



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
Centro Acadêmico de Vitória – CAV
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica – PPGNAFPF

Dionísio Henrique Amaral da Silva

**Efeito antidiabético das frações hexânica e clorofômica do extrato etanólico bruto das
folhas de *Morus nigra* em ratos**

Vitória de Santo Antão

2018



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
Centro Acadêmico de Vitória – CAV
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica – PPGNAFPF

Dionísio Henrique Amaral da Silva

**Efeito antidiabético das frações hexânica e clorofômica do extrato etanólico bruto das
folhas de *Morus nigra* em ratos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, área de concentração Bases experimentais e clínicas da plasticidade Fenotípica para obtenção de título de Mestre.

Orientador: Eduardo Carvalho Lira
Coorientadora: Dayane Aparecida Gomes

Vitória de Santo Antão

2018

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Fernanda Bernardo Ferreira, CRB4/2165

S586e Silva, Dionísio Henrique Amaral da
Efeito antidiabético das frações hexânica e clorofômica do extrato etanólico
bruto das folhas de *Morus nigra* em ratos/ Dionísio Henrique Amaral da Silva. -
Vitória de Santo Antão, 2018.
63 folhas; fig.; tab.

Orientador: Eduardo Carvalho Lira.
Coorientadora: Dayane Aparecida Gomes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV,
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade
Fenotípica, 2018.
Inclui referências e anexo.

1. Plantas Medicinais. 2. Diabetes Mellitus. 3. Diabetes Induzida por
Estreptozocina. I. Lira, Eduardo Carvalho (Orientador). II. Gomes, Dayane
Aparecida. (coorientadora). III. Título.

011/2019 615.321CDD (23.ed.) BIBCAV/UFPE-

DIONÍSIO HENRIQUE AMARAL DA SILVA

EFEITO ANTIDIABÉTICO DAS FRAÇÕES HEXÂNICA E CLOROFÔMICA DO
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *MORUS NIGRA* EM RATOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, área de concentração Bases experimentais e clínicas da plasticidade Fenotípica para obtenção de título de Mestre.

Aprovado em: 26/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Eduardo Carvalho Lira (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr.^a Mariana Pinheiro Fernandes (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr.^a Elizabeth do Nascimento (Examinador Interno)
Universidade Estadual de Pernambuco

Prof^o. Dr.^a Glória Isolina Boente Pinto Duarte (Examinador Interno)
Universidade Estadual de Pernambuco

Dedico esse trabalho a Deus, minha esposa, família e amigos, que com seu apoio me ajudaram nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças para sempre seguir em frente.

Aos meus pais, pelo suporte e dedicação incondicional. Minha mãe que sempre me incentivou a ir mais além e meu pai que sempre mostrou a importância de aprender e dar sempre o máximo de mim. Me espelho sempre em vocês.

Aos meus irmãos, por me mostrarem que não sou o único que passa por provações, com eles aprendi que ações são mais importantes que palavras. Nossa união me dá forças.

A minha esposa por fazer parte da minha vida, sempre me incentivando a prosseguir, estando incessantemente ao meu lado, me compreendendo e me ajudando sempre que possível. Obrigado por ser sempre tão amiga e companheira.

A todos do programa de pós-graduação, funcionários e professores por me acolherem e me tratarem muito bem nesses anos. Inclusive a minha co-orientadora professora Doutora Dayane Aparecida Gomes pelo incentivo e auxílio na construção do conhecimento.

Ao meu orientador professor Doutor Eduardo Lira, por ter me mostrado a importância dos estudos para formação profissional, sua excelente didática me auxiliou grandemente na busca pelo conhecimento e sua dedicação ao ensino é um exemplo a ser seguido, muitíssimo obrigado, sem sua ajuda não teria conseguido.

Aos amigos que fiz durante no decorrer da pós-graduação, principalmente Humberto Barbosa, com o qual compartilhei bom tempo do mestrado, sua colaboração foi de fundamental importância e sua amizade foi um dos maiores presentes do mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos durante o desenvolvimento deste trabalho e também pelo auxílio financeiro dedicado a presente pesquisa, que possibilitou a realização desse trabalho.

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por proporcionar um ambiente de aprendizagem que contribuiu grandemente para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Acarb	Acarbose
AGEs	Produtos Finais de Glicação Avançada
ALT	Alanina Aminotransferase
ALP	Fosfatase Alcalina
Akt	Proteína quinase B
AST	Aspartato Aminotransferase
AUC	Área sob a curva;
AVC	Acidente vascular cerebral
C	Controle
CAT	Catalase
Clo-Mn	Fração clorofórmica do extrato etanólico das folhas de <i>Morus Nigra</i>
CT	Colesterol Total
D	Diabético
DA	Doença de Alzheimer
DCV	Doenças Cardiovasculares
DI	Diabético tratado com insulina (3 Unid./dia)
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
D _{Clo-Mn}	Diabéticos tratados com a fração clorofórmica do extrato etanólico bruto das folhas de <i>M. nigra</i> .
D _{Hex-Mn}	Diabéticos tratados com a fração hexânica do extrato etanólico bruto das folhas de <i>M. nigra</i> .
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DNJ	Desoxinojirimicina
EPI	Tecido adiposo epididimal
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EDL	Extensor Longo dos Dedos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEB	Extrato etanólico bruto
Flor	Floridizina
GLUT2	Transportador de glicose isoforma 2
GLUT4	Transportador de glicose isoforma 4

GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduced
GSSG	Glutathione oxidized
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
Hex-Mn	Fração hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>Morus Nigra</i>
iNOS	Oxido nítrico sintase induzível
IkTT	constante de depuração de glicose
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
ITT	Teste de tolerância à insulina
KCl	Cloreto de sódio
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
M	Média
<i>M. nigra</i>	<i>Morus nigra</i> L.
MDA	Malonaldeído
NF-κB	Fator nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
OGTT	Teste de tolerância oral à glicose;
OSTT	Teste de tolerância ao amido
OSucTT	Teste de tolerância à sacarose
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PPAR	Receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma
RETRO	Tecido adiposo retroperitoneal
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SGLT 1	Co-transportador Na ⁺ /glicose isoforma 1
SGLT 2	Co-transportador Na ⁺ /glicose isoforma 2
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Streptozotocina

TAB	Tecido adiposo branco
TBAR	Reação ao ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicerídeos
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	Trisaminometano
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da streptozotocina.....	18
Figura 2 - Principais vias envolvidas na homeostase de glicose. A glicose derivada da dieta ou fontes endógenas estimula a secreção de insulina. A insulina promove a absorção de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo, opondo-se a glicogenólise hepática	21
Figura 3 - <i>Morus nigra</i> (amora negra ou amora miúra).....	26
Figura 4 - Representação do desenho experimental utilizado para avaliação dos efeitos da Hex-Mn e Clo-Mn no DM e suas complicações em ratos normais e diabéticos.....	31
Figura 5 - Efeitos da Hex-Mn e Clo-Mn na glicemia pós-prandial (A) durante 21 dias de tratamento e de jejum (B) ao término do experimento. Os dados foram expressos como média $\pm$ EP, (n = 5 a 7). @ para D vs. C; * para DHex-Mn vs D, # para DI vs D.	37
Figura 6 - Efeitos das frações Hex-Mn e Clo-Mn na variação de ganho ponderal (A), ingestão alimentar (B) e hídrica (C), volume urinário (D), glicosúria (E) e uréia urinária (F) em experimento subcrônico durante 21 dias. Os dados foram expressos como média $\pm$ EP,.....	40
Figura 7 - Efeitos das frações Hex-Mn e Clo-Mn no conteúdo de glicogênio hepático em experimento subcrônico durante 21 dias de tratamento. Os dados são expressos como média $\pm$ EP, n = 4 a 9. @ para D vs. C; * para DHex-Mn vs. D, # para DI vs D.	42
Figura 8 - Efeito da fração Hex-Mn no OGTT em experimento subcrônico após 21 dias de tratamento. Utilizado o Anova Two way para determinação de diferença nos diferentes pontos da curva (A) e Anova One way para o teste da área sob a curva (AUC) (B). Os dados são expressos como média $\pm$ EP, (n = 4 a 7). @ p<0,05 D vs. C; * p<0,05 DHex-Mn vs. D, # p<0,05 Flor vs D. (Flor = Floridzin).....	43
Figura 9 - Efeito da fração Hex-Mn no OSucTT em experimento subcrônico após 21 dias de tratamento. Utilizado o Anova Two way para determinação de diferença nos diferentes pontos da curva (A) e Anova One way para o teste da área sob a curva (AUC) (B). Os dados são expressos como média $\pm$ EP, (n = 4 a 7). @ p<0,05 D vs. C; * p<0,05 DHex-Mn vs. D, # p<0,05 Acarb vs D. (Acarb = Acarbose).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Efeito cumulativo da fração Hex-Mn e Clo-Mn na massa corporal, volume urinário, ingestão alimentar e hídrica, glicosúria e ureia plasmática de ratos diabéticos (D), diabéticos tratados com a fração Hex-Mn (DHex-Mn), fração Clo-Mn (DClo-Mn), insulina (D)	38
Tabela 2 - Efeitos do tratamento com a fração Hex-Mn e Clo-Mn na massa de órgãos e tecidos de ratos diabéticos (D), diabéticos tratados com a fração hexânica (DHex-Mn), fração clorofórmica (DClo-Mn) do extrato etanólico das folhas de M. Nigra, insulina (DI) e an.....	39
Tabela 3 - Efeitos do tratamento com as frações Hex-Mn e Clo-Mn em parâmetros bioquímicos de ratos diabéticos (D), diabéticos tratados com a fração Hex-Mn (DHex-Mn), fração Clo-Mn (DClo-Mn), insulina (DI) e animais controle (C) em experimento subcrônico durante 21 dias.....	41

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é um dos principais distúrbios metabólicos que afeta, atualmente, 415 milhões de pessoas no mundo. A progressão do DM é complexa e envolve diferentes fatores, como a inflamação e o intenso estresse oxidativo, que estão diretamente associados ao aumento das comorbidades diabéticas e alta mortalidade dos pacientes. Infelizmente, a terapia farmacológica atualmente empregada é limitada por seus efeitos adversos e sua ineficiência na prevenção das complicações do DM, o que tem motivado o desenvolvimento de novos agentes hipoglicemiantes. Neste sentido, esta proposta busca avaliar o efeito antidiabético, hipolipemiante e antioxidante *in vivo* da fração hexânica (Hex-Mn) e clorofórmica (Clo-Mn) do extrato das folhas de *Morus nigra* L. Para isso o DM foi induzido por estreptozotocina (STZ, 40mg/kg, i.v.) em ratos Wistar machos com 200±20g de peso. Os animais diabéticos e diabéticos tratados (400mg/Kg, v.o) com Hex-Mn e Clo-Mn, bem como os animais controle e diabéticos tratados com insulina (3U/d), foram mantidos em gaiola metabólica por 21 dias. A glicemia pós-prandial foi monitorada nos dias 0, 7, 14, e 21º dias de tratamento e o peso, quantidade de urina e ingesta alimentar e hídrica foram mensurados diariamente. Ao término do experimento, os animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta de soro e tecidos para mensuração do perfil bioquímico, glicogênio hepático e perfil oxidativo. Além disso, a massa dos músculos *soleus* e extensor digital longo (EDL), tecido adiposo epididimal (EPI) e retroperitoneal (RETRO), tecido hepático e cardíaco foram determinados. Um outro grupo de animais foi utilizado para avaliar a tolerância à insulina e realizar os testes de tolerância oral à glicose (OGTT), à sacarose (OSucTT) e ao amido (OSTT). Valores significativos foram assumidos quando $p < 0,05$. O tratamento com a Hex-Mn reduziu a glicemia pós-prandial e de jejum, e apresentou efeito antidiabético. A Clo-Mn preveniu o agravamento do quadro hiperglicêmico, sem efeitos de redução na hiperglicemia. Ambas as frações apresentaram efeito sobre redução de triglicérides e preservação de tecido adiposo, além de melhorar ALT e ALP que permite inferir um efeito hepatoprotetor. O grupo tratado com a Hex-Mn melhorou o ganho ponderal, o que foi acompanhado da preservação dos tecidos adiposos e muscular. O tratamento com a Hex-Mn retardou o pico glicêmico no OGTT, apresentando efeito nas áreas sob a curva do OGTT, OSucTT e OSTT, o que sugere que Hex-Mn atua reduzindo digestão e absorção de carboidratos. Houve melhora nos níveis hepáticos de glicogênio e na tolerância à insulina nos animais tratados com a Hex-Mn o que ao somado ao maior ganho ponderal no grupo tratado com a Hex-Mn sugere um efeito de maior sensibilidade periférica à insulina. Houve redução da produção de malondialdeído, mostrando efeito antioxidante.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*. Estreptozotocina. Glicemia. Tolerância à insulina. Glicogênio hepático. Antioxidante.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is one of the major metabolic disorders that currently affects 415 million people worldwide, with the perspective of this number reaching about 642 million in 2040. The progression of DM is complex and involves different factors such as inflammation and intense oxidative stress, which are directly associated with increased diabetic comorbidities and high patient mortality. Unfortunately, the pharmacological therapy currently employed is limited by its adverse effects and its inefficiency in the prevention of DM complications, such as dyslipidemia and intense oxidative stress, which has motivated the development of new hypoglycemic agents. In this sense, this proposal aims to evaluate the anti-diabetic, lipid-lowering and anti-oxidant effect of the hexane and chloroform fraction of *Morus nigra* L. leaf extract. For this, DM was induced by streptozotocin (STZ, 40mg / kg, iv) in male Wistar rats (200 ± 20 g), and diabetic and diabetic treated animals (400mg/Kg) with hexane or chloroform fractions from leaf extract of *Morus nigra*, also control and insulin animals (3U/d), were kept in a metabolic cage for 21 days. Postprandial glycemia was monitored on days 0, 7, 14, and 21 days of treatment and weight, urine amount and food and water intake were measured daily. At the end of the experiment, the animals were anesthetized and euthanized to collect serum and tissues to measure the biochemical profile, hepatic glycogen and oxidative profile. In addition, soleus mass and long digital extensor (EDL), epididymal adipose tissue (EPI) and retroperitoneal (RETRO), hepatic and cardiac tissue were determined. Another group of animals was used to assess insulin tolerance and perform oral tolerance tests on glucose, sucrose and starch. Significant values were assumed when $p < 0.05$. Treatment with the Hex-Mn fraction reduced postprandial and fasting glycemia and had an antidiabetic effect. The Clo-Mn fraction prevented a worsening of the hyperglycemic condition, without reduction effects on hyperglycemia. Both fractions had an effect on the reduction of triglycerides and preservation of adipose tissue, besides improving ALT and ALP, that allows to infer a hepatoprotect effect. The group treated with the Hex-Mn fraction improved the weight gain, which was accompanied by the preservation of adipose and muscular tissues. Treatment with the Hex-Mn fraction delayed the glycemic peak in OGTT, as well as had an effect on OSucTT and OSTT. There was improvement in hepatic glycogen levels and insulin tolerance in animals treated with the Hex-Mn fraction, as well as reduction of malondialdehyde production, showing antioxidant effect.

Key words: Diabetes mellitus. Streptozotocin. Glycemia. Insulin tolerance. Hepatic glycogen. Antioxidant.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>Diabetes mellitus (DM)</i>	17
2.1.1 Epidemiologia e conceito da doença.	17
2.2 <i>Principais Formas do DM (Tipo I, II, III e gestacional) e Streptozotocina (STZ) na indução de DM</i>	17
2.3 <i>Fisiopatologia do diabetes</i>	19
2.4 <i>Efeitos do diabetes na digestão de carboidratos</i>	20
2.5 <i>Estresse oxidativo e comorbidades diabéticas</i>	21
2.6 <i>Tratamento do DM</i>	23
2.6.1 Farmacologia do diabetes	23
2.6.2 Uso de plantas no tratamento do diabetes	24
2.7 <i>Morus nigra</i>	25
3 OBJETIVO	28
3.1 <i>Objetivo Geral</i>	28
3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	28
4 HIPÓTESE	29
5 MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1 <i>Considerações éticas</i>	30
5.2 <i>Processamento do Material Vegetal e Obtenção do Extrato Etanólico Bruto e Frações Hexânica e Clorofórmica do Extrato Etanólico das Folhas de Morus nigra.</i>	30
5.3 <i>Animais</i>	30
5.4 <i>Indução do Diabetes mellitus e Parâmetros Metabólicos</i>	31
5.5 <i>Efeito das frações Hex-Mn e Clo-Mn no Diabetes Mellitus</i>	32
5.6 <i>Efeito das frações Hex-Mn e Clo-Mn na Massa Muscular Esquelética e Tecido Adiposo</i>	32
5.7 <i>Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT)</i>	32
5.8 <i>Teste de Tolerância Oral à Sacarose (OSucTT)</i>	33
5.9 <i>Teste de Tolerância Oral ao Amido (OSTT)</i>	33
5.10 <i>Perfil Bioquímico</i>	33
5.11 <i>Glicogênio Hepático</i>	33
5.12 <i>Teste de tolerância à insulina (ITT)</i>	34

5.13 Avaliação do Efeito da Fração Hex-Mn no Estresse Oxidativo em Animais Diabéticos	34
5.14 Determinação da Concentração de malonaldeído (MDA)	35
5.15 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	35
5.16 Determinação da Atividade da Catalase	35
5.17 Níveis de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e Razão glutathiona reduzida (GSH)/ glutathiona oxidada (GSSG)	36
5.18 Determinação dos níveis de nitrito	36
5.19 Análise Estatística	36
6 RESULTADOS	37
6.1 Efeito sobre a glicemia de animais diabéticos e parâmetros metabólicos gerais das frações Hex-Mn e Clo-Mn	37
6.2 Mecanismos hepáticos envolvidos nos efeitos antidiabéticos	41
6.3 Efeito da fração Hex-Mn na tolerância oral à glicose, sacarose e amido	42
6.4 Efeito sobre a sensibilidade à insulina	44
6.5 Efeito sobre o perfil antioxidante	45
7 DISCUSSÃO	46
8 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	63

1 INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* (DM) é uma desordem metabólica caracterizada pela hiperglicemia crônica, decorrente de alterações no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos. (OLIVEIRA *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2015). Atualmente existem 415 milhões de pessoas no mundo diagnosticadas com DM, com a perspectiva deste número alcançar 640 milhões em 2040 (IDF, 2015). No Brasil, a Sociedade Brasileira de Diabetes estimou a existência de 11,9 milhões de pessoas com diabetes em 2014, na faixa etária de 20 a 79 anos, podendo alcançar 19,2 milhões em 2035. Além do impacto econômico elevado, o DM compromete a expectativa e qualidade de vida da população.

Atualmente, existem tratamentos para o DM através da modificação de hábitos de vida, que envolve dieta e exercício físico, e a terapia farmacológica através de hipoglicemiantes orais e/ou a administração de insulina exógena, (COHEN; HORTON, 2007; DEROSA; SIBILLA, 2007). Entretanto, seu uso é limitado pelos efeitos colaterais dos fármacos ou baixa adesão dos pacientes aos programas de modificação de estilo de vida. Diante disso, é justificado o interesse da comunidade científica em avaliar extratos vegetais na busca por novas moléculas que possam ser eficientes no controle glicêmico em longo prazo e com isso prevenir ou atenuar as comorbidades diabéticas como a dislipidemia diabética e as doenças neurodegenerativas e, portanto, a redução na expectativa e na qualidade de vida destes pacientes.

As plantas medicinais têm sido tradicionalmente usadas em várias partes do mundo como alternativas à medicina tradicional (CORREIA *et al.*, 2016). O uso dessas plantas tem sido uma estratégia devido ao limitado acesso aos serviços de saúde (OLIVEIRA *et al.*, 2008), atrelado ao fato que, desde antigamente, elas têm sido usadas para tratar doenças devido à sua disponibilidade, viabilidade econômica e eficácia observada, além disso, o uso de medicamentos oriundos de vegetais tem sido utilizado em conjunto com as terapias convencionais, desse modo, as plantas tem sido investigadas a fim de descobrir novos agentes capazes de auxiliar o tratamento de diferentes doenças (MISHRA *et al.*, 2016).

Estudos etnobotânicos com plantas e ervas medicinais tem demonstrado efeito no tratamento do DM, apresentando ações anti-hiperglicêmicas, maior proteção antioxidante e efeitos anti-hiperlipidêmicos (LI *et al.*, 2004; SHEN *et al.*, 2008; BHATTACHARYA *et al.*, 2013; AHMED *et al.*, 2015; ARCARO *et al.*, 2016).

Sendo assim, este projeto investigará a atividade antidiabética, hipolipemiante e antioxidante das frações hexânica do extrato etanólico bruto das folhas de *M. nigra* (Hex-Mn) e da fração clorofórmica do extrato etanólico bruto das folhas de *M. nigra* (Clo-Mn) em ratos diabéticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Diabetes mellitus (DM)*

2.1.1 Epidemiologia e conceito da doença.

DM é uma desordem metabólica caracterizada pela hiperglicemia crônica, decorrente de alterações no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos, causada por secreção insuficiente de insulina e/ou resistência a insulina (OLIVEIRA *et al.*,2008; ARAÚJO *et al.*,2015; PANIGRAHI *et al.*,2016).

A DM representa um grande problema para a saúde pública e uma doença crônica prevalentemente crescente. No ano de 2000 projetou-se um crescimento preocupante no número de diabéticos, em cerca de 171 milhões com estimativa de chegar em 366 milhões em 2030 (WILD *et al.*,2004), entretanto esta previsão foi morbidamente alcançada já em 2011. Sabe-se que mais de 400 milhões de pessoas têm diabetes e estima-se que o número de pacientes diabéticos eleve-se a mais de 640 milhões até 2040 (GAO *et al.*,2016).

O Brasil ocupa a 4ª posição entre os países com maior prevalência de diabetes, com cerca de 13,4 milhões de pessoas portadoras da doença, o que corresponde a aproximadamente 6,5% da população entre 20 e 79 anos de idade (IDF, 2015). Logo, existe um crescente trabalho na prevenção e no tratamento do DM, inclusive no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que previnam as comorbidades diabéticas, além de melhorar a expectativa e a qualidade de vida de pacientes diabéticos.

2.2 *Principais Formas do DM (Tipo I, II, III e gestacional) e Streptozotocina (STZ) na indução de DM*

Os tipos mais comuns de DM são as do tipo 1 e tipo 2, sendo a DM tipo 1 causada por reação autoimune, onde ocorre destruição das células beta no pâncreas por intermédio do sistema imune acarretando a um comprometimento da produção de insulina. Já no DM tipo 2 existe produção de insulina, mas ocorre uma resistência nos tecidos, comprometendo sua ação, somado a isso, a progressão da doença pode levar a níveis insuficientes de insulina (IDF 2015).

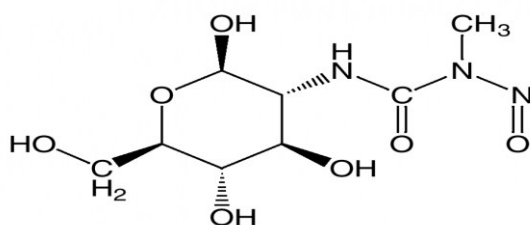
Recentemente tem sido discutida associação entre a doença de Alzheimer (DA) e DM, ambas as condições estão relacionadas à idade, e nas últimas décadas, surgiu uma ligação interessante entre as duas doenças em vários estudos (BIESSELS *et al.*,2006; AKTER *et*

al.,2011), por isso foi proposto o termo "diabetes tipo 3" para definir a DA induzida pela resistência à insulina (DE LA MONTE, 2014), mas é preciso esclarecer que o termo ainda não é utilizado em diretrizes. Evidências epidemiológicas mostram um risco quase duplicado para DA em pacientes diabéticos, em comparação com não-diabéticos, mostrou-se ainda um risco aumentado quando associado à insulino terapia (OTT *et al.*,1999; Haan, 2006). Embora as conexões fisiopatológicas ainda não estejam completamente elucidadas, dois principais pontos-chave foram identificados para explicar esta associação: resistência à insulina e vias de sinalização inflamatória (MITTAL; KATARE, 2016).

Existe ainda, o diabetes gestacional (DMG) que é um tipo de diabetes que ocorre na gravidez e geralmente se resolve após o parto. O DMG está associado ao parto por cesariana, hemorragia pós-parto e risco a longo prazo de desenvolver DM tipo 2. As complicações neonatais incluem macrosomia, distócia de ombro e hipoglicemia neonatal (KALOK *et al.*,2018). Apesar de sua baixa incidência, o cuidado é importante, já que há fortes evidências de que o tratamento do DMG reduz significativamente a morbidade materna e neonatal (CROWTHER *et al.*,2005; LANDON *et al.*,2009).

O modelo de animal diabético induzido por estreptozotocina (STZ) tem sido usado para investigar o DM e suas complicações (ZHANG *et al.*,2018) por promover toxicidade seletiva das células β pancreáticas, devido a presença de molécula de glicose na sua estrutura química (Figura 1), o que permite que ela seja absorvida através do transportador de glicose isoforma 2 (GLUT 2) (ELSNER *et al.*,2000). A estreptozotocina inibe a secreção de insulina e causa um estado de diabetes mellitus insulino-dependente. Ambos os efeitos podem ser atribuídos às suas propriedades químicas específicas, nomeadamente a sua capacidade de alquilação (LENZEN, 2008).

Figura 1 - Estrutura química da streptozotocina



2.3 Fisiopatologia do diabetes

O DM provoca uma série de alterações devido ao controle glicêmico prejudicado, sendo os sintomas associados à hiperglicemia, tais como hiperfagia devido à perda do controle do apetite, proteólise muscular e lipólise que levam a perda de peso, poliúria e aumento da ingestão de água (OLIVEIRA, *et al.*,2008). A DM está associada à resistência a insulina, dislipidemia, obesidade abdominal e esteatose hepática (PANIGRAHI *et al.*,2016), e ainda, os elevados níveis de glicose no sangue podem levar ao desenvolvimento de complicações e comorbidades, tais como neuropatia, nefropatia, retinopatia, doenças cardíacas e uma elevada incidência de acidente vascular cerebral (MORRISH *et al.*,2001; GRAVEL *et al.*,2018). A Sociedade Brasileira de Diabetes possui valores de referência que podem auxiliar no rastreio e diagnóstico do DM, o quadro abaixo demonstra a classificação de acordo com o método utilizado para o rastreio.

Quadro 1 – Critérios para diagnóstico e rastreio do Diabetes *mellitus*

Categoria	Jejum* (mg/dL)	2 h após 75 g de glicose	Casual**
Glicemia normal	< 100 mg/dL	< 140 mg/dL	
Tolerância à glicose diminuída	≥ 100 a < 126 mg/dL	≥ 140 a < 200 mg/dL	
Diabetes <i>mellitus</i>	≥ 126 mg/dL	≥ 200 mg/dL	≥ 200 mg/dL (com sintomas clássicos)***

*O jejum é definido como a falta de ingestão calórica por no mínimo 8 h.

**Glicemia plasmática casual é aquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição.

***Os sintomas clássicos do DM incluem poliúria, polidipsia e perda não explicada de peso

Fonte: Adaptado das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)

Os indivíduos diabéticos apresentam maior risco de doença cardiovascular (DCV) quando comparados a indivíduos sem DM (RAWSHANI *et al.*,2017). Acredita-se que o DM reduz a expectativa de vida, sendo boa parte desse efeito causado por doenças vasculares (SESHASAI *et al.*,2011). O maior risco para DCV em pacientes com DM é causado pela interação entre fatores não modificáveis, como idade, gênero e genética, além de outros fatores como hipertensão, dislipidemia e tabagismo. Entretanto, o controle glicêmico parece reduzir a morbidade e as complicações microvasculares (DUCKWORTH *et al.*,2009).

Além disso, destaca-se também a dislipidemia diabética, caracterizada pelos baixos níveis de colesterol de alta densidade (HDL), elevados índices de triglicérides (TG) e

colesterol de baixa (LDL) e baixíssima densidade (VLDL). Essa dislipidemia é atribuída ao aumento da mobilização de ácidos graxos decorrente da ausência e/ou da resistência à insulina (HUSEINI *et al.*, 2012; KIANBAKHT; DABAGHIAN, 2013), o que está associado ao aumento da incidência de doenças cardíacas e cerebrovasculares (GRAF *et al.*, 2010; CHAVALI; TYAGI; MISHRA, 2013), decorrente do aumento dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres, gerando o acúmulo de lipídios nos cardiomiócitos (lipotoxicidade) que contribui para cardiomiopatia diabética (MAISCH; ALTER; PANKUWEIT, 2011). Neste sentido, alternativas terapêuticas que possam atenuar ou corrigir a dislipidemia diabética são de fundamental importância para evitar o agravamento do DM e suas repercussões sistêmicas.

2.4 Efeitos do diabetes na digestão de carboidratos

A hiperglicemia crônica também está diretamente associada a modificações funcional e estrutural da mucosa intestinal, o que altera a atividade das dissacaridases expressas na borda em escova intestinal e aumenta a captação intestinal de glicose (YOUNOSZAI; SCHEDL, 1972), ou a maior expressão de transportadores de glicose isoforma 2 (GLUT2) nos enterócitos, o que em conjunto contribui decisivamente para o agravamento do estado hiperglicêmico (TOBIN *et al.*, 2008). Além disso, o co-transportador Na⁺/glicose isoforma 1 (SGLT1), que é de primordial importância para a absorção de glicose do lúmen para as células epiteliais do intestino delgado, é expresso na membrana celular apical que constitui a borda em escova, sendo um potencial alvo de intervenção, já que uma inibição nesse transportador reduz a disponibilidade de glicose, reduzindo consequentemente o transporte de glicose via GLUT2 da membrana basolateral para o interstício e, assim, para a circulação (SONG *et al.*, 2016).

Considerando este quadro, a redução da captação intestinal de glicose como alternativa para o controle glicêmico é crucial para atenuar os prejuízos decorrentes da hiperglicemia pós-prandial (DENG *et al.*, 2011). Diferentes estudos têm mostrado o efeito de extratos vegetais na redução da captação intestinal de glicose (GHOLAMHOSEINIAN *et al.*, 2009; VARGHESE *et al.*, 2013). Além disso a inibição da α -glicosidase e α -amilase, enzimas envolvidas na digestão de carboidratos, podem reduzir significativamente o aumento da glicemia pós-prandial após uma dieta com vários tipos de carboidratos, sendo assim uma importante estratégia no manejo dos níveis glicêmicos em pacientes com DM (ALI; HOUGHTON; SOUMYANATH, 2006).

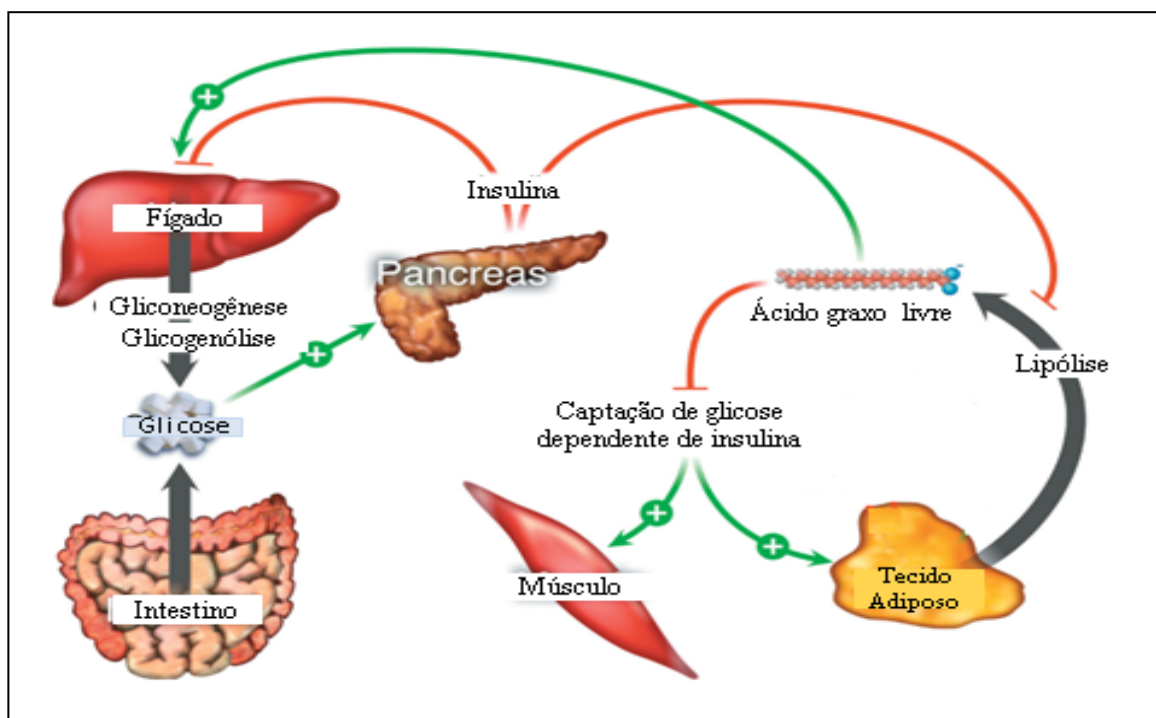
Neste contexto, os compostos fenólicos têm sido descritos como inibidores da α -glicosidase (CAZAROLLI *et al.*, 2008; ORTIZ-ANDRADE *et al.*, 2007), assim como da

atividade do GLUT 2 no intestino (KWON *et al.*,2007), o que torna as espécies vegetais, ricas nestes fitoquímicos, possíveis alternativas terapêuticas ou fontes de novas moléculas para a prevenção das complicações decorrentes do DM. A figura 2 traz um resumo das principais vias envolvidas na homeostase da glicose, onde a atuação de compostos ativos pode gerar uma melhora no controle glicêmico.

2.5 Estresse oxidativo e comorbidades diabéticas

É bem compreendido que o estado redox da célula é regulado pelo balanço entre os sistemas oxidantes e antioxidantes, de modo que o desequilíbrio entre eles pode gerar produção excessiva de radicais livres (BONETTO *et al.*,2009). A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o ânion superóxido, radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são contrabalanceados por sistemas antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) e não enzimáticos como as vitaminas, glutathione e outros (BONETTO *et al.*,2009).

Figura 2 - Principais vias envolvidas na homeostase de glicose. A glicose derivada da dieta ou fontes endógenas estimula a secreção de insulina. A insulina promove a absorção de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo, opondo-se a glicogenólise hepática.



Fonte: Adaptado de EVANS; BARISH; WANG, 2004.

De modo que, a manutenção, assim como variações estreitas do estado redox, é fundamental para homeostasia celular. Nesta perspectiva, o estresse oxidativo é um dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia de diversas doenças, inclusive no desenvolvimento do diabetes mellitus e suas complicações (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003; CERIALO, 2003), fato que tem renovado na literatura o interesse no efeito de antioxidantes naturais como alternativa terapêutica para melhorar ou atenuar a hiperglicemia e suas repercussões fisiológicas.

Usualmente, no DM ocorre o aumento da produção de radicais livres associado à redução das defesas antioxidantes (MCLENNAN *et al.*, 1991; YOUNG *et al.*, 1995), cujos mecanismos não são completamente compreendidos. É bem demonstrado que a hiperglicemia crônica é determinante na geração do estresse oxidativo característico do DM e suas complicações (ZELKO *et al.*, 2002). Diferentes mecanismos têm sido propostos para geração de radicais livres no DM, dentre eles a metabolização da glicose como a principal fonte formadora de ROS (MARITIM *et al.*, 2003) e a formação do produto Amadori e seus produtos finais de glicação avançada, os quais, através de seus receptores celulares, modificam e inativam enzimas (MCCARTHY *et al.*, 2001), estimulam a produção de ROS (BAYNES; THORPE, 1999), bem como eleva a atividade transcricional do fator nuclear kappa B (NFkB), uma via classicamente inflamatória (MOHAMED *et al.*, 1999). De todo modo, a hiperglicemia crônica, através do estresse oxidativo, compromete funcionalmente proteínas celulares, fosfolípidios de membrana e ácidos nucléicos, além de estimular a produção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (MARITIM *et al.*, 2003; SAMADDER *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2013), eventos fortemente relacionados ao desenvolvimento das comorbidades diabéticas, inclusive a dislipidemia e a neurodegeneração.

Em ratos diabéticos induzidos por STZ, observa-se aumento do nível TNF- α e NF-kB fosforilado no pâncreas. Já foi descrito que a hiperglicemia aumenta o nível de TNF- α , que ativa o NF-kB por fosforilação, causando aumento dos níveis de expressão de citocinas inflamatórias e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A iNOS gera grandes quantidades de óxido nítrico (NO), que possui um papel crucial em várias doenças inflamatórias (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Diante disso, é crescente o interesse da ciência no efeito de antioxidantes naturais como alternativa terapêutica para melhorar ou atenuar a hiperglicemia e suas repercussões fisiopatológicas.

2.6 Tratamento do DM

2.6.1 Farmacologia do diabetes

Atualmente, existem alternativas de tratamento para o DM através da modificação de hábitos de vida (dieta e exercício físico) e a terapia farmacológica através de hipoglicemiantes orais ou a administração de insulina exógena (COHEN; HORTON, 2007; DEROSA; SIBILLA, 2007). O tratamento do DM, bem como a prevenção de suas complicações e comorbidades exigem frequentemente o uso de múltiplos medicamentos, também chamada de polifarmácia, que aumenta o risco de interações multidrogas levando a reações adversas a medicamentos (PIRMOHAMED *et al.*, 2004). Além disso, o risco dessas reações e de falha no tratamento parece estar aumentado em pacientes com DM. De fato, foi relatado que pacientes com DM tendem a apresentar respostas muito variáveis a diferentes drogas, enquanto alguns pacientes são resistentes outros são mais sensíveis a determinadas drogas (HALL *et al.*, 2011).

A insulina é um hormônio secretado pelas células β pancreáticas que tem como principal função controlar a glicemia (WHITE, 2003), sendo utilizada no tratamento do DM. A insulina ao se ligar ao receptor de insulina (IR) desencadeia as vias de sinalização, incluindo o substrato IR (IRS), a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), a proteína quinase B (Akt), culminando na translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4), permitindo a absorção de glicose em tecidos sensíveis à insulina, como o tecido adiposo e o músculo esquelético (SALTIEL; KAHN, 2001).

O método de administração de insulina é através de injeções subcutâneas, que não é metabolicamente controlada pelo fígado e, portanto, leva à retenção de insulina na circulação sanguínea, uma condição conhecida como hiperinsulinemia que pode causar resistência periférica à insulina e imunogenicidade (KANZARKAR *et al.*, 2015).

A resistência à insulina é uma característica marcante do DM tipo 2, para seu tratamento são utilizados os sensibilizadores de insulina, como a biguanida ou a tiazolidinediona, (TAHRANI *et al.*, 2016). No entanto, metformina ou rosiglitazona, uma das biguanidas e tiazolidinediona, respectivamente, são utilizadas como terapia adjuvante no tratamento da DM tipo 1 mal controlado metabolicamente e melhora o controle glicêmico ao reduzir a dose de insulina (STROWIG; RASKIN, 2005; BACHA; KLINEPETER BARTZ, 2016). Além disso, podem prevenir a resistência à insulina periférica nos depósitos subcutâneos de injeção de insulina, que é causada pela terapia com insulina. Apesar da terapia farmacológica melhorar a sensibilidade à insulina, os agentes terapêuticos atualmente

disponíveis como sensibilizadores de insulina têm efeitos adversos, incluindo edema, ganho de peso e risco de insuficiência cardíaca congestiva (HANDELSMAN *et al.*, 2015).

2.6.2 Uso de plantas no tratamento do diabetes

Uma série de plantas medicinais tem sido amplamente utilizada como alimentos funcionais e medicamentos alternativos para a prevenção e tratamento de diversas doenças. As plantas são consideradas como uma fonte potencial de vários compostos bioativos e devido ao uso tradicional de longo prazo e pesquisas científicas, incluindo testes farmacológicos e toxicológicos, a segurança e eficácia das plantas medicinais foram bem aceitas. Além disso, as terapias de plantas são mais acessíveis em comparação com medicamentos modernos. Por estas razões, as plantas medicinais tornam-se uma parte importante do sistema de saúde primário nos dias de hoje (THAIPITAKWONG *et al.*, 2018), desde que seus efeitos tenham sido previamente testados e comprovados.

Estudos etnobotânicos têm identificado plantas candidatas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diferentes patologias, inclusive o DM e suas complicações, a partir do uso popular por comunidades tradicionais (CANALES *et al.*, 2005; ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2010). Entretanto, percebe-se a necessidade de estratégias mais eficientes de bioprospecção que possam reduzir o custo e o tempo investido entre a coleta de material vegetal e o ensaio biológico (ARAÚJO *et al.*, 2008). Neste sentido, espécies ricas em compostos fenólicos (polifenóis e flavonoides), moléculas com ações antioxidantes e anti-inflamatórias, têm seus efeitos hipoglicemiantes amplamente confirmados (HANHINEVA *et al.*, 2010; BAHADORAN *et al.*, 2013). Estudos epidemiológicos e meta-análises têm mostrado, claramente, uma relação inversa entre o alto consumo de flavonoides na dieta e o desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, DM e dislipidemias (GRAF *et al.*, 2010; ARTS; HOLLMAN, 2005).

Atualmente, o Brasil ocupa a 10ª posição na lista de consumidores mundiais de plantas medicinais (OLIVEIRA *et al.*, 2012), por diferentes razões, dentre elas a biodiversidade, atividade biológica demonstrada, baixo custo para o paciente e reduzido efeito adverso ou tóxico (LIMA *et al.*, 2013). A partir disto, o uso de produtos de origem vegetal passou a ser regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária com o objetivo de garantir a qualidade destes produtos, assim como o SUS tem empreendido esforços para garantir à

população o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, permitindo o uso sustentável da biodiversidade. Considerando que o Brasil detém uma das maiores biodiversidades do mundo, o conhecimento de sua flora e princípios bioativos nela existentes se torna estratégico para o desenvolvimento econômico do país, a preservação do patrimônio botânico e para a saúde pública.

Dentre os biomas brasileiros, a Caatinga se destaca como o único inteiramente nacional, com todos os seus limites em território brasileiro. Tradicionalmente, a Caatinga foi considerada por décadas pobre em diversidade biológica, não existindo interesse em se conhecer melhor este ecossistema, o que o tornou um dos mais ameaçados do mundo (JAZEN *et al.*, 1997). Contrariando este entendimento, estudos recentes têm revelado a exuberante biodiversidade da Caatinga, assim como mostrado que as espécies nativas ou exóticas são amplamente utilizadas na medicina popular e na fabricação de fitoterápicos, tais como *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Amburana cearensis* (Arr. Cam.), *Erythrina velutina* Willd., *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul, *Bauhinia cheilantha* (Bong) Steud. e *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn. (ALMEIDA; ALBUQUERQUE, 2002; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007). Associado a isso, sabe-se que espécies presentes neste bioma apresentam uma forte tendência para polifenóis (ALMEIDA *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE *et al.*, 2012), com uma ampla variedade de efeitos farmacológicos comprovados, dentre eles os efeitos anti-inflamatórios, antioxidante, hipolipemiante e antidiabético (BABU *et al.*, 2013; BAHADORAN *et al.*, 2013).

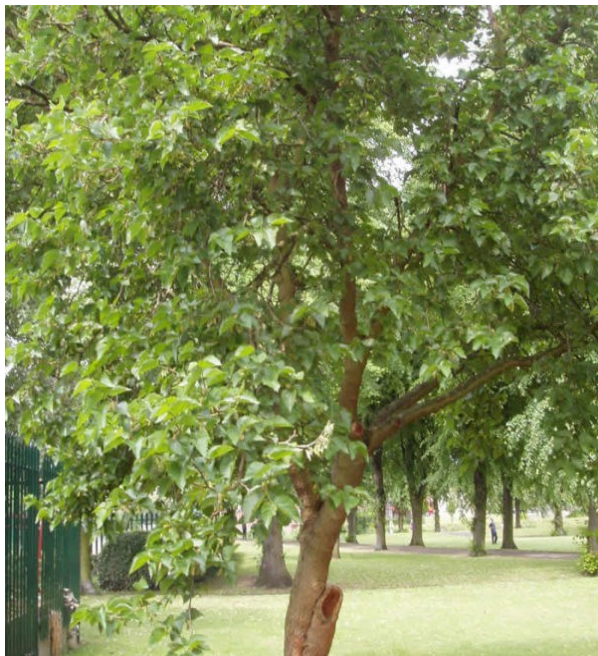
2.7 *Morus nigra*

A família Moraceae (ordem Urticales) da qual faz parte o gênero *Morus* tem ampla ocorrência na Ásia, África, Europa, América do Sul e do Norte (WEIGUO *et al.*, 2005). São plantas bem versáteis, conhecidas como plantas de uso medicinal, sendo uma excelente fonte de nutrientes e fitoquímicos, além disso, também são consideradas como alimento funcional (SRIVASTAVA *et al.*, 2006). As folhas também são adicionadas na ração do gado leiteiro devido ao efeito positivo sobre a produção de leite (GUPTA *et al.*, 2005). Além disso, os chás feitos com as folhas de amoreira são consumidos como uma bebida saudável entre os países asiáticos e dentre os remédios populares utilizados, são incluídas outras partes da amoreira como as cascas, raízes e frutos, que tradicionalmente são usadas para o tratamento de febre, tosse, hiperlipidemia, hipertensão e hiperglicemia (CHAN *et al.*, 2016).

Produtos derivados das folhas são comercializados na forma de pós, extratos e cápsulas, sendo disponibilizados como alimentos funcionais e suplementos dietéticos que auxiliam no controle do peso corporal e glicemia. Além disso, estudos científicos sugerem que folhas de amoreira contêm um grupo de compostos bioativos e possuem vários efeitos, sendo mais descritos os efeitos antihiperglicêmico, antihiperlipidêmico, anti-hipertensivo, antioxidante, anti-inflamatório, cardioprotetor e até anti-obesidade (THAIPITAKWONG *et al.*,2018)

Corroborando a importância da flora medicinal que ocorre da Caatinga, estudos do nosso (JUNIOR *et al.*,2017) e de outros grupos (ARAÚJO *et al.*,2015, VOLPATO *et al.*,2011) têm demonstrado o efeito hipoglicemiante e hipolipemiante do extrato etanólico bruto das folhas de *Morus nigra* L. uma planta de origem asiática, mas amplamente utilizada por comunidades tradicionais na Caatinga por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes e rica em compostos fenólicos (WANG, HU, 2011) cujos mecanismos ainda são pouco conhecidos.

Figura 3 - *Morus nigra* (amora negra ou amora miúra)



Fonte: Disponível em <<http://leafland.co.nz/product/morus-nigra-black-mulberry>> Acesso em: 18 jan. 2018

No Brasil a *M. nigra* ocorre em diferentes regiões brasileiras, inclusive no nordeste, e se destaca por suas propriedades medicinais. Os frutos, as folhas e as cascas demonstram efeitos laxativo, sedativo, expectorante, diurético, anti-inflamatório, hipoglicemiante, entre

outros (ERCISLI; ORHAN, 2007; LORENZI; MATOS, 2008). É popularmente conhecida como “amora miúra” e amplamente utilizada na medicina popular (MIRANDA *et al.*, 2010). A *M. nigra* apresenta níveis elevados de metabólitos secundários, principalmente compostos fenólicos e flavonóides (KIMURA *et al.*, 1986), razão pela qual o fracionamento do extrato bruto se torna essencial para discriminar o possível fitoquímico majoritário responsável pelo efeito hipoglicemiante amplamente descrito.

3 OBJETIVO

3.1 *Objetivo Geral*

Avaliar o potencial antidiabético, hipolipemiante e antioxidante das frações Hex-Mn e Clo-Mn em ratos diabéticos.

3.2 *Objetivos Específicos*

Avaliar os efeitos subcrônicos *in vivo* das frações Hex-Mn e Clo-Mn nos seguintes parâmetros metabólicos em ratos diabéticos:

- a) Glicemia de jejum e pós-prandial;
- b) Parâmetros metabólicos gerais (ganho de massa ponderal, volume urinário, ingestão hídrica e alimentar);
- c) Perfil bioquímico;
- d) Conteúdo de glicogênio hepático;
- e) Tolerância à insulina;
- f) Tolerância oral à glicose, à sacarose e ao amido;
- g) Avaliação do efeito antioxidante.

4 HIPÓTESE

As frações Hex-Mn e a Clo-Mn possuem atividade antidiabética, hipolipemiante e antioxidante.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Considerações éticas

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais de biotério foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE (CEUA) sob o número de protocolo 0042/2016 (Anexo I) previamente ao início deste trabalho.

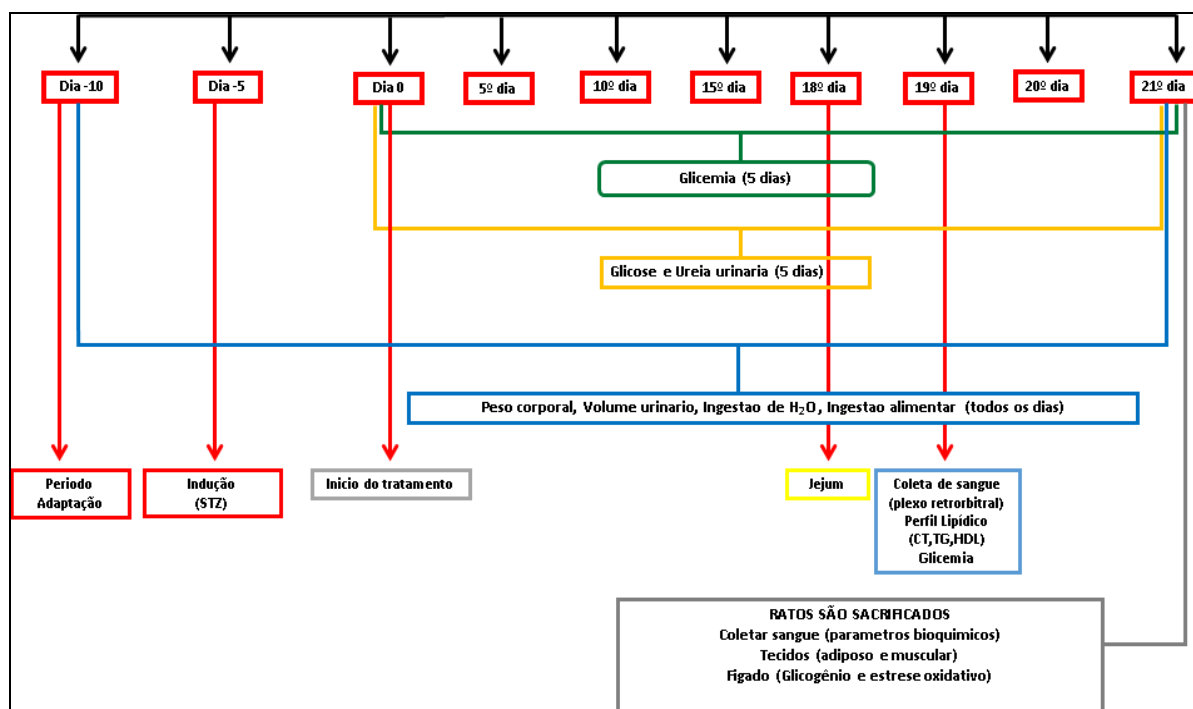
5.2 Processamento do Material Vegetal e Obtenção do Extrato Etanólico Bruto e Frações Hexânica e Clorofórmica do Extrato Etanólico das Folhas de *Morus nigra*.

Para confecção do extrato etanólico bruto (EEB) e suas frações foram utilizadas as folhas de *M. nigra*. O material vegetal foi dessecado em estufa com ar circulante à temperatura média de 40°C durante três dias. Após a secagem e completa estabilização (eliminação de água e inativação enzimática). O material vegetal seco e pulverizado em moinho foi submetido à maceração exaustiva com etanol 95% em um recipiente de aço inoxidável. Foram realizadas 3 extrações num intervalo de 72 horas entre cada extração até completo esgotamento do solvente. A solução extrativa obtida passou por um processo de destilação do solvente em evaporador rotativo (RV8, Ika®) à pressão reduzida, a temperatura média de 50°C. Após a evaporação do solvente, obteve-se o EEB da *M. nigra* que foi particionado com solventes em gradiente crescente de polaridade (hexano e clorofórmio).

5.3 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar machos, com massa corporal entre 180 e 200g do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores (LABINA® 5002, 23% de proteínas; 4% de gorduras; 50% carboidratos e 23% de outros componentes) e tiveram acesso à água *ad libitum*, em ambiente com ciclos claro-escuro de 12 horas (ciclo claro: 6h00 às 18h00) e temperatura mantida a 23°C ± 1°C. Foram avaliados os efeitos antidiabéticos, parâmetros bioquímicos e de gaiola metabólica em animais controle e diabéticos (Figura 4), não foram utilizados os mesmos animais submetidos ao teste de tolerância oral a carboidratos e ao teste de tolerância à insulina.

Figura 4 - Representação do desenho experimental utilizado para avaliação dos efeitos da Hex-Mn e Clo-Mn no DM e suas complicações em ratos normais e diabéticos.



Fonte: SILVA, D. H. A., 2018.

5.4 Indução do Diabetes mellitus e Parâmetros Metabólicos

Após 12 horas de jejum, os animais foram inicialmente anestesiados com xilazina (12mg/Kg) e cetamina (80mg/Kg) e tratados com estreptozotocina (STZ, 40mg/Kg, i.v. Sigma[®]) que foi dissolvida em tampão citrato imediatamente antes da indução do diabetes experimental, no volume de 100µL/100g de rato. Após a indução, os animais foram colocados em gaiola metabólica para quantificação dos seguintes parâmetros: (a) variação de massa corporal; (b) ingestão hídrica e alimentar e (c) volume urinário. Após 5 dias da administração de STZ foi quantificada a glicemia pós-prandial dos animais, os quais foram considerados diabéticos aqueles que apresentaram glicemia igual ou superior a 250mg/dL (BAKIREL et al, 2008). O grupo controle recebeu somente tampão citrato pela mesma via de administração e mesmo volume dos animais diabéticos.

5.5 Efeito das frações Hex-Mn e Clo-Mn no Diabetes Mellitus

Os animais foram divididos em 5 grupos: animais controles normoglicêmicos (C), diabéticos não tratados (D), animais diabéticos tratados com as frações hexânica (D_{Hex-Mn}), clorofôrmica (D_{Clo-Mn}) de *M. nigra* e insulina (DI). Os animais do grupo não tratado receberam por gavagem salina 0,9% (10mL/Kg de rato, n=5-8 por grupo), assim como os animais do grupo tratado receberam 400mg/Kg (n=5-8 por grupo) das frações Hex-Mn e Clo-Mn individualmente via oral no mesmo volume dos animais controle. Os animais DI receberam insulina (3U/dia, n=5-8 por grupo) por via subcutânea duas vezes ao dia (às 8h e às 18h). O efeito temporal das frações Hex-Mn, Clo-Mn e da insulina foram avaliados nos níveis glicêmicos dos ratos diabéticos, assim como nos parâmetros metabólicos de variação da massa corporal, volume urinário, ingestão de água e ração durante 21 dias de tratamento.

5.6 Efeito das frações Hex-Mn e Clo-Mn na Massa Muscular Esquelética e Tecido Adiposo

A massa dos músculos *soleus*, extensor digital longo (EDL), assim como a massa de tecido hepático, cardíaco, adiposo epididimal (EPI) e retroperitoneal (RETRO) foi quantificada no 21º dia de tratamento com a fração Hex-Mn, a fração Clo-Mn e insulina em diabéticos tratados e não tratados, além de um grupo de animais controle normoglicêmicos sendo os valores obtidos normalizados através da divisão de seu valor bruto pelo comprimento da tíbia em milímetros.

5.7 Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT)

Em experimentos diferentes, com outros animais, foram utilizados ratos normoglicêmicos (C, n=05 animais) e diabéticos não tratados (D, n=05 animais) e tratados com a fração Hex-Mn (D_{Hex-Mn} 400mg/Kg, n=06 animais) por 21 dias, de acordo com o método descrito por Yusoff *et al.*, (2015) com algumas modificações. A Floridizina, um inibidor do co-transportador Na⁺/glicose 1 (SGLT-1), foi utilizada nestes experimentos como controle positivo (Flor, 200mg/Kg, n=05 animais). Após jejum de 12 horas, foi coletada uma amostra de sangue pela veia caudal dos animais para determinação da glicemia basal. Após a mensuração basal, os animais normais controle e diabéticos não tratados receberam salina, enquanto os animais tratados por 21 dias receberam a dose usual de 400mg/Kg, 10 minutos após administração de salina/extrato os animais receberam uma solução de glicose (1,5g/Kg) através de sonda gástrica. Após a sobrecarga de glicose, foram coletadas amostras de sangue pela veia caudal para determinação da glicemia após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da sobrecarga para determinação do efeito da fração Hex-Mn na tolerância à glicose em animais

diabéticos. A glicemia foi mensurada através do glicosímetro digital (On Call Plus[®]).

5.8 Teste de Tolerância Oral à Sacarose (OSucTT)

O procedimento mencionado na seção anterior foi aplicado de forma semelhante, entretanto foi utilizada sacarose (4g/Kg), sendo C=05 animais, D=05 animais e D_{Hex-Mn}=06 animais. A acarbose, um potente inibidor de α -glicosidase, foi utilizada como controle positivo (Acarb, 10mg/Kg, n=05 animais). A glicemia foi mensurada através do glicosímetro digital (On Call Plus[®]) após 30, 60, 90 e 120 minutos da sobrecarga.

5.9 Teste de Tolerância Oral ao Amido (OSTT)

O procedimento mencionado na seção anterior foi aplicado de forma semelhante, entretanto foi utilizada uma sobrecarga de amido (3g/Kg), sendo C=5 animais, D=06 animais e D_{Hex-Mn}=06 animais. A acarbose, um conhecido inibidor de α -amilase, foi utilizada como controle positivo (Acarb, 10mg/Kg, n=5 animais). A glicemia foi mensurada através do glicosímetro digital (On Call Plus[®]) após 30, 60, 90 e 120 minutos da sobrecarga.

5.10 Perfil Bioquímico

Após 21 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados por excesso de anestésicos e amostras de sangue total foram coletadas. Em seguida, o sangue foi centrifugado (2.000 rpm) e o soro coletado para determinação dos níveis de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), colesterol HDL (HDL), transaminases hepáticas, fosfatase alcalina, glicemia, proteínas totais, albumina, glicerol e ureia dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados e não tratados através de kits comerciais (Labtest[®]). A glicosúria foi determinada pelo método da orto-toluidina (NEPOMUCENO, 1998) e a ureia urinária através de kit comercial (Labtest[®]).

5.11 Glicogênio Hepático

A dosagem do glicogênio hepático foi realizada de acordo com o método de Carrol e colaboradores (1955) nos grupos C, D, D_{Hex-Mn}, D_{Clo-Mn} e DI (n= 5 a 8 animais). Foram coletados cerca de 500mg de tecido hepático que foram digeridas em tubos de vidro contendo 2mL de hidróxido de potássio (KOH) a 30% e levados ao banho-maria a 100°C por 60 minutos. Em seguida, foi pipetado em todos os tubos de ensaio, 60 μ L de solução saturada de sulfato de sódio (Na₂SO₄) e 4,5mL de álcool absoluto (99%). Os tubos foram agitados em vórtex e retornaram ao banho-maria a 100°C por até 15 segundos, sendo retirados e centrifugados a 2.500 r.p.m. a 25°C por 10 minutos e o sobrenadante descartado por inversão dos tubos. Ao precipitado foram acrescentados 2mL de água destilada e levado ao banho-

Maria a 100°C. Após dissolver o precipitado, foram pipetados 4,5mL de álcool absoluto (99%) sob agitação no vórtex. Os tubos retornaram ao banho-maria a 100°C por até 15 segundos e centrifugados a 2.500 r.p.m. a 25°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão dos tubos. Foram pipetados 2mL de ácido benzóico saturado e o precipitado foi dissolvido com o auxílio de um bastão de vidro. O volume foi transferido para uma proveta de 10mL. Para a primeira diluição das amostras hepáticas, foram pipetados 9mL de ácido benzoico e acrescentado 1mL da amostra presente na proveta. Na segunda diluição, foram pipetados 0,75mL de água destilada e acrescentado 0,25mL da primeira diluição (valor total da diluição 200x). Na sequência, os tubos foram imersos em gelo e 2mL do reativo de antrona foi adicionado vagarosamente à solução. Os tubos foram agitados no vórtex e levados ao banho-maria a 100°C por 10 minutos. Após resfriamento, a leitura foi realizada em um comprimento de onda de 620nm. Uma curva padrão foi confeccionada a partir de uma solução de 0,1% de glicose dissolvida em ácido benzoico saturado de forma a fornecer soluções que contenham 20, 30 e 50µg por 1mL. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de glicogênio por 1000g de tecido.

5.12 Teste de tolerância à insulina (ITT).

O teste de tolerância à insulina (ITT) foi avaliado ao término dos 21 dias de tratamento. Os animais D e D_{Hex-Mn} foram submetidos a jejum prévio de 6 horas e tratados com insulina ultrarrápida (0.75 U/kg m.c.) via intraperitoneal (n= 05 animais por grupo). A glicemia foi avaliada no tempo zero (antes da administração da insulina) e após 4, 8, 12, 16 minutos. A constante de depuração de glicose (IkTT) foi calculada no intervalo de tempo entre 0 e 16 minutos para determinar a tolerância à insulina, sendo expresso em unidades arbitrárias (BONORA *et al.*, 1989).

5.13 Avaliação do Efeito da Fração Hex-Mn no Estresse Oxidativo em Animais Diabéticos

Após 21 dias de tratamento, amostras com cerca de 500mg do coração dos animais do grupo C (n=7 animais), D (n=7 animais), D_{Hex-Mn} (n=5 animais) foram coletadas para obtenção de homogenato do tecido e posterior avaliação da peroxidação lipídica através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase e a atividade da glutatona reduzida e oxidada. O homogenato foi obtido a partir dos tecidos que foram homogeneizadas em 2 mL de tampão de extração (50mM Tris base pH 7,4; 1mM EDTA; 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonila, 1mM ortovanadato de sódio)

a 4 °C. Os homogeneizados foram centrifugados a 3550 rpm durante 10 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram recolhidos e guardados a -80 °C, para que posteriormente fossem utilizados para a análise de estresse oxidativo. Os níveis de proteína nos sobrenadantes foram determinados pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão.

5.14 Determinação da Concentração de malonaldeído (MDA)

A peroxidação lipídica nos homogenatos de coração foi estimada colorimetricamente através da TBARS de acordo com Ohkawa *et al.*, (1979), com algumas adaptações. Em resumo, 0,1 mL dos homogenatos foram misturados com 0,08 mL de SDS a 8,1%, 0,6 mL de ácido acético a 20% (pH 3,5), 0,6 mL de TBA a 0,8% e aquecida a 95 °C durante 60 min. Após o resfriamento até temperatura ambiente, foram adicionados 0,6 mL de n-butanol misturado e em seguida centrifugado a $3000 \times g$ durante 10 min. 0,3 mL do sobrenadante foi coletado e estimadas as absorvâncias a 532 nm, sendo os resultados expressos em U/mg de proteína. A curva de calibração foi preparada com padrão de malondialdeído (MDA).

5.15 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A determinação da atividade total da SOD foi realizada de acordo com o método de Misra e Fridovich (MISRA; FRIDOVICH, 1972). Os sobrenadantes (0,06 mL), recolhidos a partir do coração homogeneizado após centrifugação, foram incubados com 0,920 mL de carbonato de sódio 0,1M, EDTA 0,1mM (pH10,2) a 37 °C. Foram adicionados trinta milimoles por litro de epinefrina (em ácido acético a 0,05%) e a atividade de SOD a 37°C foi medida pela cinética de inibição da auto-oxidação de epinefrina a 480 nm e o decaimento da absorvância foi acompanhada por 90 segundos (MISRA; FRIDOVICH, 1972). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína necessária para inibir a auto-oxidação de 1 μ mol de epinefrina por minuto. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

5.16 Determinação da Atividade da Catalase

Foi retirado 0,06 mL do homogeneizado do coração para medir a atividade da CAT de acordo com o método descrito por Aebi (AEBI, 1984). O princípio do ensaio baseia-se na determinação da constante de velocidade (k) da decomposição de H_2O_2 , que em nossas condições de temperatura e pH foi definida como $4,6 \times 10^7$. A constante de velocidade da enzima foi determinada medindo a variação na absorvância (a 240 nm) por minuto durante um período de 4 minutos a 30 °C (AEBI, 1984), em um meio de reação, contendo tampão

fosfato 50mM (pH=7,0) amostra e H₂O₂ (300mM). Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de proteína necessária para converter 1 μmol de H₂O₂ por minuto em H₂O. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

5.17 Níveis de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e Razão glutathiona reduzida (GSH)/ glutathiona oxidada (GSSG)

Adicionou-se 0,05 mL do homogeneizado do coração ao tampão fosfato 0,1 M (pH 8,0) contendo EDTA 5 mM e incubou-se com oftaldialdeído (OPT, 1 mg/mL) à temperatura ambiente durante 15 min. A intensidade de fluorescência foi medida com excitação de 350 nm e comprimentos de onda de emissão de 420 nm, para análise do GSSG utilizou-se a N-etilmaleimida para evitar interferências da GSH na medição (HISSIN; HILF, 1976). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

5.18 Determinação dos níveis de nitrito

Os níveis de óxido nítrico foram medidos com base na estimativa de nitrito total que foi obtida pela reação de Greiss, adaptada do método de Tiwari *et al.*, (TIWARI *et al.*, 2011). Foram adicionados 100 μL do homogenato dos tecidos a 100 μL de reagente de Greiss, na temperatura de 25°C, e realizada a medida em placas de 96 poços a 570 nm utilizando um espectrofotômetro. As concentrações de nitrito foram calculadas usando uma curva padrão que variava de 100 a 1,56 μM de nitrito de sódio (NaNO₂). Os níveis de nitrito estão expressos como μM.

5.19 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (M±EP). Para comparação entre duas médias foi utilizado o teste *t* de *Student*, análise múltipla de dados a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey e ANOVA de duas vias para as curvas de tolerância oral a carboidratos e parâmetros que variaram ao longo do experimento como ingesta hídrica e alimentar, peso, glicemia e volume urinário. O nível de significância foi considerado maior ou igual a 95% (p<0,05). Para análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 6[®].

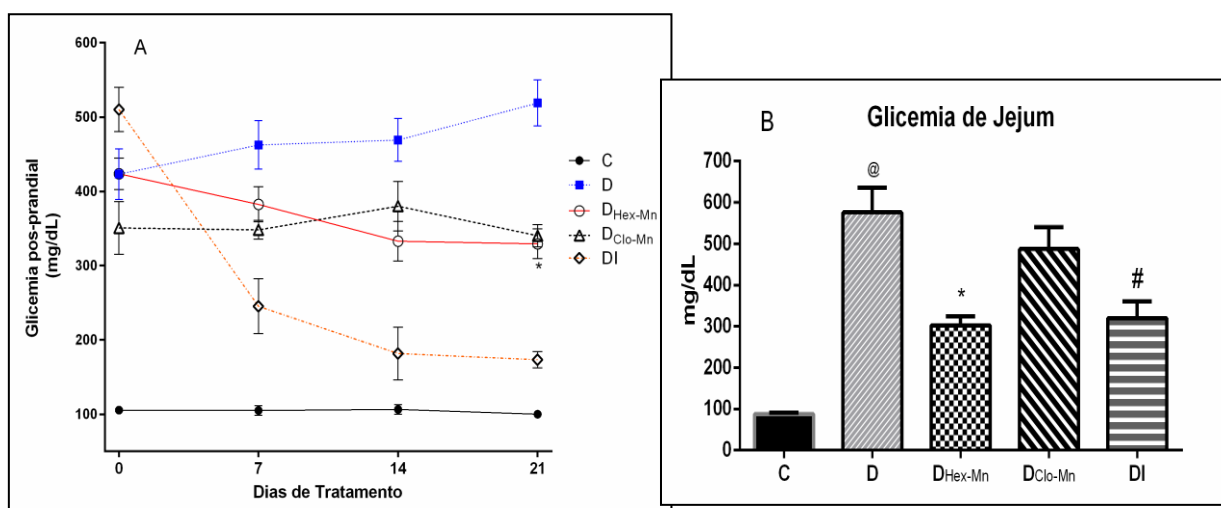
6 RESULTADOS

6.1 Efeito sobre a glicemia de animais diabéticos e parâmetros metabólicos gerais das frações Hex-Mn e Clo-Mn

Como esperado, o modelo de DM experimental induzido pela STZ elevou a glicemia pós-prandial (D: $546,4 \pm 49,3$ vs C: $111,3 \pm 8,6$ mg/dL, $n=5-7$ por grupo, $p<0,05$) e a glicemia de jejum dos ratos (D: $576,2 \pm 59,6$ vs C: $87,6 \pm 3,7$ mg/dL, $n=5-7$ por grupo, $p<0,05$) em relação ao grupo controle (Figura 5). Além disso, a STZ produziu os sinais clássicos do DM, como a perda de massa corporal, poliúria, polidipsia e polifagia (tabela 1).

O tratamento com a fração Hex-Mn reduziu a glicemia pós-prandial (40%) ao longo do tratamento e também a glicemia de jejum (40%) ao término do experimento (figura 5). Além de atenuar a poliúria, a polidipsia, a uréia plasmática e urinária, e a glicosúria, os animais tratados com a fração Hex-Mn apresentaram maior ganho ponderal quando comparados com os animais diabéticos sem tratamento (tabela 1), entretanto, não houve alteração na polifagia (figura 6).

Figura 5 - Efeitos das frações Hex-Mn e Clo-Mn na glicemia pós-prandial (A) durante 21 dias de tratamento e de jejum (B) ao término do experimento. Os dados foram expressos como média $\pm$ EP, ($n = 5$ a 7). @ para D vs. C; * para D_{Hex-Mn} vs D, # para DI vs D.



Fonte: SILVA, D. H. A., 2018.

Tabela 1 - Efeito cumulativo das frações Hex-Mn e Clo-Mn na massa corporal, volume urinário, ingestão alimentar e hídrica, glicosúria e ureia plasmática de ratos diabéticos (D), diabéticos tratados com a fração Hex-Mn (D_{Hex-Mn}), fração Clo-Mn (D_{Clo-Mn}), insulina (DI) e animais controle (C), somação de valores diários em experimento subcrônico durante 21 dias de tratamento.

	C	D	D _{Hex-Mn}	D _{Clo-Mn}	DI
Ganho Ponderal (g)	78±9,1	15,1±8,8 [@]	42,0±2,6 [*]	32,0±7,4	86,6±6,9 [#]
Vol. Urinário total (ml)	315,8±19,1	2.910,4±142,3 [@]	1.796,0±173,4 [*]	2.478,8±282,6	709,1±50,6 [#]
Ingestão hídrica (ml)	857,5±52,0	3.522,4±177,6 [@]	2.583,7±314,4 [*]	3.077,0±254,8	1.365,1±82,2 [#]
Ingestão alimentar (g)	545,0±43,3	827,8±16,8 [@]	800,3±35,6	814,8±19,8	672,1±20,3 [#]
Ureia plasmática (mg/dL)	7,3±1,3	104,6±17,2 [@]	57,3±16,4 [*]	68,9±10,5	10,3±0,5 [#]
Glicosúria (mg/24h)	7,9±2,3	13521,4±1431,2 [@]	7838,1±470,8 [*]	9808,7±643,9	1792,7±553,4 [#]

Os dados foram expressos como média ± EP, (n = 5 a 9). [@] p<0,05 D vs. C; ^{*} p<0,05 D_{Hex-Mn} vs D; [#] p<0,05 DI vs D.

Fonte: SILVA, D. H. A., 2018.

A glicosúria induzida pela STZ foi reduzida a partir do 5º dia, assim como a ureia urinária no grupo DHex-Mn. No grupo DI esse efeito também foi detectado a partir do 5º dia de tratamento em ambos os parâmetros. A fração Hex-Mn reduziu em 31,5% e 32,5%, nesta mesma ordem, a excreção urinária de glicose e ureia (figura 6).

A fração Clo-Mn preveniu o agravamento do quadro hiperglicêmico, sem efeitos de redução na hiperglicemia pós-prandial e de jejum (figura 5), ou quaisquer outros parâmetros metabólicos (tabela 1).

Tabela 2 - Efeitos do tratamento com as frações Hex-Mn e Clo-Mn na massa de órgãos e tecidos de ratos diabéticos (D), diabéticos tratados com a fração hexânica (D_{Hex-Mn}), fração clorofórmica (D_{Clo-Mn}) do extrato etanólico das folhas de *M. Nigra*, insulina (DI) e animais controle (C) em experimento subcrônico ao término de 21 dias de tratamento

	C	D	D _{Hex-Mn}	D _{Clo-Mn}	DI
Fígado (g/mm de tibia)	276,9±16,9	249,2±10,1	272,4±12,9	266,2±7,5	288,1±10,2
Coração(g/mm de tibia)	25,4±1,2	20,04±1,1	20,85±0,8	20,76±0,6	25,6±1,4 [#]
Peso (g)	312,3±9,6	226,5±9,7 [@]	268,3±15,7*	251,6±10,5	306,3±8,9 [#]
RETRO(mg/mm de tibia)	66,2±8,4	2,69±1,34 [@]	32,44±2,2*	24,34±4,5*	77,0±6,7 [#]
EPI (mg/ mm de tibia)	62,7±2,9	20,6±4,1 [@]	47,7±4,6*	42,8±5,4	66,3±5,6 [#]
EDL(mg/ mm de tibia)	0,981±0,038	0,631±0,045 [@]	0,781±0,027*	0,735±0,035	0,923±0,019 [#]
<i>Soleus</i> (mg/mm de tibia)	0,758±0,059	0,536±0,020 [@]	0,656±0,039	0,610±0,023	0,685±0,016 [#]

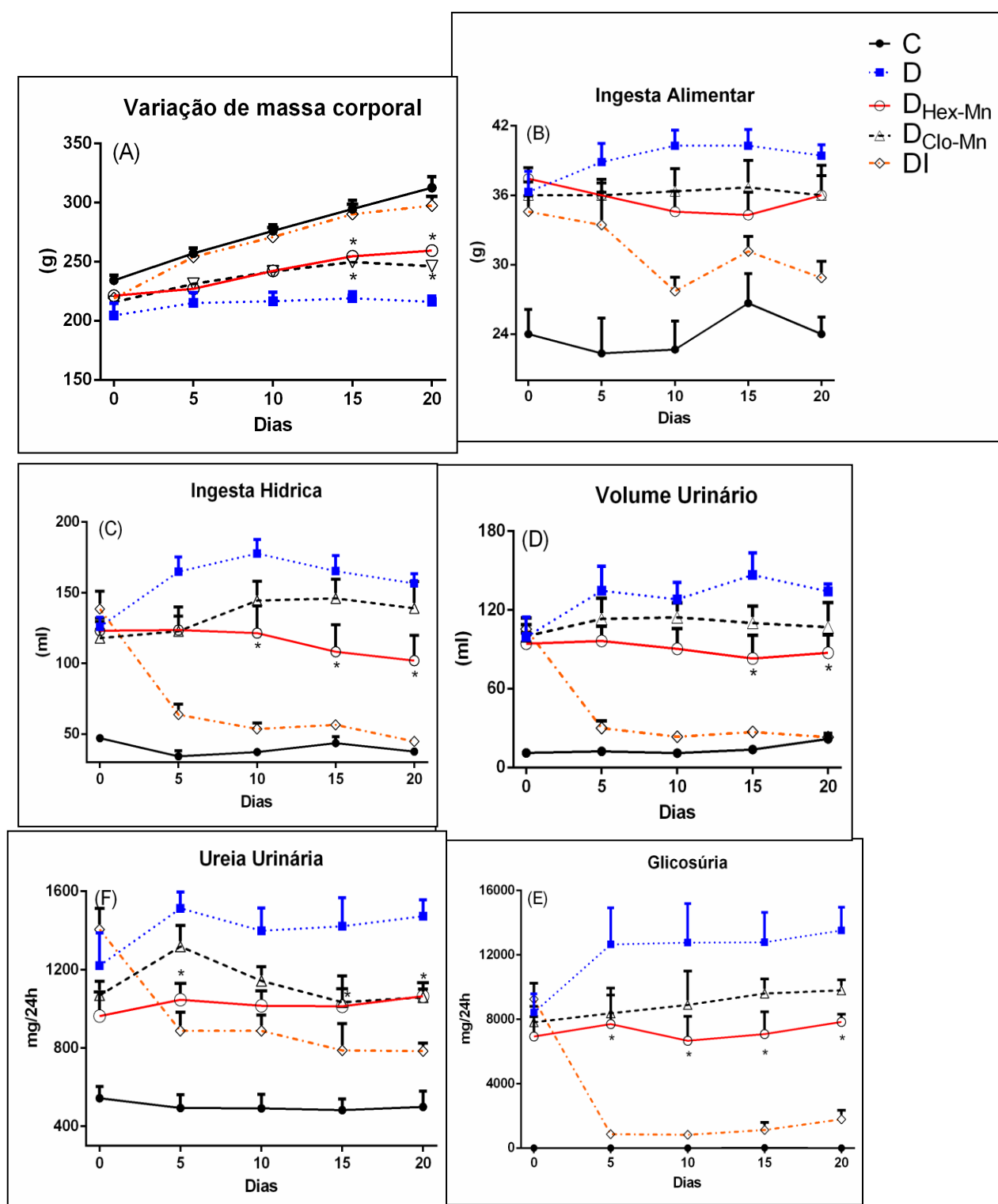
Os dados foram expressos como média ± EP, (n = 5 a 8). [@] p<0,05 D vs. C; * p<0,05 D_{Hex-Mn} ou D_{Clo-Mn} vs. D, [#] p<0,05 DI vs D.

Fonte: SILVA, D. H. A., 2018.

Além disso, o DM induzido por STZ alterou a massa corporal total, com redução de peso, acompanhado de menor massa de tecido adiposo epididimal (3 vezes menos) e retroperitoneal (20 vezes menos), bem como redução na massa dos músculos EDL (35,6%) e *soleus* (29%). O tratamento com a fração Hex-Mn reduziu a perda de massa nos tecidos EPI (231%), RETRO (1205%) e EDL (23,7%) sem alteração em músculos *soleus* (tabela 2).

Não houve diferença na massa corporal dos animais tratados com a fração Clo-Mn, que apesar de não prevenir a perda de massa muscular, apresentou efeito sobre o tecido adiposo preservando o RETRO (728%). Não houve alteração na massa do tecido hepático induzida pelo diabetes ou pelo tratamento com as frações avaliadas, já no tecido cardíaco, apesar de não haver diferença significativa entre os controles e os diabéticos, os animais que receberam insulina tiveram valores de massa cardíaca reestabelecidos aos valores normais (tabela 2).

Figura 6 - Efeitos das frações Hex-Mn e Clo-Mn na variação de ganho ponderal (A), ingestão alimentar (B) e hídrica (C), volume urinário (D), glicosúria (E) e uréia urinária (F) em experimento subcrônico durante 21 dias. Os dados foram expressos como média $\pm$ EP, (n = 5 a 11) * $p < 0,05$ D_{Hex-Mn} ou D_{Clo-Mn} vs. D



6.2 Mecanismos hepáticos envolvidos nos efeitos antidiabéticos

A STZ induziu aumento nos níveis de fosfatase alcalina, aspartato e alanina aminotransferases, triglicerídeos e VLDL e colesterol total, sem alterações nos níveis de fração HDL-C (tabela 3). A hipertrigliceridemia foi atenuada pelo tratamento com as frações Hex-Mn e Clo-Mn, 31% e 50% respectivamente, havendo redução de VLDL (~30% e ~50%, respectivamente), níveis de glicerol (~60% e ~66%, respectivamente), bem como ambas as frações reduziram os níveis de ALT (~50% e ~55%, respectivamente) e ALP (ambos ~37%). Não houve efeito dos tratamentos com as diferentes frações nos demais parâmetros bioquímicos analisados (tabela 3).

A indução do DM reduziu o conteúdo de glicogênio hepático, o que foi atenuado no grupo D_{Hex-Mn} (3,2 vezes), níveis semelhantes aos animais diabéticos tratados com insulina (Figura 7).

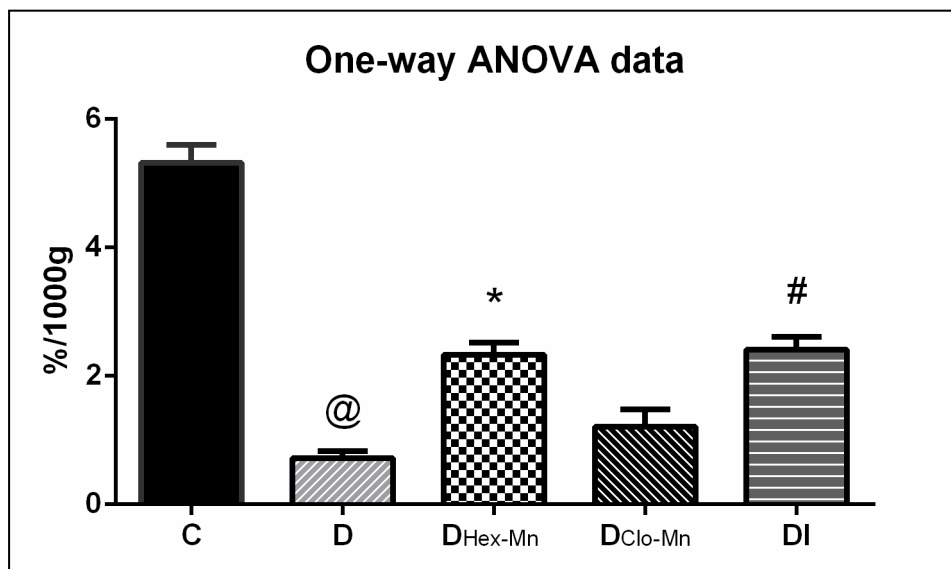
Tabela 3 - Efeitos do tratamento com as frações Hex-Mn e Clo-Mn em parâmetros bioquímicos de ratos diabéticos (D), diabéticos tratados com a fração Hex-Mn (D_{Hex-Mn}), fração Clo-Mn (D_{Clo-Mn}), insulina (DI) e animais controle (C) em experimento subcrônico durante 21 dias.

	C	D	D _{Hex-Mn}	D _{Clo-Mn}	DI
TG (mg/dL)	35,3±3,2	168,2±10,2 [@]	116,0±5,2*	84,6±17,8*	65,2±7,2 [#]
VLDL (mg/dL)	6,43±0,1	33,65±2,0 [@]	23,67±1,0*	16,93±3,5*	11,32±0,9 [#]
CT (mg/dL)	44,8±3,1	64,0±4,1 [@]	51,6±3,1	59,6±3,4	61,3±2,6
HDL-C (mg/dL)	34,7±2,4	31,9±2,1	40,8±3,0	31,3±3,0	36,9±2,8
Glicerol (ml/dL)	23,1±3,3	79,42±7,4 [@]	32,4±6,3*	26,7±1,3*	--
Ptn Total (g/dL)	5,8±0,3	5,8±0,2	6,9±0,2	6,2±0,3	7,1±0,3
Alb (g/dL)	2,4±0,2	2,4±0,1	2,4±0,0	2,4±0,1	2,9±0,4
Globulina	2,8±0,35	3,8±0,26	3,9±0,26	3,3±0,35	3,9±0,31
AST (U/mL)	139,9±25,1	243,4±22,9 [@]	219,8±17,1	198,9±15,5	213,7±8,5
ALT (U/mL)	58,7±4,2	255,6±39,2 [@]	124,0±6,6*	115,3±8,9*	102,0±6,2 [#]
ALP (U/mL)	32,8±4,2	138,5±11,8 [@]	86,6±5,1*	86,3±12,1*	66,3±6,6 [#]

Os dados foram expressos como média ± EP, (n = 5 a 9). [@] p<0,05 D vs. C; * p<0,05 D_{Hex-Mn} ou D_{Clo-Mn} vs. D, [#] p<0,05 DI vs D.

Fonte: SILVA, D. H. A., 2018.

Figura 7 - Efeitos das frações Hex-Mn e Clo-Mn no conteúdo de glicogênio hepático em experimento subcrônico durante 21 dias de tratamento. Os dados são expressos como média $\pm$ EP, n = 4 a 9. @ para D vs. C; * para D_{Hex-Mn} vs. D, # para DI vs D.



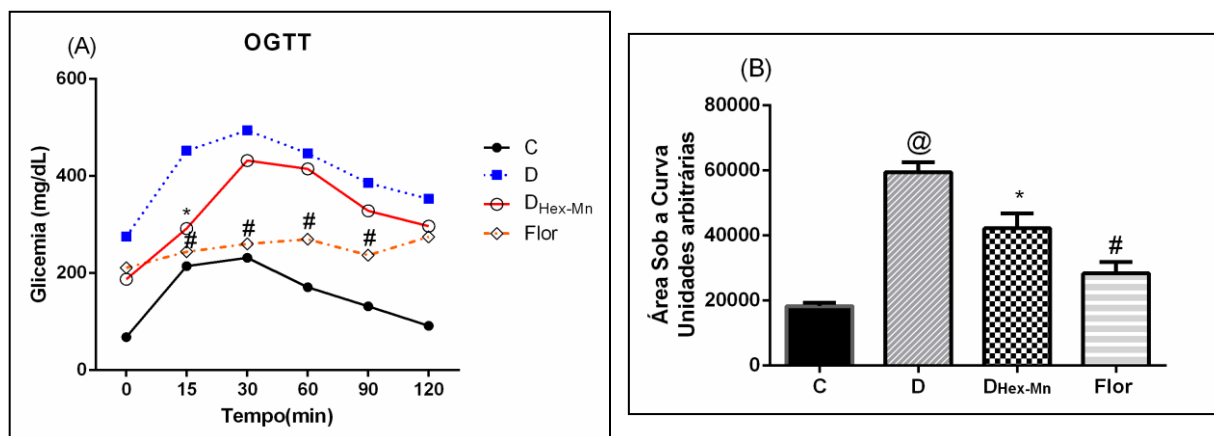
Fonte: SILVA, D. H. A., 2018.

6.3 Efeito da fração Hex-Mn na tolerância oral à glicose, sacarose e amido

Tendo em vista que o tratamento com a fração Hex-Mn teve efeito antidibético mais potente, hipotetizou-se mecanismos que pudessem envolver a digestão e/ou absorção de carboidratos no intestino. A STZ induziu intolerância oral à carboidratos simples e complexos (figuras 8, 9 e 10). Os valores iniciais de glicemia dos grupos diabéticos, tratados ou não, não diferiram entre si. Após a sobrecarga de glicose, o pico glicêmico foi 210% maior no grupo D em relação ao grupo C (D:452,1 $\pm$ 27,0 vs C:214,8 $\pm$ 16,2 mg/dL). O tratamento por 21 dias com a fração Hex-Mn alterou a área sob a curva (AUC) dos animais D_{Hex-Mn} (p<0,05) e o pico glicêmico foi retardado para 30 minutos (figura 8).

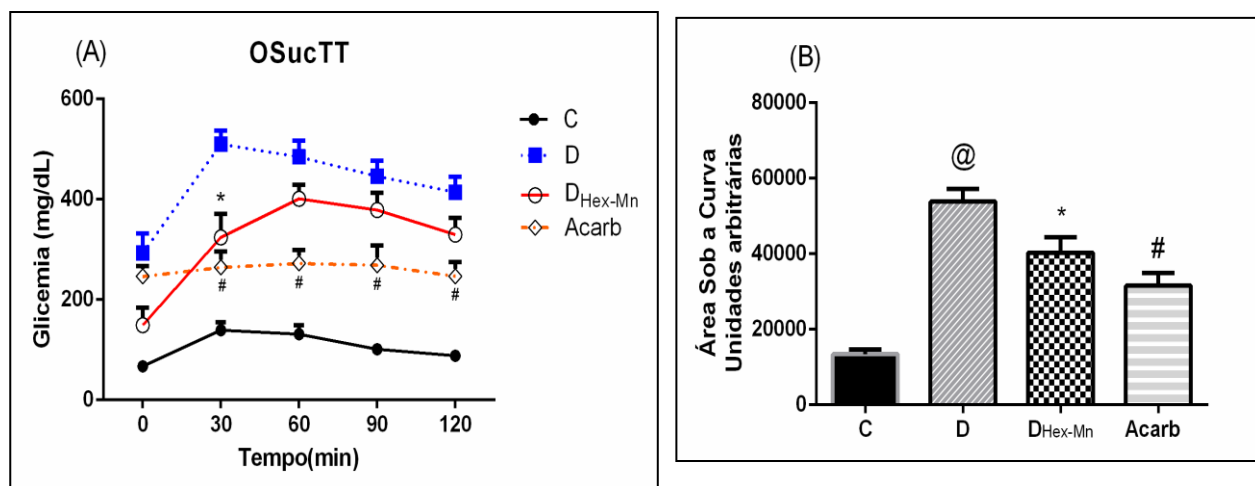
No teste de tolerância oral à sacarose, a fração Hex-Mn reduziu a AUC em relação ao grupo D (~25%). Além disso, o tratamento reduziu a curva glicêmica nos 30 minutos iniciais do teste (figura 9). A elevação da glicemia após a sobrecarga de sacarose no grupo D em relação ao grupo C (D:518,4 $\pm$ 21,8 vs C:139,3 $\pm$ 15,4 mg/dL), aumento de 372%, foi atenuada após 21 dias de tratamento no grupo D_{Hex-Mn}, sendo o maior valor de glicemia observada no grupo D reduzida no grupo D_{Hex-Mn} (D:518,4 $\pm$ 21,8 vs D_{Hex-Mn}:324,0 $\pm$ 46,7 mg/dL), em torno de 37,5% (p<0,05).

Figura 8 - Efeito da fração Hex-Mn no OGTT em experimento subcrônico após 21 dias de tratamento. Utilizado o Anova Two way para determinação de diferença nos diferentes pontos da curva (A) e Anova One way para o teste da área sob a curva (AUC) (B). Os dados são expressos como média $\pm$ EP, (n = 4 a 7). @ p<0,05 D vs. C; * p<0,05 D_{Hex-Mn} vs. D, # p<0,05 Flor vs D. (Flor = Floridzin)



Fonte: SILVA, D. H. A., 2018.

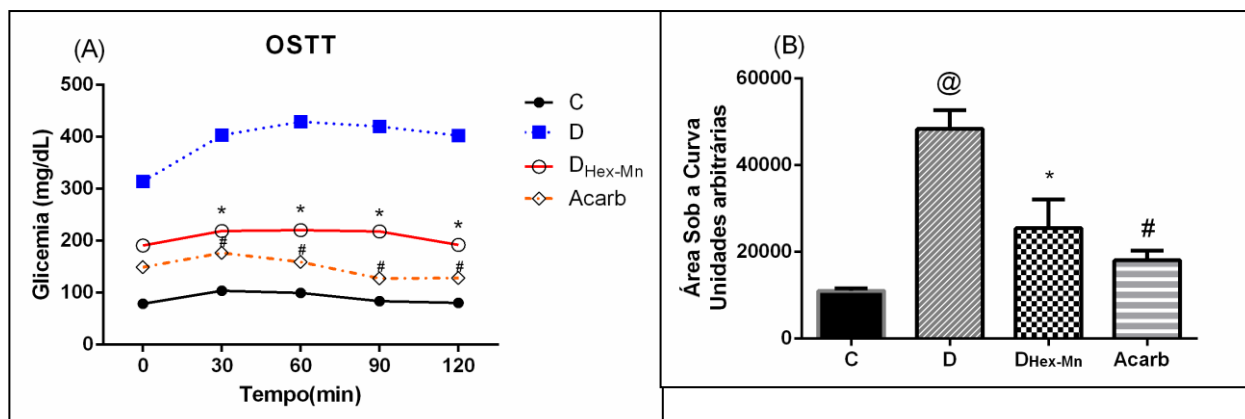
Figura 9 - Efeito da fração Hex-Mn no OSucTT em experimento subcrônico após 21 dias de tratamento. Utilizado o Anova Two way para determinação de diferença nos diferentes pontos da curva (A) e Anova One way para o teste da área sob a curva (AUC) (B). Os dados são expressos como média $\pm$ EP, (n = 4 a 7). @ p<0,05 D vs. C; * p<0,05 D_{Hex-Mn} vs. D, # p<0,05 Acarb vs D.



Fonte: SILVA, D. H. A., 2018.

No teste de tolerância oral ao amido, a fração Hex-Mn reduziu a AUC do grupo diabético tratado (~50%). Destaca-se que o tratamento reduziu o pico glicêmico impedindo o aumento na glicemia dos 30 minutos até o final do tempo avaliado (figura10), e apresentou um efeito semelhante ao grupo Acarb.

Figura 10 - Efeito da fração Hex-Mn no OSTT em experimento subcrônico após 21 dias de tratamento. Utilizado o Anova Two way para determinação de diferença nos diferentes pontos da curva (A) e Anova One way para o teste da área sob a curva (AUC) (B). Os dados são expressos como média $\pm$ EP, (n = 4 a 7). @ p<0,05 D vs. C; * p<0,05 D_{Hex-Mn} vs. D, # p<0,05 Acarb vs D. (Acarb = Acarbose)

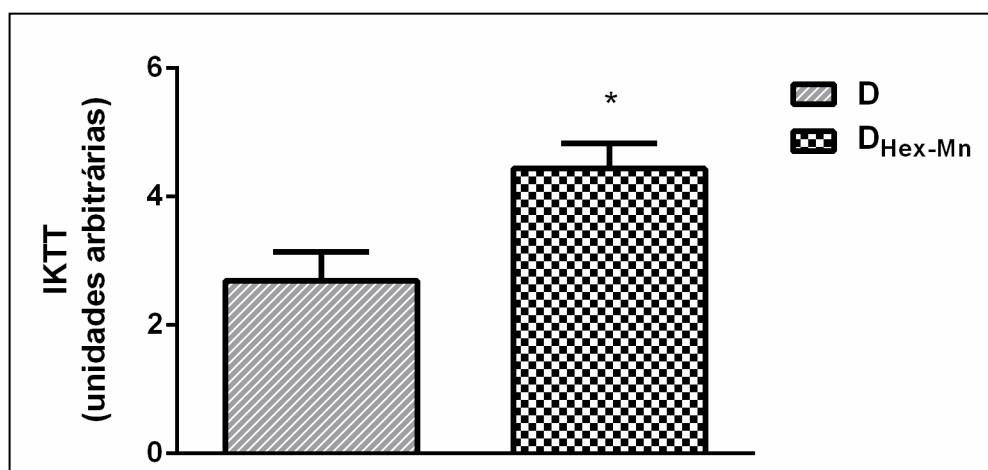


Fonte: SILVA, D. H. A., 2018.

6.4 Efeito sobre a sensibilidade à insulina

Considerando os efeitos da fração Hex-Mn sobre o DM, avaliou-se a constante de depuração de glicose no teste de tolerância à insulina (figura 12), que foi elevada em 65% nestes animais.

Figura 11 - Efeito da fração Hex-Mn no teste de tolerância à insulina (ITT) em experimento subcrônico durante 21 dias de tratamento. Os dados são expressos como média $\pm$ EP, n = 5. (*) para diferença D_{Hex-Mn} vs D.



Fonte: SILVA, D. H. A., 2018.

6.5 Efeito sobre o perfil antioxidante

Tabela 4 - Efeitos do tratamento com a fração Hex-Mn no estresse oxidativo em coração de ratos diabéticos (D), diabéticos tratados com a fração Hex-Mn (D_{Hex-Mn}) e animais controle (C) em experimento subcrônico durante 21 dias de tratamento

	C	D	D _{Hex-Mn}
CORAÇÃO			
GSH(nmol/mg ptn)	13,1±0,6	9,3±0,7 [@]	10,0±0,7
GSSG (nmol/mg ptn)	5,9±0,1	10,6±1,0 [@]	11,4±1,7
GSH/GSSG (nmol/mg ptn)	2,3±0,1	1,0±0,1 [@]	0,9±0,1
TBARS(U/mg ptn)	10,4±0,7	14,6±0,8 [@]	7,8±1,0*
Nitrito(μM/mg ptn)	1,6±0,1	2,8±0,4 [@]	1,5±0,2*
SOD (U/mg ptn)	11,7±1,2	5,9±0,5 [@]	10,2±0,6*
CAT (U/mg ptn)	0,046±0,007	0,052±0,008	0,044±0,011

Os dados foram expressos como média ± EP, (n = 4 a 7). [@] p<0,05 D vs. C; * p<0,05 D_{Hex-Mn} vs. D
 Fonte: SILVA, D. H. A., 2018.

O DM induzido por STZ causou, no tecido cardíaco, um aumento nos níveis de peroxidação lipídica (40%) e nitrito (40%), reduziu dos níveis de GSH (~30%) e aumento de GSSG (~80%), com menor relação GSH/GSSG (~60%). Além disso o DM reduziu a atividade da SOD (~50%), sem alterações na atividade da catalase. No grupo D_{Hex-Mn} houve redução dos níveis de MDA e nitrito (~50%), além do reestabelecimento da atividade da SOD a valores próximos do controle.

7 DISCUSSÃO

As alterações endócrino-metabólicas são uma crescente preocupação tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (KAUR *et al.*,2016). Dentre elas, o Diabetes *mellitus* (DM) um distúrbio metabólico que afeta a homeostase da glicose, lipídios e proteínas, tornou-se uma das maiores emergências médicas no século XXI. Diante das limitações comportamentais e farmacológicas no tratamento do DM, associados aos elevados custos médico-hospitalares diretos e indiretos, para prevenção e tratamento do DM e suas comorbidades, os esforços no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas são essenciais no controle desta doença (CEFALU, 2004; UZOR *et al.*,2017).

Em todo o mundo, o uso de plantas medicinais como alternativa no tratamento do DM e suas comorbidades é bem aceito, assim como a sua eficácia tem sido relatada na literatura científica (EDDOUKS *et al.*,2014; AGWAYA *et al.*,2016). Algumas vantagens são listadas em relação ao uso de fármacos industriais e tratamentos convencionais, sobretudo redução dos efeitos colaterais, como as alterações gastrointestinais, formação de anticorpos e hipoglicemia (PANIGRAHI *et al.*, 2016; MING *et al.*,2018). Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram o efeito antidiabético, hipolipidêmico e antioxidante do extrato etanólico bruto das folhas de *M. nigra* (JUNIOR *et al.*,2017), o que motivou o fracionamento do extrato bruto como alternativa para se conhecer os fitoquímicos envolvidos na resposta anti-hiperglicemiante.

Diferentes modelos experimentais de DM são descritos na literatura, tais como modelos cirúrgicos, genéticos, nutricionais e farmacológicos (BRITO-CASILLAS *et al.*,2016; MOSTAFAVINIA *et al.*,2016). Das estratégias farmacológicas mais utilizadas, a aloxana (ALX) e a estreptozotocina (STZ) são as mais utilizadas e podem produzir modelos de DM tipo I e II, a depender da dose utilizada, repetições de dose e via de administração (JAWERBAUM; WHITE, 2010). STZ, um antibiótico alquilante produzido pelo *Streptomyces achromogenes* foi inicialmente proposto para o tratamento contra o câncer (WHITE, 1963). Entretanto, o uso intravascular e intraperitoneal em ratos e cães provocava hiperglicemia sustentada acompanhada de poliúria e polidipsia, sinais compatíveis com DM. Posteriormente, o mecanismo geral de ação da STZ foi descrito, o qual envolve, principalmente, a alquilação do DNA e sua consequentemente fragmentação (LENZEN, 2008). Há outras vias menos importantes, como a geração de espécies reativas de oxigênio

(ROS) e nitrogênio (NOS). Neste trabalho, utilizamos o modelo de DM experimental induzido por STZ, bem caracterizado com glicemia pós-prandial acima de 300mg/dL (Figura 5) e os sinais clássicos do DM (Tabela 1).

Trabalhos anteriores demonstraram o efeito antidiabético e antioxidante do extrato bruto das folhas de *M. nigra* (VOLPATO *et al.*,2011; ARAUJO *et al.*,2015; JUNIOR *et al.*,2017), entretanto, ainda não é conhecida a ação das frações Hex-Mn e Clo-Mn deste extrato. Neste sentido, o tratamento com a fração Hex-Mn apresentou efeito antidiabético mais convincente, quando comparado à fração Clo-Mn, uma vez que reduziu a glicemia pós-prandial e de jejum, poliúria, polidipsia, assim como a hipertrigliceridemia e o perfil antioxidante, além de melhorar o ganho ponderal. A partir dos efeitos conhecidos do extrato bruto das folhas de *M. nigra*, o fracionamento é importante para o conhecimento das classes de fitoquímicos associados ao efeito farmacológico de interesse. De modo muito interessante, a fração Clo-Mn impediu o agravamento da hiperglicemia, assim como produziu melhoras sobre o perfil lipídico e hepático em ratos diabéticos, o que pode estar associado a diferença entre a constituição química das diferentes frações.

A fração Hex-Mn é rica em flavonoides, sendo descritos o canferol-3-ramnosídeo e a isoquercetina em análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD). A fração Clo-Mn apresenta flavonoides, mas ainda não descritos (Souza *et al.*,2013). Dentre os flavonoides descritos, a isoquercetina regula positivamente os níveis séricos de glicose e lipídeos, além de melhorar a função das ilhotas pancreáticas (ZHANG *et al.*,2011). Estudos avaliando folhas de *M. nigra* detectaram compostos flavonoides nos diversos tipos estudados, a rutina, isoquercetina e astragalina (kaempferol 3-b-D-glucopiranosido) tinham as maiores concentrações (THABTI *et al.*,2012; FLACZYK *et al.*,2013), apresentando efeitos anti-hiperglicêmicos, anti-hiperlipidêmicos, antioxidantes e cardioprotetores (THAIPITAKWONG *et al.*,2018).

A diminuição da hiperglicemia nos animais tratados com a fração hexânica sugere: (a) inibição da produção hepática de glicose; (b) sensibilização de tecidos periféricos à insulina e (c) redução da digestão e absorção de carboidratos pelo trato gastrointestinal (TGI). O grupo D_{Hex-Mn} apresentou menor concentração plasmática e urinária de ureia, glicerol, sugerindo menor disponibilidade de substratos não glicídicos para produção hepática de glicose através da neoglicogênese (PUHAKAINEN *et al.*,1992; OLIVEIRA *et al.*,2008). Corroborando esta ideia, outros autores têm relatado a ação *in vivo* de plantas como a *Combretum lanceolatum* e

Caparris spinosa ou de flavonoides isolados como a rutina, fitoquímico bastante presente em diferentes espécies vegetais, sob a gliconeogênese hepática como possível mecanismo para o efeito anti-hiperglicemiante (SIQUEIRA *et al.*,2016; JALALI *et al.* 2016; GHORBANI, 2017).

O conteúdo de glicogênio hepático depende de um fino controle hormonal que envolve a ação de diferentes hormônios anabólicos e catabólicos, dentre eles, insulina, cortisol e glucagon (BRADY, 2010). É bem conhecido que a insulina, através da ativação do receptor de membrana e ativação da via clássica da fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3K) e Akt estimula a glicogeniogênese e inibe a glicogenólise (COHEN, 1998; BRADY, 2010). É bem descrito que reduções no conteúdo de glicogênio hepático no DM refletem a ausência e/ou resistência à insulina (CHACKREWARTHY *et al.*,2010; GUTIERREZ *et al.*,2011). O grupo D_{Hex-Mn} preservou glicogênio, o que demonstra maior secreção e/ou sensibilidade à insulina nestes animais. Embora, os níveis séricos de insulina não tenham sido mensurados neste trabalho, o teste de tolerância à insulina (ITT) confirmou a hipótese de melhor sensibilidade no grupo tratado com a fração Hex-Mn. O cálculo da constante de depuração de glicose (IkTT) é considerado um método reprodutível, válido e bem estabelecido para a avaliação da sensibilidade à insulina em animais (ANTUNES *et al.*,2016), o que permite concluir que, independente dos níveis deste hormônio, o grupo D_{Hex-Mn} melhorou a sensibilidade periférica à insulina (figura 11), o que torna esta fração promissora para produção de futuros fitoterápicos que possam ser adjuvantes no tratamento do DM e suas comorbidades.

Neste sentido, foram observadas ações anabólicas clássicas da insulina nos grupo D_{Hex-Mn}, isto é, o aumento do ganho de peso e redução da perda de massa muscular e tecido adiposo, são indicativos de inibição de processos catabólicos próprios do DM como a lipólise e proteólise (ARCARO *et al.*,2014; SIQUEIRA *et al.*,2016). Não se pode excluir por completo que o tratamento com a fração Hex-Mn tenha melhorado os níveis insulinêmicos, uma vez que estudo recente demonstrou que o tratamento com as folhas de *Morus nigra* melhorou a insulinemia em animais diabéticos (ARAÚJO *et al.*,2015).

Outro importante mecanismo que contribui para hiperglicemia no DM é a digestão e absorção intestinal de carboidratos, sendo hiperglicemia pós-prandial um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares (GERICH, 2003). A digestão de carboidratos complexos da dieta (amido, glicogênio) em monossacarídeos (glicose, frutose e galactose) absorvíveis depende de enzimas presentes na saliva como a α -amilase e também na luz

intestinal como a α -amilase pancreática e as dissacaridasas expressas na borda em escova dos enterócitos. (ASANO *et al.*, 2000; YUSOFF *et al.*, 2015). Diferentes estudos *in vitro* avaliaram potenciais inibidores da α -glicosidase a partir de componentes dietéticos e plantas (ANIS *et al.*, 2002; APOSTOLIDIS *et al.*, 2006; PULLELA *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2017). O gênero *Morus* apresenta alcaloides com atividade inibitória sobre a α -glicosidase, especialmente a desoxinojirimicina (DNJ) (ASANO, 2003). Nossos resultados nos testes de tolerância à sucrose e ao amido sugerem uma ação inibitória da fração Hex-Mn na digestão de carboidratos complexos no intestino (Figuras 9 e 10). Neste mesmo sentido, já foi demonstrado que outras espécies deste mesmo gênero, como a *M. alba* tem potente atividade inibitória sobre as α -glicosidasas e baixa ação sobre as amilases (KIM *et al.*, 2011). A atividade inibitória da fração Hex-Mn sobre a α -glicosidase foi semelhante à inibição pela acarbose, o que confirma a hipótese de que o efeito anti-hiperglicemiante da *M. nigra* é, pelo menos em parte, pelo retardo na digestão de carboidratos complexos.

Já foi demonstrado no DM induzido por STZ que na administração de dissacarídeos a redução na curva glicêmica se dá principalmente por inibição intestinal de α -glicosidasas (ANDRADE-CETTO *et al.*, 2008; SUBRAMANIAN *et al.*, 2008; YUSOFF *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017). Assim, podemos assumir que os efeitos de redução da curva glicêmica nos testes com dissacarídeos e polissacarídeos ocorreram por menor absorção intestinal de glicose, devido a inibição da ação de enzimas digestivas, mecanismo que pode explicar parte do controle glicêmico em animais $D_{\text{Hex-Mn}}$.

Classicamente, a absorção de monossacarídeos é um processo de transporte ativo secundário e depende do cotransportador Na^+ -glicose isoforma 1 (SGLT1) expresso na membrana apical (MA) do enterócito. A difusão de glicose do enterócito para a circulação porta-hepática depende do transportador de glicose isoforma 2 (GLUT2) presente na membrana basolateral (MBL) do enterócito (KELLETT *et al.*, 2008). Entretanto, é bem conhecido que a insulina influencia o processo de transporte de glicose através do SGLT1, assim como a expressão dos GLUT2 na MBL do enterócito (PENNINGTON *et al.*, 1994). É bem documentado na literatura o aumento na expressão intestinal do SGLT-1 e GLUT2 no epitélio intestinal em ratos diabéticos (FEDORAK *et al.*, 1991; MIYAMOTO *et al.*, 1991; BURANT *et al.*, 1994; DYER *et al.*, 1997), o que contribui para o aumento da hiperglicemia pós-prandial. Mais recentemente foi demonstrado a hiperexpressão do GLUT2 na membrana apical do enterócito como mecanismos para aumentar a hiperglicemia pos-prandial (TOBIN *et al.*, 2008). Nossos resultados mostram que o tratamento com a fração Hex-Mn reduz

absorção intestinal de glicose, o que sugere que esta fração pode inibir o transportador SGLT1, reduzir a expressão de GLUT2 na MA ou ambos os mecanismos.

O DM induzido pela STZ usualmente está associado ao aumento do colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), LDL e VLDL, bem como redução dos níveis de HDL (MAHENDRAN *et al.*, 2014). A dislipidemia diabética se caracteriza por HDL reduzido e níveis elevados de TG, CT e LDL, além disso, a hipertrigliceridemia e a hipercolesterolemia são importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares, uma das comorbidades diabéticas mais prevalentes (ANANTHAN *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2014), sendo comum alguma forma de anormalidade lipídica em indivíduos com diabetes e essa alteração nos lipídios e lipoproteínas é influenciada pela hiperinsulinemia e resistência à insulina (NELSON *et al.*, 2018). Ambas as frações avaliadas apresentaram ação hipolipemiante, o que sugere diretamente pela melhora na ação da insulina. Outros mecanismos envolvidos na correção do perfil dislipidêmico como menor atividade das enzimas envolvidas na síntese do colesterol e ácidos graxos não podem ser excluídos e podem estar associados ao efeito hipolipemiante da *M. nigra*. Neste sentido, o uso do extrato de *Cedrela odorata* L. e *Curcuma longa* L. reduziu os níveis de TG, sem alterações nos níveis de CT e HDL, o que foi associado à inibição da enzima ácido graxo sintase, reduzindo consequentemente a síntese de ácidos graxos, atenuando a hipertrigliceridemia (ARCARO *et al.*, 2014; GIORDANI *et al.*, 2015).

O fígado é um órgão complexo e participa do controle do metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos, assim como é essencial nos processos de detoxificação e excreção de metabólitos (ILAVENIL *et al.*, 2016). É bem conhecida a disfunção hepática induzida pelo DM, o que foi observado neste trabalho pelo aumento dos níveis séricos de AST, ALT e ALP (tabela 3). O tratamento com ambas as frações, Hex-Mn e Clo-Mn, reduziu os níveis séricos dos marcadores de lesão hepática, sugerindo o efeito hepatoprotetor da *Morus nigra*.

No DM, a hiperglicemia crônica reduz as defesas antioxidantes, gera ambiente pró-oxidante, o que modifica o estado redox determinando o aumento do estresse oxidativo e a glicosilação não enzimática de proteínas (TEKIN *et al.*, 2011; ZARGAR *et al.*, 2014). O malondialdeído (MDA), a GSH (principal antioxidante não-enzimático endógeno), a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são marcadores do estresse oxidativo envolvidos na progressão do DM e suas comorbidades. Nestes estudos o perfil pró-oxidante foi observado pelo aumento dos níveis de peroxidação lipídica (LPO, níveis de MDA), redução da atividade da SOD e menor relação GSH/GSSG no coração de ratos diabéticos. A

redução da insulinemia aumenta a atividade da enzima ácido graxo CO oxidase que inicia a oxidação de ácidos graxos aumentando a produção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que por sua vez inativa a SOD (KAKKAR *et al.*, 1995). O tratamento com a fração Hex-Mn reduziu os níveis de MDA e nitrito no coração de ratos diabéticos, com tendência à preservação dos níveis de GSH e aumento na atividade da SOD, o que indica uma ação antioxidante desta fração. Outros trabalhos já mostraram o efeito antioxidante do extrato bruto de *M. nigra* (ARAÚJO *et al.*, 2015; JUNIOR *et al.*, 2017), mas este efeito na fração Hex-Mn é inédito. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o efeito antioxidante da fração Hex-Mn pode explicar, pelo menos em parte, o efeito antidiabético e hepatoprotetor da *M. nigra*, o que reitera a importância desta espécie como adjuvante no controle glicêmico em longo prazo.

Atualmente, um dos mecanismos envolvidos na melhora da hiperglicemia no DM, independente da ação da insulina, é maior a perda de glicose pelos rins (MARTENS *et al.*, 2017). É bem conhecido que o cotransportador sódio-glicose isoforma 2 (SGLT2) no segmento inicial (S1) do túbulo contorcido proximal do néfron é responsável por grande parte da reabsorção da glicose filtrada (Al-Jobori *et al.*, 2017). Os indivíduos diabéticos apresentam maiores concentrações de glicose filtrada pelos rins, o que causa maior diurese osmótica, poliúria e glicosúria, mecanismo que visa a redução da glicemia (FERRANNINI; SOLINI, 2012). Esta é a razão pela qual diferentes inibidores do SGLT2 têm sido utilizados clinicamente para controle da hiperglicemia em pacientes diabéticos (AL-JOBORI *et al.*, 2017; MARTENS *et al.*, 2017). Nossos resultados são contrários a este mecanismo, sobretudo porque houve menor poliúria, polipdsia e glicosúria no grupo D_{Hex-Mn}, o que sugere que a menor excreção urinária de glicose é decorrente da menor hiperglicemia por mecanismos que dependem, pelo menos em parte, da ação insulínica no metabolismo glicídico.

8 CONCLUSÕES

As frações Hex-Mn e Clo-Mn tem ação antihiperglicemiante e hipolipemiante, tendo a fração Hex-Mn melhor efeito sobre o controle glicêmico, em parte por melhorar a sensibilidade a insulina, mas também por inibir a digestão e absorção intestinal de carboidratos, o que contribui para redução da hiperglicemia. Além disso, a fração Hex-Mn possui efeito antioxidante e cardioprotetor, o que torna esta fração promissora no tratamento adjuvante do DM e suas comorbidades.

REFERÊNCIAS

- AGWAYA, M. S.; VUZI, P. C.; NANDUTU, A. M. Hypoglycemic Activity of Aqueous Root Bark Extract *Zanthoxylum chalybeum* in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **J Diabetes Res**, [s.l.], v. 2016, p. 8727590, 2016.
- AKTER, K. *et al.* Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment? **Br J Clin Pharmacol**, Oxford, v. 71, n. 3, p. 365-76, Mar. 2011.
- AL-JOBORI, H. *et al.* Empagliflozin and Kinetics of Renal Glucose Transport in Healthy Individuals and Individuals With Type 2 Diabetes. **Diabetes**, Alexandria-VA, v. 66, n. 7, p. 1999-2006, Jul. 2017.
- ALBUQUERQUE U.P.; ANDRADE L.H.C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 16, p. 273-285, 2002.
- ALBUQUERQUE U.P.; ANDRADE L.H.C. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciencia**, Caracas, v. 7, p. 336-345, 2002.
- ALBUQUERQUE U.P. *et al.*, Medicinal plants of the Caatinga(semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **J. Ethnopharmacol**, Limerick, n. 114, p. 325-354, 2007.
- ALBUQUERQUE U.P.; RAMOS M.A.; MELO J.G. New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies. **J Ethnopharmacol**, Limerick, n.140, p. 197-201, 2012.
- ARAÚJO T.A.S., *et al.*, A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **J Ethnopharmacol**, Limerick,, n. 120, p. 72-80, 2008.
- ALI H, HOUGHTON P.J.; SOUMYANATH A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **J Ethnopharmacol**, Limerick, n. 107, p. 449–455, 2006.
- ALMEIDA C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE U.P. Uso e conservação ao de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. **Interciencia**, Caracas, n. 26, p. 276-285, 2002.
- ALMEIDA C.F.C.B.R. *et al.*, Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northesat Brazil). **J Arid Enviromnm**, London, n. 62, p. 127-142, 2005.
- ALMEIDA E.R. *et al.*, Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. **Fitoterapia**, Milano, n. 77, p. 276-278, 2006.

ARTS I.C.; HOLLMAN P.C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, n. 81, p. 317-325, 2005.

ANANTHAN, R. *et al.*, Effect of *Gymnema montanum* leaves on serum and tissue lipids in alloxan diabetic rats. **Exp Diabetes Res**, Philadelphia, v. 4, n. 3, p. 183-9, Jul/Sep. 2003.

ANIS, E. *et al.*, Alpha-glucosidase inhibitory constituents from *Cuscuta reflexa*. **Chem Pharm Bull**, Tokyo, v. 50, n. 1, p. 112-4, Jan. 2002.

ANTUNES, L. C. *et al.*, Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. **Arch Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 138-42, Apr. 2016.

APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y. I.; SHETTY, K. Potential of cranberry-based herbal synergies for diabetes and hypertension management. **Asia Pac J Clin Nutr**, Melbourne, v. 15, n. 3, p. 433-41, 2006.

ARAUJO, C. M. *et al.* *Morus nigra* leaf extract improves glycemic response and redox profile in the liver of diabetic rats. **Food Funct**, Cambridge, v. 6, n. 11, p. 3490-9, Nov. 2015.

ARCARO, C. A. *et al.* Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. **PLOS One**, San Francisco, v. 9, n. 12, p. 113993, 2014.

ASANO, N. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. **Glycobiology**, Oxford, v. 13, n. 10, p. 93-104, Oct. 2003.

BABU PV, LIU D, GILBERT ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. **J Nutr Biochem**, New York, v. 24, n. 11, p. 1777-89, 2013.

BACHA, F.; KLINEPETER BARTZ, S. Insulin resistance, role of metformin and other non-insulin therapies in pediatric type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**, Copenhagen, v. 17, n. 8, p. 545-558, Dec. 2016.

BIESSELS, G. J. *et al.* Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. **Lancet Neurol**, London, UK, v. 5, n. 1, p. 64-74, Jan. 2006.

BAHADORAN Z.; MIRMIRAN P.; AZIZI F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **J Diabetes Metab Disord**, Bartlesville, n.12, p. 1-9, 2013.

BAKIREL T. *et al.* In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. **J Ethnopharmacol**, Limerick, n.116, p. 64-73, 2008.

BONORA E. *et al.* Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, n.68, p.374-8, 1989.

BRADY M, J. Allosteric Trumps Covalent in the Control of Glycogen Synthesis. **Cell Metabolism**, Cambridge, 12, 3 Nov., 2010.

BRITO-CASILLAS, Y.; MELIAN, C.; WAGNER, A. M. Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models. **Endocrinol Nutr**, Barcelona v. 63, n. 7, p. 345-53, Aug-Sep. 2016.

BURANT, C. F. *et al.* Small intestine hexose transport in experimental diabetes. Increased transporter mRNA and protein expression in enterocytes. **J Clin Invest**, New Haven, v. 93, n. 2, p. 578-85, Feb. 1994.

CANALES M. *et al.*, Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. **J Ethnopharmacol**, Limerick, 97, 429–439, 2005.

CARROL, N.V.; LONGLEY, R.W.; ROE, J.H. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 220, n. 2, p. 583-93, 1956.

CAZAROLLI L.H. *et al.*, Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. **Mini Rev Med Chem**, Hilversum, n. 8, p. 1032–1038, 2008.

CEFALU, W. Economics of diabetes-cost impact of not treating diabetes early and intensively. **Clin Cornerstone**, Belle Mead, v. 6, n. 2, p. 51-60, 2004.

CHACKREWARTHY, S. *et al.* Evaluation of the hypoglycemic and hypolipidemic effects of an ethylacetate fraction of *Artocarpus heterophyllus* (jak) leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacogn Mag**, Mumbai, v. 6, n. 23, p. 186-90, Jul. 2010.

CHAN E.W.; LYE P.Y.; WONG S.K. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. **Chin J Nat Med**, Beijing, n. 14, p. 17–30, 2016.

CROWTHER, C. A. *et al.*, Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. **N Engl J Med**, Boston, v. 352, n. 24, p. 2477-86, Jun 16 2005.

COHEN, P. Identification of a protein kinase cascade of major importance in insulin signal transduction. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. London, n. 354, p. 485–495. 1998.

COHEN A.; HORTON E.S. Progress in the treatment of type 2 diabetes: new pharmacologic approaches to improve glycemic control. **Curr Med Res Opin**. London, n. 23, p. 905-917, 2007.

DE LA MONTE S.M. “Type 3 diabetes is sporadic Alzheimer’s disease: mini-review,” **European Neuropsychopharmacology**, Amsterdam, v. 24, n. 12, p. 1954–1960, 2014.

DENG Y.X. *et al.*, Polysaccharide from *Gynura divaricata* modulates the activities of intestinal disaccharidases in streptozotocin-induced diabetic rats. **Br J Nutr**, Cambridge, n. 106, p. 1323-1329, 2011.

DEROSA G, SIBILLA S. Optimizing combination treatment in the management of type 2 diabetes. **Vasc Health Risk Manag**, Cambridge, n. 3, p. 665-671, 2007.

OLIVEIRA, S. V. (org.). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)**. São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

DUCKWORTH, W. *et al.* Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. **N Engl J Med**, Boston, v. 360, n. 2, p. 129-39, 8 Jan. 2009.

DYER, J. *et al.* Changes in the levels of intestinal Na⁺/glucose co-transporter (SGLT1) in experimental diabetes. **Biochem Soc Trans**, London, v. 25, n. 3, p. 479S, Aug. 1997.

EDDOUKS, M. *et al.* Antidiabetic plants improving insulin sensitivity. **J Pharm Pharmacol**, Los Angel, v. 66, n. 9, p. 1197-214, Sep. 2014.

ELSNER, M. *et al.* Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia**, Berlin, v. 43, n. 12, p. 1528-33, Dec. 2000.

ERCISLI, S; ORHAN E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*M. nigra*) mulberry fruits. **Food Chem** [s.l.], n. 103, v. 4, p. 1380–1384, 2007.

EVANS R.M.; BARISH G.D.; WANG Y.X. PPARs and the complex journey to obesity. **Nature Medicine**, New York, v. 10, p. 355–361, 2004.

FLACZYK E. *et al.* Chemical characterization and antioxidative properties of Polish variety of *Morus alba* L. leaf aqueous extracts from the laboratory and pilot-scale processes. **Agric Sci**. [s.l.], n. 4, p. 141–147, 2013.

FÖRSTERMANN U, SESSA W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, London, n. 33, p. 829–837, 2012.

HANHINEVA K. *et al.* Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **Int J Mol Sci**, Basel, n. 11, p. 1365-1402, 2010.

FEDORAK, R. N. *et al.* Altered glucose carrier expression: mechanism of intestinal adaptation during streptozocin-induced diabetes in rats. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 261, n. 4 Pt 1, p. G585-91, Oct. 1991.

FERRANNINI, E.; SOLINI, A. SGLT2 inhibition in diabetes mellitus: rationale and clinical prospects. **Nat Rev Endocrinol**, London, v. 8, n. 8, p. 495-502, 2012.

GAO, H. X.; REGIER, E. E.; CLOSE, K. L. International Diabetes Federation World Diabetes Congress 2015. **J Diabetes**, Richmond, v. 8, n. 3, p. 300-2, Mayo 2016.

GERICH, J. E. Clinical significance, pathogenesis, and management of postprandial hyperglycemia. **Arch Intern Med**, Chicago, v. 163, n. 11, p. 1306-16, Jun. 2003.

GIORDANI, M. A. *et al.* Hydroethanolic extract of the inner stem bark of *Cedrela odorata* has low toxicity and reduces hyperglycemia induced by an overload of sucrose and glucose. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v. 162, p. 352-61, Mar. 2015.

GHOLAMHOSEINIAN, A; FALLAH, H; SHARIFI FAR, F. Inhibitory effect of methanol extract of *Rosa damascene*. Mill flowers on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia in normal and diabetic rats. **Phytomedicine**, Stuttgart, n. 16, p. 935-941, 2009.

GRAF B.L. *et al.* Plant-derived therapeutics for the treatment of metabolic syndrome. **Curr Opin Investig Drugs**, London, n. 11, p. 1107–1115, 2010.

GRAVEL, S. *et al.* Evaluating the impact of type 2 diabetes mellitus on CYP450 metabolic activities: protocol for a case-control pharmacokinetic study. **BMJ Open**, London, v. 8, n. 2, p. e020922, Feb. 2018.

GUPTA S, *et al.* Analysis of nutrient and antinutrient content of underutilized green leafy vegetables. **Food Sci Technol**, [s.l.] n. 38, p. 339–345, 2005.

GUTIERREZ, R. M.; GOMEZ, Y. G.; GUZMAN, M. D. Attenuation of nonenzymatic glycation, hyperglycemia, and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats by chloroform leaf extract of *Azadirachta indica*. **Pharmacogn Mag**, Mumbai, v. 7, n. 27, p. 254-9, July 2011.

HAAN, M. N. Therapy Insight: type 2 diabetes mellitus and the risk of late-onset Alzheimer's disease. **Nat Clin Pract Neurol**, London, v. 2, n. 3, p. 159-66, Mar. 2006.

HALL, H. M.; BANERJEE, S.; MCGUIRE, D. K. Variability of clopidogrel response in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diab Vasc Dis Res**, London, v. 8, n. 4, p. 245-53, Oct. 2011.

HANDELSMAN, Y. *et al.* American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology - clinical practice guidelines for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan - 2015. **Endocr Pract**, Jacksonville, v. 21 Suppl 1, p. 1-87, Apr. 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes Atlas**. 7. ed. Brussels, IDF, 2015. Disponível em: <<https://www.idf.org/>>. Acesso em: 14 jul. 2017.

ILAVENIL, S. *et al.* Acetaminophen Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats--A Proteomic Approach. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 21, n. 2, p. 161, 28 Jan. 2016.

JAWERBAUM, A.; WHITE, V. Animal models in diabetes and pregnancy. **Endocr Rev**, Chevy Chase, v. 31, n. 5, p. 680-701, Oct. 2010.

JUNIOR, I. *et al.* Brazilian *Morus nigra* Attenuated Hyperglycemia, Dyslipidemia, and Prooxidant Status in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **ScientificWorldJournal**, New York, v. 2017, p. 5275813, 2017.

KAKKAR, R. *et al.* Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. **Mol Cell Biochem**, New York, v. 151, n. 2, p. 113-9, Oct. 1995.

KALOK, A. *et al.* Screening for gestational diabetes in low-risk women: effect of maternal age. **Horm Mol Biol Clin Investig**, Berlin, Feb. 2018.

KANZARKAR, M. *et al.* Oral insulin-delivery system for diabetes mellitus. **Pharm Pat Anal**, London, v. 4, n. 1, p. 29-36, Jan 2015.

KAUR, G.; INVALLY, M.; CHINTAMANENI, M. Influence of piperine and quercetin on antidiabetic potential of curcumin. **J Complement Integr Med**, Berlin, v. 13, n. 3, p. 247-255, Sep. 2016.

KIMURA, Y. *et al.* Effects of phenolic constituents from the mulberry tree on arachidonate metabolism in rat platelets. **J. Nat. Prod**, Cincinnati, n. 49, p. 639–644, 1986.

KWON, O. *et al.* Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. **FASEB J**. Bethesda, n. 21, p. 366–377, 2007.

LANDON, M. B. *et al.* A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. **N Engl J Med**, Boston, v. 361, n. 14, p. 1339-48, 1 Oct. 2009.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, Berlin Springer Verlag, v. 51, n. 2, p. 216-26, Feb. 2008.

LIMA, L.C.L. *et al.* Perfil sócio-econômico-cultural dos comerciantes de plantas medicinais de Campina Grande, Paraíba. **Infarma**, [s.l.], n. 22, p. 38-41, 2010.

LIMA, C.M. *et al.* Bioassay-guided evaluation of *Dioscorea villosa* – an acute and subchronic toxicity, antinociceptive and anti-inflammatory approach. **BMC Complement Altern Med**, London, n. 13, p. 195, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **J Biochem Mol Toxicol**, New York, n. 17, p.24-38, 2003.

MCCARTHY, A. D.; ETCHEVERRY, S. B.; CORTIZO, A. M. Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: Role in osteoblast development. **Acta Diabetol**, Berlin, n. 38, p. 113–122, 2001.

MCLENNAN S.V. *et al.* Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. **Diabetes**, Alexandria VA, n. 40, p. 344–348, 1991.

MAHENDRAN, G. *et al.* RETRACTED: Anti-diabetic activity of *Swertia corymbosa* (Griseb.) Wight ex C.B. Clarke aerial parts extract in streptozotocin induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v. 151, n. 3, p. 1175-1183, 12 Feb. 2014.

MARTENS, P.; MATHIEU, C.; VERBRUGGE, F. H. Promise of SGLT2 Inhibitors in Heart Failure: Diabetes and Beyond. **Curr Treat Options Cardiovasc Med**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 23, Mar. 2017.

MING, J. *et al.*, Effectiveness and safety of bifidobacteria and berberine in people with hyperglycemia: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, London, v. 19, n. 1, p. 72, 26 Jan. 2018.

MISHRA, A.; SETH, A.; MAURYA, S. K. Therapeutic significance and pharmacological activities of antidiarrheal medicinal plants mention in Ayurveda: A review. **J Intercult Ethnopharmacol**, Wilmington, v. 5, n. 3, p. 290-307, Jun/Aug. 2016.

MITTAL, K.; KATARE, D. P. Shared links between type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease: A review. **Diabetes Metab Syndr**, Amsterdam, v. 10, n. 2 Suppl 1, p. 144-9, Apr/Jun. 2016.

MIYAMOTO, K. *et al.* Diabetes and glucose transporter gene expression in rat small intestine. **Biochem Biophys Res Commun**, San Diego, v. 181, n. 3, p. 1110-7, 31 Dec. 1991.

MORRISH, N. J. *et al.* Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. **Diabetologia**, Berlin, v. 44, Supl. 2, p. 14-21, Sep. 2001.

MOSTAFAVINIA, A. *et al.* The effects of dosage and the routes of administrations of streptozotocin and alloxan on induction rate of type1 diabetes mellitus and mortality rate in rats. **Lab Anim Res**, Chungbuk, v. 32, n. 3, p. 160-165, Sep. 2016.

MIRANDA M.A. *et al.* Uso etnomedicinal do chá de Morus nigra L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 36, n. 1, p. 61-68, jan./mar. 2010.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem**, Baltimore, n. 247, p. 3170–3175, 1972.

NEPOMUCENO, M. F. Bioquímica experimental: roteiros práticos. Piracicaba-SP: Editora UNIMEP, 1998.

NELSON, A. J.; ROCHELAU, S. K.; NICHOLLS, S. J. Managing Dyslipidemia in Type 2 Diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**, Philadelphia, v. 47, n. 1, p. 153-173, Mar. 2018.

OTT, A. *et al.* Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. **Neurology**, Hagerstown, v. 53, n. 9, p. 1937-42, Dec. 10 1999.

OLIVEIRA, H. C. *et al.* Antidiabetic activity of Vatairea macrocarpa extract in rats. **J. Ethnopharmacol**, Limerick, v. 115, n. 3, p. 515-9, Feb. 12 2008.

OLIVEIRA S.G. *et al.*, An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **J Ethnopharmacol**, Limerick 140: 428-37, 2012.

ORTIZ-ANDRADE R.R. *et al.*, Alpha-Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: an anti-hyperglycemic agent. **J Ethnopharmacol**, Limerick, n. 109, p. 48-53, 2007.

PANIGRAHI, G.; PANDA, C.; PATRA, A. Extract of *Sesbania grandiflora* Ameliorates Hyperglycemia in High Fat Diet-Streptozotocin Induced Experimental Diabetes Mellitus. **Scientifica**, Cairo, v. 2016, p. 4083568, 2016.

PENNINGTON, A. M.; CORPE, C. P.; KELLETT, G. L. Rapid regulation of rat jejunal glucose transport by insulin in a luminally and vascularly perfused preparation. **J Physiol**, Oxford, v. 478, n. 2, p. 187-93, 15 Jul. 1994.

PIRMOHAMED, M. *et al.* Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. **BMJ**, London, v. 329, n. 7456, p. 15-9, 3 Jul. 2004.

PULLELA, S. V. *et al.* HPLC assisted chemobiological standardization of alpha-glucosidase-I enzyme inhibitory constituents from *Piper longum* Linn-An Indian medicinal plant. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v. 108, n. 3, p. 445-9, 6 Dec. 2006.

SESHASAI, S. R. K. *et al.* Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. **N Engl J Med**, Boston, v. 364, n. 9, p. 829-841, 3 Mar. 2011.

RAWSHANI, A. *et al.* Mortality and Cardiovascular Disease in Type 1 and Type 2 Diabetes. **N Engl J Med**, Boston, v. 376, n. 15, p. 1407-1418, 13 Apr. 2017.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, London, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 13 Dec. 2001.

SAMADDER A. *et al.* Possible signaling cascades involved in attenuation of alloxan-induced oxidative stress and hyperglycemia in mice by ethanolic extract of *Syzygium jambolanum*: drug-DNA interaction with calf thymus DNA as target. **Eur J Pharm Sci**, Amsterdam, n. 44, p. 207-217, 2011.

SINGH, R. *et al.* Management of diabetic complications: A chemical constituents based approach. **J Ethnopharmacol**, Limerick, n. 150, p. 51-710, 2013.

SIQUEIRA, J. T. *et al.* Combretum lanceolatum flowers ethanol extract inhibits hepatic gluconeogenesis: an in vivo mechanism study. **Pharm Biol**, London, v. 54, n. 9, p. 1671-9, Sep. 2016.

SONG, P. *et al.* Sodium glucose cotransporter SGLT1 as a therapeutic target in diabetes mellitus. **Expert Opin Ther Targets**, London, v. 20, n. 9, p. 1109-25, Sep. 2016.

STROWIG, S. M.; RASKIN, P. The effect of rosiglitazone on overweight subjects with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, Alexandria VA, v. 28, n. 7, p. 1562-7, Jul. 2005.

SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A. In vitro alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta Biochim Pol**, Warszawa, v. 55, n. 2, p. 391-8, 2008.

TAHRANI, A. A.; BARNETT, A. H.; BAILEY, C. J. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, London, v. 12, n. 10, p. 566-92, Oct. 2016.

TEKIN, N.; AKYUZ, F.; TEMEL, H. E. NO levels in diabetes mellitus: Effects of l-NAME and insulin on LCAT, Na(+)/K(+) ATPase activity and lipid profile. **Diabetes Metab Syndr**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 191-5, Oct/Dec. 2011.

THABTI, I. *et al.* Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **J Funct Foods**, Amsterdam, n. 4, p. 367-374, 2012.

TIWARI, V.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. *Emblica officinalis* corrects functional, biochemical and molecular deficits in experimental diabetic neuropathy by targeting the oxido-nitrosative stress mediated inflammatory cascade. **Phytother Res**, London, n. 25, p. 1527-1536, 2011.

THAIPITAKWONG, T.; NUMHOM, S.; ARAMWIT, P. Mulberry leaves and their potential effects against cardiometabolic risks: a review of chemical compositions, biological properties and clinical efficacy. **Pharm Biol**, London, v. 56, n. 1, p. 109-118, Dec. 2018.

TOBIN V. *et al.* Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. **Diabetes**, Alexandria VA, n. 57, p. 555-62, 2008.

UZOR, P. F.; OSADEBE, P. O.; NWODO, N. J. Antidiabetic Activity of Extract and Compounds from an Endophytic Fungus *Nigrospora oryzae*. **Drug Res**, Stuttg, v. 67, n. 5, p. 308-311, May 2017.

VARGHESE, G.K.; BOSE, L.V.; HABTEMARIAM, S. Antidiabetic components of *Cassia alata* leaves: identification through α -glucosidase inhibition studies. **Pharm Biol**, London, n. 51, p. 345-349, 2013.

VOLPATO, G. T. *et al.* Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v. 138, n. 3, p. 691-6, 8 Dec. 2011.

WANG, R.J.; HU, M.L. Antioxidant Capacities of Fruit Extracts of Five Mulberry Genotypes with Different Assays and Principle Components Analysis. **International Journal of Food Properties**, Philadelphia, n. 14, p. 1-8, 2011.

WINTERBOURN, C.C. Concerted antioxidant activity of glutathione and superoxide dismutase. In: PACKER, L.; FUCHS, J. (Eds.) **Biothiols in Health and Disease**. New York: Lester Packer, 1995. p. 117-134.

WHITE, F. R. Streptozotocin. **Cancer Chemother Rep**, Bethesda, v. 30, p. 49-53, Jul. 1963.

WHITE, M. F. Insulin signaling in health and disease. **Science**, New York, v. 302, n. 5651, p. 1710-1, 5 Dec. 2003.

WINER, N.; SOWERS, J.R. Epidemiology of diabetes. **J. Clin. Pharm**, Stamford, n. 44, p. 397–405, 2004.

WEIGUO Z. *et al.* Phylogeny of the genus *Morus* (Urticales: Moraceae) inferred from ITS and trnL-F sequences. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 4, n. 6, p. 563-569, June 2005.

WU, C. *et al.* The caffeoylquinic acid-rich *Pandanus tectorius* fruit extract increases insulin sensitivity and regulates hepatic glucose and lipid metabolism in diabetic db/db mice. **J Nutr Biochem**, Stoneham, v. 25, n. 4, p. 412-9, Apr. 2014.

YOUNOSZAI M.K.; SCHEDL H. Effect of diabetes on intestinal disaccharidase activities. **J Lab Clin Med**, Milpitas, n. 79, p. 579 –586, 1972.

YUSOFF, N. A. *et al.* Aqueous Extract of *Nypa fruticans* Wurmb. Vinegar Alleviates Postprandial Hyperglycemia in Normoglycemic Rats. **Nutrients**, Basel, v. 7, n. 8, p. 7012-26, 20 Aug. 2015.

ZARGAR, B. A. *et al.* Antihyperlipidemic and Antioxidant Potential of *Paeonia emodi* Royle against High-Fat Diet Induced Oxidative Stress. **ISRN Pharmacol**, Cairo, v. 2014, p. 182362, 2014.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), MnSOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med**, Tarrytown, n. 33, p. 337-349, 2002.

ZHANG, A. J. *et al.* Alpha-Glucosidase inhibitory effect of resveratrol and piceatannol. **J Nutr Biochem**, Stoneham, v. 47, p. 86-93, Sep. 2017.

ZHANG, R. *et al.* Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK -Ay mice. **Nutr Metab**, London, v. 8, p. 85, 2 Dec. 2011.

ZHANG, X. *et al.* Improvement of cardiomyocyte function by in vivo hexarelin treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. **Physiol Rep**, Malden MA, v. 6, n. 4, Feb. 2018.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 27 de dezembro de 2016.

Ofício nº 120/16

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

Para: **Prof. Eduardo Carvalho Lira**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0042/2016

Certificamos que a proposta intitulada “**Atividade antidiabética, hipolipemiante e antioxidante das frações hexânica e clorofómio do extrato das folhas de *Morus nigra* em ratos.**”, registrada com o nº **0042/2016**, sob a responsabilidade de Prof. Dr. **Eduardo Carvalho Lira** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 07/12/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 01/03/2018
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de animais	149
Peso/Idade	200g / 2 meses
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia CB-UFPE

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691

