diabetic rats], [phytotherapy], Relevant synonyms and related terms: [Hypoglycemic agents], [diabetes mellitus experimental], [insulin resistance], [medicinal plants], [Laboratory animals], free-text terms: (mice and rats), [plants], [DM], This will result in search result: 23.130 hits	

7.	Repeat step 6 for SC2	This will result in search result: SC2 SC2: Diabetes's disease 3.300.000 hits	
8.	Combine search results for SC1 and SC2	SC1 AND SC2: 2.610 hits	
9.	Repeat step B for remaining components (i.e. SC3 and occasionally SC4)	SC3: Laboratory animals 4.800 hits SC4: postprandial glucose 741 hits	
10.	Combine search results of all the separate SCs	SC1 AND SC2 AND SC3: 621 hits SC1 AND SC2 AND SC3 AND SC4: 109 hits	
11.	Evaluate search results	all results were evaluated for duplicity, possibility of data extraction. 29 hits	
12.	Transfer search results into a reference software	Citations have been saved (reference + abstract + source) in reference Programs	
Study characteristics to be extracted (for assessment of external validity, reporting quality)			
13.	Study ID (e.g. authors, year)	Authors, year, DOI, full title, Journal name	
14.	Identify literature databases to search (e.g. Pubmed, Embase, Web of science)	☒ MEDLINE via PubMed ☒ Web of Science ☐ SCOPUS ☐ EMBASE ☒ Other, namely: Google Scholar, ScienceDirect, SciELO. ☐ Specific journal(s), namely:	
15.	Methods for data extraction/retrieval (e.g. first extraction from graphs using a digital screen ruler, then contacting authors)	1. From text 2. From graphs 3. If necessary, the authors of the article may be contacted	
Final approval by (names, affiliations): Date: 21.08.2021			
1. Alanne Lucena de Brito, 2. Widarlane Ângela da Silva Alves, 3. Francisco Borja Ruiz reverter, 4. Eduardo Carvalho Lira.			

APÊNCICE C- Processo Nº 23076.004793/2015-42



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-920 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8040 / 2126 8351
Fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 14 de maio de 2015.

Ofício nº 46/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.º Eduardo de Carvalho Lira**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.004793/2015-42

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Avaliação do Efeito Antidiabético, Hipolipemiante e Antioxidante do Extrato Etanólico Bruto de Bauhinia Cheilanthes (Bongard) Steudel e Morus nigra L em Ratos Bases Moleculares e Alvos Terapêuticos**".

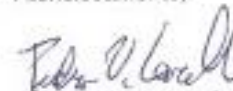
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia da UFPE; Animais: Ratos isogênicos; Linhagem: Wistar; Peso: 210-220g; Sexo: macho; Nº total de animais: 113.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Cavalli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

CCB: Integrar para desenvolver

APÊNCICE D- Processo Nº 23076.042497/2015-22



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Dr. Prof. Nelson Chaves, s/n.
50670-420 / Recife - PE - Brasil
E-mail: (55-81) 2126 8840 / 2126 8351
Fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 09 de dezembro de 2015.

Ofício nº 124/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Eduardo de Carvalho Lira**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.041497/2015-22

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Avaliação da toxicidade aguda *in vivo* do extrato etanólico bruto de *Anadenanthera colubrina* Vell (Brenan) em ratos**".

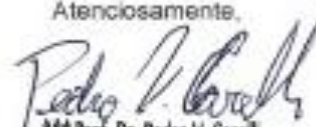
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento Fisiologia e Farmacologia – CCB/UFPE; Animais: Ratos heterogênicos; Linhagem: Wistar; Peso: 210-220g; Sexo: fêmeas; Número total de animais: 15.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1.801.584