



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

YASMINE ROSA BATISTA SILVA

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Lippia dulcis* Trev. SOBRE A GLICEMIA
EM JEJUM E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS EM RATOS *Wistar*
DIABÉTICOS**

**SANTARÉM - PARÁ
2024**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

YASMINE ROSA BATISTA SILVA

**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Lippia dulcis* Trev. SOBRE A GLICEMIA
EM JEJUM E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS EM RATOS *Wistar*
DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pacheco de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata

**SANTARÉM - PARÁ
2024**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

S586e Silva, Yasmine Rosa Batista
Efeito do extrato etanólico de *Lippia dulcis* Trev. Sobre a glicemia em jejum e fatores de risco associados em ratos *Wistar* diabéticos / Yasmine Rosa Batista Silva. – Santarém, 2024.
70 p.
Inclui bibliografias.

Orientação: Elaine Cristina Pacheco de Oliveira; Coorientação: Lauro Euclides Soares Barata.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

1. Diabetes - Trabamento. 2. Hortelã-doce. 3. Atividade hipoglicemiante . I. Oliveira, Elaine Cristina Pacheco de, *orient.* II. Barata, Lauro Euclides Soares Barata, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 616.462

Bibliotecário - Documentalista: Mayco Chaves – CRB/2 1357

YASMINE ROSA BATISTA SILVA


**EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Lippia dulcis* Trev. SOBRE A GLICEMIA
EM JEJUM E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS EM RATOS *Wistar*
DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Elaine Cristina Pacheco Oliveira

Conceito: Aprovada

Data de aprovação: 11/04/2024

Assinatura dos componentes da banca julgadora/avaliadora		
TITULAÇÃO	NOME DO (A) DOCENTE	ASSINATURA- GOV.BR
Examinador (a) Interno (a): Prof.(a) Dr.(a)	ANTÔNIO HUMBERTO HAMAD MINERVINO	 Documento assinado digitalmente ANTONIO HUMBERTO HAMAD MINERVINO Data: 18/04/2024 15:33:01-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Examinador (a) Interno (a): Prof.(a) Dr.(a)	WALDINEY PIRES MORAES	 Documento assinado digitalmente WALDINEY PIRES MORAES Data: 17/04/2024 12:26:03-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Orientador: Prof.(a) Dr.(a)	ELAINE CRISTINA PACHECO DE OLIVEIRA	 Documento assinado digitalmente ELAINE CRISTINA PACHECO DE OLIVEIRA Data: 18/04/2024 16:42:31-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Examinador(a) Externo (a): Prof.(a) Dr. (a)	JOSÉ SOUSA DE ALMEIDA JÚNIOR	 Documento assinado digitalmente JOSE SOUSA DE ALMEIDA JUNIOR Data: 18/04/2024 15:50:00-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br

À minha mãe, minha primeira educadora, minha motivação para este trabalho. Ao meu esposo pela paciência e apoio. Aos amigos de jornada, que tornaram todos os passos mais leves.

AGRADECIMENTOS

À Deus, porque essa vontade de recomeçar e essa força que me sustentou até aqui só tem uma explicação.

Aos meus pais, pelo apoio logístico e pela confiança, sobretudo à Rosely, minha mãe, minha guerreira, meu alicerce, por me ensinar a segurar a minha onda e seguir de cabeça erguida. Todo amor que houver nessa vida!

Ao meu esposo, pela tremenda paciência e moderada compreensão, procurando entender que tudo até aqui faz parte da jornada em busca de um sonho.

À minha mana Yana Carla e minha sobrinha Carol, amor da minha vida! Quero ser motivo de orgulho pra vocês.

Ao meu amigo, irmão e fiel escudeiro, Erick Batista. Desde o dia em que eu disse que iria ingressar nessa aventura não largou minha mão.

À minha orientadora, Dra. Elaine Cristina Pacheco de Oliveira, pelos ensinamentos, pelas palavras de incentivo e por me mostrar que eu sou capaz.

À Beatriz Belo, por ser uma extensão de mim quando eu não pude ser mais, por dizer sempre que iria dar certo, mesmo durante os dias de tormenta. Junto com Larissa, me proporcionaram momentos leves e felizes. Obrigada, eu necessitava de vocês!

Aos colegas de laboratório, por todo ensinamento, ajuda e vivência, em especial à Selino e Gleisson, por estarem lá quando eu precisei.

À Nicolas Blandes. Sem palavras para agradecer por não me deixar só, por dizer sim sempre que eu chamei.

À amiga Jeniffer e ao Rafa, por entenderem minhas limitações e terem a paciência de me ajudar a construir uma parte desse trabalho.

Às meninas do Biotério da UEPA, Veterinária Emanuelle e Técnica Olívia, pelo apoio e ensinamentos durante os meses de manejo com os animais.

Ao professor Júlio Onésio Melo e à doce Ana Carolina Mazzinghy, por serem cruciais na construção dos meus resultados, sendo os responsáveis por desvendar um dos maiores mistérios em torno desta pesquisa. Deus nos envia anjos e Ana foi um deles.

À minha mais fiel companheira, minha Lunna, meu coração fora do peito, presença indivisível em minha vida por 12 anos. Iniciou comigo nessa jornada, esperou pacientemente que eu me estabilizasse e me encontrasse, e, já no final, como quem diz que sua missão na terra foi finalmente cumprida, partiu, deixando uma lacuna imensa e uma eterna saudade, mas também uma Yasmine mais forte e pronta pra recomeçar sempre.

“Qual a razão de viver se não for para tornar a vida menos difícil para os outros?”
(George Eliot)

RESUMO

Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada pela falha na produção ou deficiência de insulina no organismo, hormônio responsável pelo metabolismo de glicose. *Lippia dulcis* Trev. é uma planta arbustiva da família Verbenaceae, conhecida como hortelã-doce ou capim-doce na região Norte do Brasil. É utilizada tradicionalmente para tratar o DM. Considerando o uso empírico desta planta e a busca por alternativas naturais pra controlar o diabetes, esta pesquisa objetivou avaliar a atividade hipoglicemiante do Extrato Etanólico das partes aéreas secas de *Lippia dulcis* Trev. (EELD) em ratos da linhagem *Wistar* induzidos ao DM tipo 2 por aloxana. O extrato foi obtido por Soxhlet e a análise da composição química do EELD se deu por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE. Os compostos foram identificados utilizando a literatura. Foi realizada avaliação da toxicidade oral aguda do extrato utilizando 06 ratos *Wistar* fêmeas, das quais três receberam EELD a 2.000 mg/kg, e três foram usadas como controle. Para os experimentos de efeito hipoglicemiante foram utilizados 20 ratos *Wistar* machos, divididos em quatro grupos (n=5), Controle Negativo (Grupo I), Controle Positivo (Grupo II), EELD 100 mg/Kg (Grupo III) e EELD 500 mg/Kg (Grupo IV), sendo estes dois últimos os que receberam concentrações de EELD a 100 mg/kg e 500 mg/kg, respectivamente. Os tratamentos foram administrados por gavagem durante 21 dias. A cada 07 dias avaliou-se peso e glicemia em jejum dos animais. Após os 21 dias de tratamento o sangue dos animais foi coletado para análise bioquímica (TGP, TGO, ureia e creatinina). O resultado da análise química do EELD indicou a presença de compostos fenolicos e fenilpropanóides. O extrato etanólico de *L. dulcis* não apresentou sinais de toxicidade nos animais que receberam 2.000 mg/kg. Na avaliação do efeito hipoglicemiante do EELD houve diferença estatística entre os grupos tratados, onde os Grupos II, III e IV diferiram do Grupo I (Controle Negativo). Os animais tratados com ambas as concentrações do extrato de *L. dulcis* mantiveram uma média de glicemia durante os 21 dias de tratamento, apresentando leve redução deste parâmetro no 21º dia. Quanto ao estado ponderal, houve diferença estatística no ganho de peso entre os dias de avaliação, demonstrando que a perda nos grupos foi gradativa a partir da primeira semana de experimentos. Observou-se que os animais tratados com os EELD a 100 mg/Kg e 500 mg/Kg apresentaram média de ganho de peso no 21º dia. Na avaliação bioquímica, os níveis de TGO, TGP e ureia não apresentaram diferença estatística entre os grupos, ao contrário dos níveis séricos de creatinina, que foram considerados dentro da normalidade apenas nos animais tratados com os extratos. Esses resultados indicam que o EELD pode estar associado à melhora de determinados agravos da hiperglicemia crônica. Portanto, faz-se necessário complementar estes resultados com estudos adicionais, a fim de contribuir para o conhecimento das atividades terapêuticas da planta. Além disso, é essencial conduzir uma análise fitoquímica mais detalhada do EELD, possibilitando a quantificação dos compostos fenólicos de *L. dulcis*, ampliando os dados fornecidos nesta pesquisa.

Palavras chave: Diabetes Mellitus; hortelã-doce; atividade hipoglicemiante.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by failure in the production or deficiency of insulin in the body, the hormone responsible for glucose metabolism. *Lippia dulcis* Trev. is a shrubby plant from the Verbenaceae family, known as sweet mint or sweet grass in the North of Brazil. It is traditionally used to treat DM. Considering the empirical use of this plant and the search for natural alternatives to control diabetes, this research aimed to evaluate the hypoglycemic activity of the Ethanol Extract from the dried aerial parts of *Lippia dulcis* Trev. (EELD) in *Wistar* rats induced type 2 DM by alloxan. The extract was obtained by Soxhlet and the chemical composition of EELD was analyzed using High Performance Liquid Chromatography – HPLC. The compounds were identified using the literature. The acute oral toxicity of the extract was evaluated using 6 female *Wistar* rats, three of which received EELD at 2,000 mg/kg, and three were used as controls. For the hypoglycemic effect experiments, 20 male *Wistar* rats were used, divided into four groups (n=5), Negative Control (Group I), Positive Control (Group II), EELD 100 mg/Kg (Group III) and EELD 500 mg /Kg (Group IV), the latter two being those that received EELD concentrations of 100 mg/kg and 500 mg/kg, respectively. Treatments were administered by gavage for 21 days. Every 7 days, the animals' weight and fasting blood glucose levels were evaluated. After 21 days of treatment, the animals' blood was collected for biochemical analysis (TGP, TGO, urea and creatinine). The result of the EELD chemical analysis indicated the presence of phenolic and phenylpropanoid compounds. The ethanolic extract of *L. dulcis* showed no signs of toxicity in animals that received 2,000 mg/kg. When evaluating the hypoglycemic effect of EELD, there was a statistical difference between the treated groups, where Groups II, III and IV differed from Group I (Negative Control). The animals treated with both concentrations of *L. dulcis* extract maintained an average blood glucose level during the 21 days of treatment, showing a slight reduction in this parameter on the 21st day. Regarding weight status, there was a statistical difference in weight gain between the evaluation days, demonstrating that the loss in the groups was gradual from the first week of experiments. It was observed that animals treated with EELD at 100 mg/Kg and 500 mg/Kg showed an average weight gain on the 21st day. In the biochemical evaluation, the levels of TGO, TGP and urea showed no statistical difference between the groups, unlike serum creatinine levels, which were considered within normal limits only in animals treated with the extracts. These results indicate that EELD may be associated with the improvement of certain problems of chronic hyperglycemia. Therefore, it is necessary to complement these results with additional studies, in order to contribute to the knowledge of the plant's therapeutic activities. Furthermore, it is essential to conduct a more detailed phytochemical analysis of EELD, enabling the quantification of *L. dulcis* phenolic compounds, expanding the data provided in this research.

Keywords: Diabetes Mellitus; sweet mint; hypoglycemic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ação dos hormônios responsáveis pela regulação da glicose sanguínea.....	17
Figura 2 - Vias de formação dos produtos de glicação avançada a partir da glicólise.....	20
Figura 3 - <i>Lippia dulcis</i> Trev.....	28
Figura 4 - Mudanças de <i>L. dulcis</i> comercializadas em uma feira popular na cidade de Santarém/PA.....	29
Figura 5 - Canteiro de <i>L. dulcis</i>	36
Figura 6 - Partes aéreas de <i>L. dulcis</i> após secagem.....	36
Figura 7 - Etapas de extração do EELD. A) Extração por Soxhlet. B) Evaporação do solvente. C) Extrato etanólico de <i>L. dulcis</i> bruto.....	37
Figura 8 - Toxicidade oral aguda. A) EELD bruto diluído em solução salina 0,9%. B) Administração do EELD 2.000mg/kg por gavagem em rato <i>Wistar</i> fêmea.....	39
Figura 9 - Rato <i>Wistar</i> contido para retirada de sangue da cauda na verificação de glicemia em jejum.....	41
Figura 10 - Perfil Cromatográfico Representativo do Extrato Etanólico de <i>Lippia dulcis</i> Trev.....	43
Figura 11 - Diferença de tamanho de animal do Grupo I, à esquerda (A4), e Grupo IV, à direita (A1), no último dia de tratamento.....	52
Figura 12 - Comparação de média e desvio padrão das dosagens de enzimas por grupos de teste. (A): transaminase oxalacética (TGO); (B): transaminase pirúvica (TGP).....	55
Figura 13 - Comparação de médias pelo teste Tukey (5% de confiabilidade) das dosagens de enzimas por grupos de teste. (A): Creatinina; (B): Ureia. Sinalizações de mesma letra correspondem a valores estatisticamente iguais, sinalizações de letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores glicêmicos para o diagnóstico de diabetes.....	18
TABELA 2 - Valores de referência para TGP, TGO, ureia e creatinina em ratos <i>Wistar</i> machos saudáveis.....	42
TABELA 3 - Compostos fenólicos identificados na amostra do Extrato Etanólico de <i>Lippia dulcis</i> Trev., com base na literatura.....	43
TABELA 4 - Peso inicial e final dos animais (Toxicidade Oral Aguda do EELD).....	46
TABELA 5 - Sinais e sintomas que foram avaliados nos ratos <i>Wistar</i> fêmeas após administração da Solução Salina 0,9% e do EELD na concentração de 2.000 mg/kg, durante 14 dias.....	47
TABELA 6 - Média de glicemia em jejum dos grupos de animais observada ao 1°, 7°, 14° e 21° dia.....	49
TABELA 7 - Análise de Variância (ANOVA) considerando os fatores glicemia x grupo e glicemia x dia.....	49
TABELA 8 - Dados de glicemia em jejum expressos utilizando médias para os grupos. Diferenças identificadas pelo método LSD de Fisher.....	50
TABELA 9 - Média de peso dos grupos de animais observada ao 1°, 7°, 14° e 21° dia.....	52
TABELA 10 - Análise de Variância (ANOVA) considerando os fatores peso x grupo e peso x dia.....	53
TABELA 11 - Dados de peso expressos utilizando médias para dias. Diferenças identificadas pelo método LSD de Fisher.....	53
TABELA 12 - Médias dos valores das enzimas dos animais, comparada aos valores de referência de Lima et al. (2014).....	54

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

DM	Diabetes Mellitus
HAS	Hipertensão Arterial Sistmica
OMS	Organizao Mundial de Saúde
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
AGE	Advanced Glycated End-Products
EELD	Extrato Etanólico de Partes Aéreas de <i>Lippia dulcis</i> Trev.
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará
INPM	Grau Instituto Nacional de Pesos e Medidas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IQ-USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
TFA	cido trifluoroacético
UEPA	Universidade Estadual do Pará
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ALX	Aloxana
STZ	Estreptozotocina
DNA	cido desoxirribonucleico
ERO	Espécies reativas do oxignio
TGO	Transaminase oxalacética
TGP	Transaminase pirúvica
CMC	Carboximetilcelulose
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Metabolismo de carboidratos	16
2.2 Diabetes Mellitus: fisiopatologia e mecanismo de ação	17
2.2.1 DM tipo 1: aspectos gerais.....	21
2.2.2 DM tipo 2: aspectos gerais.....	22
2.2.3 Diabetes Gestacional: aspectos gerais.....	23
2.3 Tratamento do Diabetes Mellitus	24
2.3.1 Terapia medicamentosa no Diabetes Mellitus.....	24
2.3.2 Uso de plantas medicinais para o controle do Diabetes Mellitus e das alterações metabólicas associadas ao comprometimento renal e hepático.....	25
2.4 <i>Lippia dulcis</i> TREV	27
2.5 Fármacos utilizados para indução do DM experimental	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 Geral	33
3.2 Específicos	33
4. JUSTIFICATIVA	34
5. MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1 Material Vegetal	36
5.2 Obtenção do extrato etanólico de <i>Lippia dulcis</i> Trev. (EELD)	36
5.3 Análise da composição química do EELD	37
5.4 Animais	37
5.5 Protocolo experimental	38
5.5.1 Teste de Toxicidade Oral Aguda.....	38
5.5.2 Indução do diabetes experimental e determinação da atividade hipoglicemiante <i>in vivo</i>	39
5.5.3 Divisão dos Grupos.....	39
5.5.4 Aplicabilidade dos tratamentos.....	40
5.5.5 Avaliação da glicemia em jejum e peso corpóreo.....	40
5.5.6 Avaliação dos Parâmetros bioquímicos nos animais.....	41
5.6 Análise Estatística	42

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1 Caracterização química do extrato etanólico de partes aéreas secas de <i>Lippia dulcis</i> (EELD)	43
6.2 Toxicidade oral aguda do EELD	46
6.3 Glicemia em jejum dos animais durante experimentação para análise de efeito hipoglicemiante do EELD	48
6.4 Estado ponderal dos animais durante experimentação	51
6.5 Níveis séricos de ureia, creatinina, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) dos animais	54
7. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

Os hábitos alimentares sofreram intensas mudanças ao longo da história. Antigamente o foco da terapia nutricional consistia em combater deficiências alimentares e desnutrição, problemas relacionados à quantidade de nutriente na dieta da população. Houve, porém, uma alteração demográfica, sobretudo em países desenvolvidos, mudando o foco destas deficiências para uma grande incidência de doenças crônico-degenerativas, como problemas cardiovasculares, Diabetes Mellitus (DM), hipertensão arterial (HAS), dislipidemias e câncer, que correspondem a 70% da mortalidade e 58% da morbidade, respectivamente, em todo o mundo. A facilidade de acesso a alimentos prontos e rápidos levou ao consumo excessivo de alimentos não nutritivos, ricos em gorduras e açúcares, aumentando o risco de problemas de saúde (ROSSANEIS et al., 2019; TAPSELL et al., 2016).

A busca pela cura de doenças a partir do uso de plantas medicinais é um hábito antigo. Muitos povos pelo mundo aprimoraram de maneira empírica a administração de vários tipos de ervas como remédio para tratar problemas de saúde. Fontes de compostos biologicamente ativos, os produtos vegetais representam um papel importante no uso tradicional, por sua disponibilidade e baixo custo, e têm subsidiado a pesquisa farmacêutica como matéria-prima para o desenvolvimento de novas drogas (HOTWANI; BALIGA; SHARMA, 2014).

O Diabetes Mellitus é um distúrbio metabólico que afeta mais de 540 milhões de pessoas no mundo, 16,8 milhões só no Brasil (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2022). É caracterizado por um grupo de disfunções metabólicas de diferentes causas etiológicas, que causam falhas na síntese ou ação da insulina, ocasionando constante elevação da glicose sanguínea. O tipo 2, também conhecido como diabetes adquirida, é o mais comum presente na população, com 90 a 95% dos casos (LIRA NETO et al., 2018). A condição de hiperglicemia crônica é ainda um fator de risco para o desenvolvimento de disfunções teciduais e endócrinas, como distúrbios nos rins e fígado, estando estes órgãos diretamente envolvidos no metabolismo de glicose (KEARNEY & GNUDI, 2023).

Tendo em vista a crescente demanda por tratamento para o diabetes e o alto custo com medicação para tratar a patologia, suas consequências e morbidades, muito se tem buscado a fitoterapia como alternativa terapêutica. (COUTINHO et al., 2016; ROSSANEIS et al., 2019). Diversos compostos de plantas apresentaram atividades hipoglicemiantes em pesquisas *in vivo* e *in vitro*. A atividade farmacológica destas substâncias é estudada como uma alternativa para controle e/ou tratamento do DM, considerando o baixo custo e fácil acesso aos produtos de origem natural, fatores altamente ponderados pela indústria farmacêutica. Os compostos

bioativos isolados de plantas têm mostrado efeito positivo para o tratamento da síndrome metabólica, com grande potencial antioxidante (SOK YEN et al., 2021).

Estudos com plantas pertencentes à família Verbenaceae já demonstraram efeito positivo no tratamento de DM. Em sua pesquisa utilizando ratos, Arika et al. (2015), comprovaram o potencial antidiabético do extrato aquoso obtido das folhas da planta *Lippia javanica*, associado a compostos fitoquímicos vitais presentes na espécie. Al-Snai (2019) destaca em seu levantamento sobre a espécie *Phyla nodiflora*, além de outras propriedades terapêuticas, a atividade hipoglicemiante da planta, *in vivo*, bem como de seu composto isolado γ -Sitosterol.

Lippia dulcis Trev., conhecida como erva doce asteca, é uma planta que faz parte da família Verbenaceae, nativa da América Central, e popular por seu poder edulcorante, sendo um potente adoçante natural. Usada na medicina tradicional principalmente para tratar resfriados e tosse persistentes, diarreia e dor de estômago, suas flores também são muito utilizadas na culinária, como alternativa para o açúcar. A doçura é proveniente da hernandulcina presente no óleo essencial das folhas e flores da planta, substância até 1.500 vezes mais doce que a sacarose (PÉREZ et al., 2005; SCHMITT et al., 2016). Na região Norte do Brasil, *L. dulcis* também é utilizada como infusão para controlar o diabetes (ROCHA et al., 2023).

Diante do exposto, considerando a disponibilidade e adaptação da planta ao clima e solo desta região, é relevante identificar a composição fitoquímica do Extrato Etanólico de *Lippia dulcis* Trev. (EELD), investigar seu possível efeito hipoglicemiante, bem como seu impacto no peso e nas enzimas relativas ao funcionamento renal e hepático de ratos *Wistar* diabéticos induzidos, a fim de avaliar as propriedades terapêuticas desta planta.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metabolismo de carboidratos

Em condições naturais, após a ingestão de alimentos (pós-prandial) grande parte dos carboidratos da alimentação é absorvida pelo fígado, sendo a glicose, a frutose e a galactose os açúcares (monossacarídeos) mais utilizados como fonte de energia pelo organismo. Estes produtos da quebra enzimática de dissacarídeos e polissacarídeos são então hidrolisados e transformados no produto final de absorção pelo intestino, a glicose, que fica armazenada no fígado, por ação hormonal, para ser prontamente utilizada ou armazenada na forma de depósitos de glicogênio, polímeros de glicose que funcionam como uma reserva energética (PRETE, 2019).

Nos indivíduos normoglicêmicos a glicose sanguínea é constantemente regulada pelos hormônios e enzimas responsáveis por seu armazenamento e por sua liberação na corrente sanguínea. Os dois principais hormônios que participam da regulação da glicose são o glucagon, produzido pelas células α , e a insulina, produzida pelas células β , ambas as células das ilhotas pancreáticas (DE CASTRO et al., 2021). O glucagon é o hormônio responsável por estimular a secreção de glicose. Ele é secretado e age no fígado, provocando a quebra dos depósitos de glicogênio, o que ativa a produção de glicose em períodos de hipoglicemia. Em condições fisiológicas como no Diabetes tipo I o aumento desse hormônio contribui para o estado de cetoacidose e para perda de função das células β , prejudicando a secreção da insulina (CAPOZZI; D'ALESSIO; CAMPBELL, 2022).

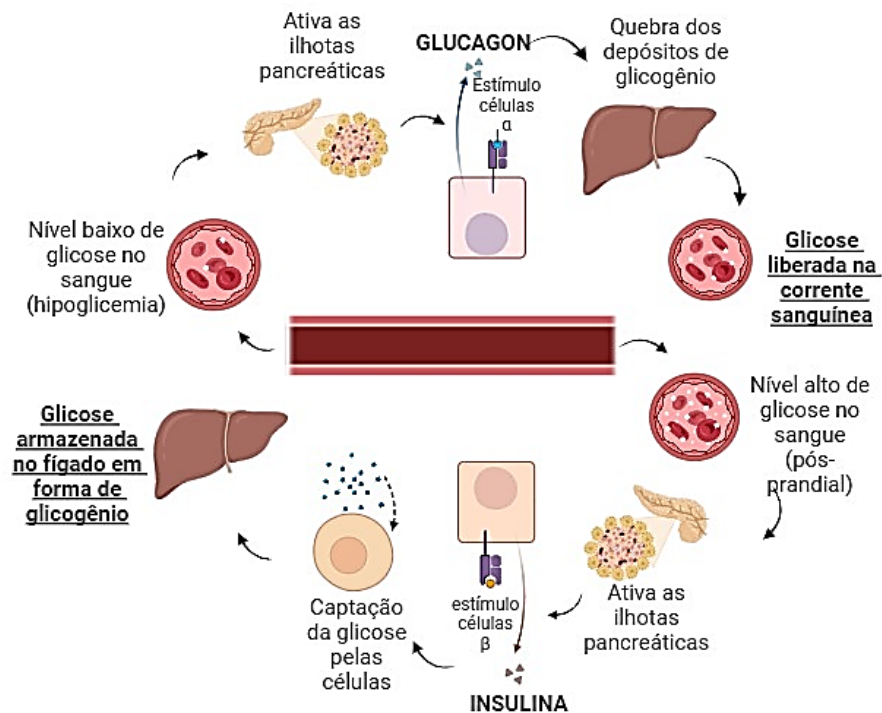
A insulina, hormônio que age na captação da glicose após a ingestão de alimentos energéticos, é responsável por retirar a glicose do sangue e transportá-la para o fígado, onde é armazenada como glicogênio (**Figura 1**). Por ser o único hormônio com ação hipoglicemiante, a insulina apresenta um minucioso controle de secreção, e sua ação pode ser comprometida dependendo do estado fisiológico do indivíduo, como na gestação, envelhecimento ou mesmo por fatores genéticos e ambientais (DE CASTRO et al., 2021).

Após a sobrecarga de glicose no organismo, seja pelo estímulo da alimentação ou por administração intravenosa, ocorre a secreção de insulina em duas fases. O primeiro pico ocorre após 10 minutos da chegada da glicose na corrente sanguínea. Esta fase pode perdurar por aproximadamente 15 minutos, que precedem a segunda fase, caracterizada por um aumento progressivo, porém expressivo da ação da insulina, que pode perdurar por até 03 horas, como observado em humanos e em ratos. Após esse período a glicose sanguínea

retorna aos níveis basais (HUANG; JOSEPH, 2014).

Quando há presença de glicose na corrente sanguínea, principalmente após a ingestão de alimentos ricos em açúcares, a glicose entra nas células promovendo o fechamento dos canais de potássio (K), o que acarreta na despolarização da membrana celular e na abertura dos canais de cálcio (Ca^{2+}), resultando na liberação de insulina para a corrente sanguínea (GALICIA-GARCIA et al., 2020).

Figura 1. Ação dos hormônios responsáveis pela regulação da glicose sanguínea.



Fonte: CAPOZZI; D'ALESSIO; CAMPBELL (2022); DE CASTRO et al. (2021).

2.2 Diabetes Mellitus: fisiopatologia e mecanismo de ação

Diabetes Mellitus (DM) foi mencionado em registros que datam de 1.500 aC pelos povos egípcios, caracterizado como a doença que causava perda excessiva de urina, a qual ao longo de séculos era tratada de maneira inadequada e ineficaz com receitas sem quaisquer efeitos terapêuticos, dada a falta de conhecimento sobre a origem do problema. Foi a partir do século XIX que a restrição na dieta e a prática de atividades físicas foram consideradas para amenizar os sintomas da doença, práticas estas que são até os dias de hoje fundamentais para prevenção e controle do DM, especialmente do tipo 2 (LAKHTAKIA, 2013).

Essa doença está entre os quatro principais problemas não transmissíveis de saúde que mais requerem cuidados e atenção para minimizar sua incidência e agravos. Demanda grande atenção na promoção da saúde, uma vez que, dentre as doenças não-transmissíveis, é

considerada uma das quatro principais causas de mortalidade nas Américas (PAHO, 2022). É uma doença metabólica crônica caracterizada pela deficiência na produção de insulina pelo pâncreas, ou quando não há aproveitamento desse hormônio pelo organismo, o que leva a intolerância à glicose, prejudicando as células β do pâncreas (OGUNTIBEJU, 2019; ROSSANEIS et al., 2019).

De acordo com a INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF, 2022), apenas nas Américas do Sul e Central, um em cada 11 adultos apresentam diagnóstico da doença, chegando a mais de 33 milhões de indivíduos diabéticos. No entanto, uma em cada três pessoas ainda não foram devidamente diagnosticadas, apesar de conviverem com a doença (33%), o que pode levar ao aparecimento precoce dos sintomas mais graves da doença. Ainda nestas regiões, mais de 410mil mortes no ano de 2021 foram decorrentes de DM e as despesas com a doença chegaram a U\$ 65 bilhões.

O DM pode ser classificado em três tipos bem delimitados, o tipo 1 (imunomediada), o tipo 2 (fatores genéticos e ambientais) e o DM gestacional (hormonal). Além destes, outros fatores como erros genéticos, reação ao uso de certos medicamentos e infecções podem levar o organismo ao estado de hiperglicemia crônica. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os valores a serem considerados ao se observar um quadro de glicemia normal e quando há ocorrência estabelecida de diabetes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019) estão representados na **Tabela 1** abaixo:

Tabela 1. Valores glicêmicos para o diagnóstico de diabetes.

	Glicose em jejum (mg/dL)	Glicose 2 horas após sobrecarga com 75g de glicose (mg/dL)	Hemoglobina glicada - HbA1c (%)	Observações
Normoglicemia	< 100	< 140	< 5,7	OMS emprega valor de corte de 110 mg/dL para normalidade da glicose em jejum.
Diabetes estabelecido	≥ 126	≥ 200	$\geq 6,5$	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de DM. Método de HbA1c deve ser o padronizado. Na ausência de sintomas de hiperglicemia, é necessário confirmar o diagnóstico pela repetição de testes.

Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019.

Quanto aos mecanismos de ação dos principais tipos de DM, em suma, observa-se que no tipo 1 ocorre uma ação contra as células β , resultado da atividade autoimune no organismo,

o que leva a deficiência na produção de insulina ou mesmo à total ausência dessa produção, enquanto no tipo 2 a ação desse hormônio é prejudicada devido a falhas funcionais das células β . Esses são fenômenos fisiopatológicos que ocorrem por estímulos intrínsecos ou ambientais, como aumento dos níveis séricos de açúcares, gorduras e aminoácidos, função celular anormal, inflamações e alterações genéticas que afetam as moléculas de sinalização de produção e excreção de insulina (ŠIMONIENĚ et al., 2020).

No DM tipo 1 os anticorpos anti-insulina atacam os compostos envolvidos no metabolismo da glicose (hormônio insulina, enzima descarboxilase de ácido glutâmico de 65kDa, proteína 2 da insulinoma, e o transportador de zinco 8), promovendo a apoptose das células β pancreáticas. Esse processo autoimune é precedido por um processo inflamatório crônico nas ilhotas pancreáticas, onde ficam as células que participam do metabolismo de glicose, as quais são atacadas pelos macrófagos, linfócitos T e B e células dendríticas (RAMALHO; NORTADAS, 2021).

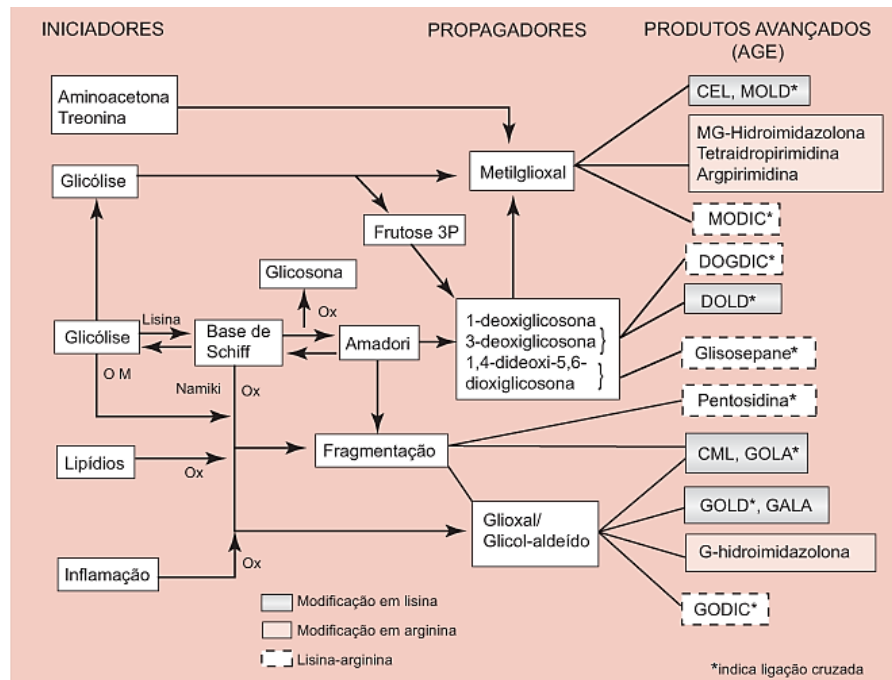
No DM tipo 2 ocorre a resistência à insulina pelas células do fígado e músculos, além de uma deficiência na secreção desse hormônio pelas células β , que se dá principalmente devido a apoptose. Fatores externos também podem levar à disfunção das células pancreáticas, como uma resposta imunológica a estados constantes de hiperglicemia e hiperlipidemia, se agravando nos casos de obesidade. De acordo com estudos recentes, os níveis elevados de ácidos graxos livres no sangue promovem estresse oxidativo, inibindo a abertura dos canais de Ca^{2+} , o que impede a liberação da insulina. Observa-se no DM2 um estímulo aumentado na secreção de glucagon, agravando o aumento de glicose circulante na corrente sanguínea (GALICIA-GARCIA et al, 2020).

A hiperglicemia crônica ocasiona uma alteração no metabolismo não apenas de carboidratos, mas também de proteínas e lipídios. Essa condição pode acarretar em danos celulares e funcionais irreversíveis, com consequente comprometimento das artérias e surgimento de inflamações, afetando gravemente a função endotelial. O principal fator relacionado às complicações vasculares no DM é a formação de AGE's (Advanced Glycated End-Products), ou produtos finais de glicação avançada, que são moléculas mediadoras patogênicas produzidas a partir de reações aminocarbonilo não-enzimáticas (reação de Maillard ou caramelização) (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008; FUHR et al., 2022).

Com o aumento de glicose no sangue pode ocorrer um desvio no processo de glicólise (quebra da glicose formando moléculas de piruvato), levando à via de aldolase-redutase, a qual inicia a síntese de frutose, que culminará na formação de AGES's, ou então um desvio no gliceroldeído-3-fosfato, antes da formação do piruvato, que pode formar os AGE's por

meio do metilglioxal, composto subproduto da glicólise (**Figura 2**). Em indivíduos diabéticos a formação dos produtos de glicação avançada é bem mais elevada quando comparada às pessoas que não possuem esta condição, o que aumenta o risco de desenvolvimento de problemas cardiovasculares, uma morbimortalidade que afeta diretamente a qualidade de vida destes pacientes (KHALID; PETROIANU; ADEM, 2022).

Figura 2. Vias de formação dos produtos de glicação avançada a partir da glicólise.



Fonte: BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA (2008).

O diabetes também é um fator de risco para o desenvolvimento de doença renal. Estima-se que um terço dos indivíduos portadores do DM desenvolverá doença renal diabética, a qual ocorre com maior incidência em pessoas com idade mais avançada e com predisposição a problemas cardiovasculares, como em hipertensos. A incidência de alterações renais em pacientes com diabetes é uma preocupação significativa na prática clínica, sendo esta uma das complicações mais comuns e debilitantes do DM, uma vez que resulta em danos aos pequenos vasos sanguíneos nos rins devido ao controle inadequado da glicose no sangue ao longo do tempo (KEARNEY & GNUDI, 2023).

Esta condição pode progredir para estágios avançados, como a doença renal crônica, e aumenta significativamente o risco de morbidade e mortalidade entre os pacientes diabéticos. Estratégias efetivas de manejo, incluindo controle glicêmico rigoroso, controle da pressão arterial e alterações no estilo de vida, são essenciais para retardar a progressão da nefropatia diabética e mitigar suas complicações devastadoras. O monitoramento regular da função renal

e a detecção precoce de qualquer sinal de comprometimento renal são fundamentais para uma intervenção eficaz e para melhorar os resultados em longo prazo nos pacientes com Diabetes Mellitus (GIOVANNINI; HOWES; EDWARDS, 2016; MUSABAYANE, 2012).

Os níveis séricos de ureia e creatinina são afetados em indivíduos nesta condição, uma vez que estas substâncias, resultantes do metabolismo de proteínas, são liberadas na corrente sanguínea e excretadas pelos rins (KENE et al., 2019). A ureia é gerada a partir da amônia, proveniente do nitrogênio resultante do metabolismo das proteínas, enquanto a creatinina, um ácido nitrogenado, produto final do metabolismo de creatina, que também é produzido nos rins, fígado e pâncreas, é o principal biomarcador da função renal em indivíduos com doença renal crônica e diabetes (INGOGLIA et al., 2021; KASHANI; ROSNER; OSTERMANN, 2020).

O comprometimento hepático em pacientes diabéticos é uma preocupação importante devido à inter-relação complexa entre Diabetes Mellitus e o funcionamento do fígado. Sabe-se que este é o primeiro órgão criticamente afetado no DM, uma vez que participa diretamente da produção dos hormônios que controlam os níveis de glicose. As enzimas transaminase oxalacética (TGO) ou aspartato aminotransferase, e transaminase pirúvica (TGP) ou alanina aminotransferase estão diretamente associadas ao bom funcionamento da função hepática. Em pacientes diabéticos os níveis séricos de TGO e TGP são comumente elevados. Estas enzimas são marcadores específicos de lesão no fígado, e seu aumento está associado à resistência à insulina e ao DM2 (SHIBABAW et al., 2019).

2.2.1 DM tipo 1: aspectos gerais

Diabetes Mellitus tipo 1 tem origem autoimune e é caracterizado pela destruição das células β das ilhotas pancreáticas pelas células T autorreativas, levando a um estado de hiperglicemia frequente. Esta condição costuma levar a uma deficiência irreversível na secreção de insulina, uma vez que o organismo desenvolve anticorpos contra este hormônio e demais enzimas que participam do metabolismo de glicose. Indivíduos com DM 1 precisam administrar insulina para garantir a absorção da glicose e equilibrar a glicemia (KATSAROU et al., 2017).

Alguns dos sinais e sintomas mais frequentes em DM1 incluem poliúria, sede e fome frequentes, perda de peso, fadiga, náusea e vômito. Dentre os fatores de risco associados à incidência deste distúrbio, destacam-se as doenças cardiovasculares e aterosclerose como morbidades, com característica precoce e relevante para o crescente número na taxa de

mortalidade entre diabéticos. O aumento na glicose sanguínea em indivíduos com DM1 representa um risco mais elevado de problemas cardiovasculares, quando comparado a portadores de DM2, principalmente se estiver associado ao comprometimento renal, inflamações ou dislipidemias (SCHOFIELD; HO; SORAN, 2019).

Em nível mundial, no ano de 2021 aproximadamente 6,9 milhões de pessoas com menos de 20 anos foram diagnosticadas com DM1. Estima-se que a prevalência deste tipo esteja aumentando em cerca de 3% ao ano em todo o mundo. No Brasil, 5º país em incidência de DM, mais de 60 mil jovens menores de 18 anos foram diagnosticados com DM1 desde 2021, o que representa uma prevalência de 0,5% nesta faixa etária (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2022).

Diabetes do tipo 1 representa um problema recorrente de saúde pública, uma vez que pode levar a danos permanentes, como cegueira, insuficiência renal e problemas cardiovasculares. A adoção de hábitos saudáveis de vida, com uma dieta balanceada e a prática regular de atividade física, continuam sendo estratégias recomendadas para amenizar os efeitos da doença, que requer tratamento para toda a vida (BRASIL, 2020).

2.2.2 DM tipo 2: aspectos gerais

Cerca de 1 em cada 11 pessoas no mundo sofre de Diabetes Mellitus, um quadro que vem aumentando nas últimas décadas, sendo esta a 9ª principal causa de morte entre indivíduos jovens e adultos. O DM2 acomete 90% da população mundial. É uma doença que está associada à predisposição genética, no entanto, os fatores ambientais e comportamentais estão diretamente relacionados à incidência da doença. Dietas ricas em carboidratos simples e gordura saturada, consumo excessivo de álcool e alimentos industrializados, sobrepeso e obesidade, além do estilo de vida sedentário são fatores determinantes para o diagnóstico precoce, sendo os problemas cardiovasculares a principal causa de morbimortalidade no paciente diabético tipo 2 (ZHENG; LEY; HU, 2018).

O DM2 ocorre quando não há armazenamento e uso adequados da insulina produzida pelo pâncreas, o que leva ao aumento de glicose na corrente sanguínea. A disfunção das células β pancreáticas, bem como o comprometimento do fígado, que desregula a função natural de armazenamento de glicose são os principais mecanismos da patogênese deste tipo de diabetes (CARE, 2022). Dentre os principais agravos de diabetes tipo 2 destacam-se a recorrência de infecções, como nas vias urinárias e de pele, alterações na visão e dificuldade de cicatrização em feridas, principalmente nos pés e pernas. O DM2 pode ser tratado com

medicamentos hipoglicemiantes orais, que controlam o excesso de glicose sanguínea, e não depende do uso de insulina (BRASIL, 2020).

De acordo com a International Diabetes Federation (2022) cerca de 463 milhões de pessoas em todo o mundo vivem com diabetes, sendo que mais de 90% delas têm diabetes tipo 2 diagnosticada. No Brasil, a incidência dessa doença crônica varia de acordo com a região e o grupo socioeconômico em que o indivíduo se encontra. A região Nordeste apresenta a maior prevalência de diabetes do país, com uma taxa de 8,9%. Entre os grupos socioeconômicos, a prevalência de diabetes 2 é maior entre aqueles com menor escolaridade e menor renda. Tudo isso pode estar associado à falta de acesso à alimentação adequada e falta de orientação de prevenção em saúde (FLORENCIO et al., 2021).

De Pinho et al. (2015), destacam que indivíduos com diabetes tipo 2 apresentam maior risco de desenvolverem alterações lipídicas, quando relacionados aos portadores do tipo 1 da doença. A resistência à insulina afeta o metabolismo de lipoproteínas no sangue, elevando o colesterol LDL e triglicérides, e reduzindo o HDL. Pode ocorrer ainda, que em indivíduos que não são diabéticos, porém que tenham predisposição a desenvolver a doença e também níveis de lipídios alterados, o diabetes se manifeste como uma consequência desta alteração metabólica. Pacientes que tem a glicemia descontrolada ou que não fazem intervenção medicamentosa são os mais afetados por estes problemas séricos. Portanto, o controle do diabetes é necessário não apenas garantir a qualidade de vida do paciente, mas também para evitar problemas cardiovasculares (SHAHWAN et al., 2019).

2.2.3 Diabetes Gestacional: aspectos gerais

Durante a gestação ocorrem alterações hormonais e metabólicas, necessárias para suprir demandas no crescimento e desenvolvimento fetal. Tais alterações, quando associadas a fatores como deficiência das células β pancreáticas e resistência à insulina, podem levar à incidência de Diabetes Mellitus gestacional (DMG), um quadro de hiperglicemia na gestante que aumenta o risco de complicações na gravidez, afetando mãe e feto. Dentre as complicações mais comuns estão o parto prematuro, pré-eclâmpsia, hipoglicemia no recém-nascido e risco de obesidade tardia para a criança. Além disto, o efeito na mãe pode ser irreversível, fazendo com que ela desenvolva um quadro de DM para toda a vida (LENDE; RIJHSINGHANI, 2020).

A prevalência de DMG no Brasil varia entre 1 a 14%, e pode afetar diferentes faixas etárias e classes sociais. No entanto, dentre os fatores de risco para que a mulher desenvolva

essa doença, os mais importantes são sobrepeso ou obesidade da mãe, idade avançada, síndrome do ovário policístico, uso de determinados medicamentos ou agentes químicos, histórico familiar e crescimento fetal excessivo. O tratamento de DM em gestantes inclui mudanças na alimentação e a prática de atividade física adequada, além de acompanhamento constante dos níveis de glicose sanguínea na mãe. Em alguns casos, a administração de insulina pode ser necessária (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2020).

2.3 Tratamento do Diabetes Mellitus

Alimentação adequada, com dieta equilibrada e reduzida em carboidratos simples, bem como a prática de atividades físicas regulares, são imprescindíveis para o controle do DM. Tais medidas são consideradas fundamentais no tratamento de todos os tipos de diabetes, em alguns casos controlando a glicemia de maneira eficiente. No entanto, quando não é possível controlar a DM apenas com uma mudança no estilo de vida, a intervenção medicamentosa deve ser iniciada, de acordo com cada caso (MARÍN-PEÑALVER et al., 2016).

2.3.1 Terapia medicamentosa no Diabetes Mellitus

A terapia farmacológica no Diabetes Mellitus consiste na reposição de insulina na maioria dos casos de DM1, ou na utilização de fármacos hipoglicemiantes orais no DM2. No DM1, por serem insulino-dependentes, os pacientes precisam fazer uso do hormônio para captar a glicose do sangue. É realizada a administração de insulina exógena, sempre que possível fazendo o controle da ingestão de carboidratos e verificação da glicemia. A insulina recombinada, produzida pela indústria farmacêutica, utiliza o gene humano codificado com o de uma bactéria, e é administrada por via subcutânea, que posteriormente se liga aos receptores específicos da membrana celular, passando inicialmente pelo fígado, assim como a insulina endógena. Em indivíduos portadores de DM1 o uso de insulina injetável é a maneira mais efetiva de controlar a glicose no sangue, ocasionando, no entanto, alguns desconfortos para quem necessita de insulino-terapia, a qual em alguns casos requer administração várias vezes ao dia (KATSAROU et al., 2017; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2022).

No DM2, dentre os fármacos secretagogos estimulantes de insulina mais utilizados para o controle da glicemia, destacam-se a sulfonilureia e metiglinida, que agem se ligando a um

receptor no canal de potássio nas células β , promovendo o aumento da liberação de insulina pelas ilhotas pancreáticas. Nesta classe de compostos os mais relevantes são tolbutamida, clorpropamida, tolazamida e acetohexamida, que fazem parte da 1ª geração, e glibenclamida, glipizida e glimepirida, da 2ª geração, a qual foi desenvolvida para promover uma liberação mais rápida e eficaz de insulina. Apesar de apresentarem ação satisfatória no controle da hiperglicemia, estes compostos podem acarretar efeitos colaterais relevantes, como hipoglicemia grave, tontura, confusão mental, problemas gastrointestinais e ganho de peso (HALL; BANERJEE; MCGUIRE, 2011; PADHI et al., 2020).

Os fármacos hipoglicemiantes a base de biguanidas atuam reduzindo tanto a liberação de glicose pelo fígado quanto à absorção de glicose no lúmen intestinal, diferente dos secretagogos, que agem diretamente na secreção de insulina. Metformina é considerado o mais seguro desta classe, sendo um dos hipoglicemiantes orais mais prescrito para o paciente diabético tipo 2. Dentre as vantagens de se utilizar esse fármaco, destacam-se seus efeitos hipolipemiantes, com redução do triglicérido e do colesterol, além de não provocar ganho de peso e nem picos de hipoglicemia. No entanto, alguns de seus raros efeitos adversos podem incluir reações gastrointestinais como vômito, diarreia e náuseas, e seu uso a longo prazo pode interferir na absorção de vitamina B12. A metformina apresenta, ainda, maior segurança em longo prazo ao ser utilizada para prevenir o DM2 (PADHI et al., 2020; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2022).

A enzima α -glicosidase, que está presente nas microvilosidades do intestino delgado, atua no organismo promovendo a absorção da glicose pós-prandial pelo intestino, a partir da quebra do amido em monossacarídeos. Os fármacos inibidores da α -glicosidase retardam a absorção dos açúcares provenientes da alimentação, diminuindo os picos de hiperglicemia, sendo considerados compostos promissores para o controle do DM2. Dentre estes se destacam a acarbose e o miglitol, que são indicados para o tratamento da doença (ANDRADE-CETTO; BECERRA-JIMÉNEZ; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, 2008).

Além destes, muitos estudos vêm sendo realizados para comprovar a inibição da α -glicosidase a partir de compostos presentes em plantas utilizadas na medicina tradicional para tratar o diabetes (ANDRADE-CETTO; BECERRA-JIMÉNEZ; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, 2008; MELO; CARVALHO, 2006).

2.3.2 Uso de plantas medicinais para o controle do Diabetes Mellitus e das alterações metabólicas associadas ao comprometimento renal e hepático

As plantas apresentam em sua composição química compostos bioativos com ação terapêutica para diversos tipos de patologias. Os compostos de plantas podem ser usados como base para a produção de medicamentos sintéticos. Vários distúrbios metabólicos são tratados com medicamentos produzidos a partir de plantas medicinais, considerando seu uso pelas comunidades tradicionais. Plantas apresentam como vantagem a baixa incidência de reações adversas ou toxicidade, além do baixo custo quando comparadas ao uso de medicamentos comerciais (NYAKUDYA et al., 2020).

O uso de plantas medicinais na terapêutica necessita de validação científica para comprovar sua ação farmacológica e possíveis efeitos colaterais. Ainda assim é popular entre povos tradicionais e comunidades que não têm acesso facilitado a programas de saúde (VARGAS-ARANA; RENGIFO-SALGADO; SIMIRGIOTIS, 2023). Devido ao aumento na incidência de DM no mundo, a variedade de produtos antidiabéticos ofertados no mercado vem crescendo anualmente com a descoberta de novas drogas. Os constituintes das plantas com efeito hipoglicemiante costumam ser alcaloides, flavonoides, saponinas, carotenoides, terpenoides, entre outros, os quais estão presentes em extratos e óleos essenciais (SALEHI et al., 2019).

Os compostos bioativos isolados de plantas por vezes apresentaram melhor efeito hipoglicemiante que as drogas comerciais comumente utilizadas. A ação eficaz dos compostos químicos naturais está relacionada principalmente à inibição de absorção de glicose, com a melhora da função pancreática devido ao aumento na produção de insulina pelo órgão. Existe uma variedade de plantas com atividade antidiabética relatadas na literatura, que demonstram capacidade de reduzir a incidência de complicações do DM no organismo, bem como melhorar disfunções no metabolismo (MALVIYA; JAIN; MALVIYA, 2010).

Estudos recentes mostraram a atividade antidiabética de plantas, as quais apresentaram diferentes tipos de compostos bioativos, como alcalóides, glicosídeos, polissacarídeos, peptidoglicanos, hipoglicina, guanidina, esteróides, carboidratos, glicopeptídeos, terpenóides, aminoácidos e íons inorgânicos, com atividade hipoglicemiante comprovada. Espécies como a graviola (*Annona muricata*), que reduziu o estresse oxidativo das células β pancreáticas de ratos diabéticos, cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), usado principalmente em países africanos para o tratamento de DM, alho (*Allium sativum*), cujos compostos aumentam a secreção de insulina, babosa (*Aloe vera*), cuja mucilagem tem propriedades que reduzem a glicemia, assim como no extrato das folhas, canela (*Cinnamon zeylaniucm*), cuja substância cinamaldeído tem efeito insulínico, e a estévia (*Stevia rebaudiana*), que apresenta o

composto esteviosídeo, o qual exerceu ação hipoglicemiante, insulinoatrópicas e glucagonostáticas em pesquisa *in vivo* (MATALQAH; AL-TAWALBEH, 2019).

A estévia (*Stevia rebaudiana*), planta da família Asteraceae, apresentou efeitos positivos em doenças crônico-degenerativas, como diabetes e hipertensão, além de efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anticancerígeno. Esses resultados estão associados aos extratos das folhas desta planta, que contêm metabólitos secundários, como polifenóis e glicosídeos de esteviol, responsáveis pelo sabor adocicado das folhas. Estudos mostraram que extratos de estévia possuem ação hipoglicemiante. O extrato aquoso da planta estimulou a secreção de insulina, agindo diretamente nas células β do pâncreas (IATRIDIS et al., 2022; PUTNIK, 2020).

Além de atuar no controle da hiperglicemia, algumas plantas podem atuar positivamente nos sintomas e complicações do DM, por meio de um composto isolado ou mesmo de uma ação combinada de seus compostos biologicamente ativos. Plantas como a espécie *Phyllanthus niruri*, que além de reduzir os níveis de glicose sérica também melhorou a função renal, com ação de regeneração celular e melhora no estresse oxidativo dos rins de ratos diabéticos. Outra planta, *Piper longum*, atuou como agente antidiabético em ratos induzidos. O mesmo estudo apontou uma ação protetora do extrato aquoso da raiz da planta nos rins e fígado dos animais, reduzindo a atividade das enzimas marcadoras da função hepática e renal (SALEHI et al., 2019).

Neste contexto, plantas medicinais com atividade nefroprotetora apresentam compostos bioativos com propriedades benéficas para a saúde renal, ajudando a proteger os rins contra danos e melhorar sua função. A ação dos extratos brutos de algumas espécies pode exercer impacto positivo nos rins, como demonstra um estudo de Namjoo et al. (2013), que utilizaram o extrato hidroalcoólico de *Melissa officinalis* em camundongos balb/C. No estudo observou-se que, na concentração maior do extrato, houve dano no tecido hepático dos animais. Logo, a dosagem e forma de utilização devem ser consideradas sempre ao se fazer o uso de plantas no tratamento de doenças.

2.4 *Lippia dulcis* Trev.

A família Verbenaceae abrange mais de 32 gêneros de plantas, com aproximadamente 800 espécies aceitas atualmente (CARDOSO et al., 2021). Plantas do gênero *Lippia* são muito utilizadas em continentes como América Central e África Tropical como remédio, alimento, aromatizante e adoçante. Estas espécies têm largo histórico de uso em várias aplicações

medicinais tradicionais, muitas das quais já foram comprovadas cientificamente (OKHALE et al, 2016). A maioria das espécies é aromática e os estudos sobre a química deste gênero estão principalmente relacionados com a composição dos óleos essenciais. Uma característica marcante de *Lippia* é a diferença observada na composição do óleo essencial relatada para uma mesma espécie de diferentes origens geográficas (CATALAN; DE LAMPASONA, 2002).

Lippia dulcis Trev. (**Figura 3**) é uma planta intensamente doce da família Verbenaceae, amplamente distribuída na América Tropical, com ocorrência desde o centro do México até a Colômbia e o norte da Venezuela, bem como Cuba e República Dominicana. É conhecida como o adoçante natural do México, ou erva doce asteca, e possui diversos usos medicinais, principalmente para tratar síndromes respiratórias, como tosse, bronquite e resfriados, como bactericida, anti-inflamatório e antiespasmódico, e para tratar problemas gastrointestinais (COMPADRE; ROBBINS; KINGHORN, 1986; GRANADOS-DIESELDORFF et al., 2013).

De acordo com Castillo et al. (2024), plantas da família Verbenaceae são conhecidas e utilizadas tradicionalmente para tratar problemas gastrointestinais, devido aos seus compostos secundários de importante atividade biológica, como os compostos fenólicos presentes em seus óleos essenciais. As decocções e infusões utilizando folhas e flores de *L. dulcis* são empregadas em países da América Latina, no tratamento de diarreias, disenterias e indigestão (PASCUAL et al., 2001; CASTILLO et al., 2024).

O gênero *Lippia* faz parte do gênero *Phyla*, por isso essa planta também é conhecida como *Phyla dulcis* (CALVACHE; VILLOTA; TOVAR, 2010; GRANADOS-DIESELDORFF et al., 2013), ou mesmo como *Phyla Scaberrima*, conforme visto em estudos mais recentes (VILLA-HUANO et al., 2021).

Figura 3. *Lippia dulcis* Trev



Fonte: Acervo pessoal (2023).

Na Amazônia brasileira, é conhecida popularmente como capim-doce ou estévia, em virtude do sabor extremamente doce das folhas e flores. Nas feiras de Santarém/PA, suas mudas são comercializadas também com o nome de hortelã-doce (**Figura 4**), sendo indicada pelos populares para controlar os sintomas de diabetes e como sedativo, em forma de decocção e infusões, (BAQUEIRO-PEÑA; GUERRERO-BELTRÁN, 2014; MESQUITA GERMANO et al., 2022).

Figura 4. Mudas de *L. dulcis* comercializadas em uma feira popular na cidade de Santarém/PA.



Fonte: Autora (2023)

Alguns dos principais quimiotipos presentes no óleo essencial de *Lippia dulcis* Trev. relatados na literatura são monoterpenos: cânfora, canfeno, limoneno, terpinoleno, α -pineno, lippiol; e sesquiterpenos: (+)-hernandulcina, biciclogermacreno, α -copaneno, β -cariofileno, δ -cadineno, (E)- β -farneseno, (OKHALE et al, 2016; MESQUITA GERMANO et al., 2022) e α -bisabolol, molécula responsável pela síntese da hernandulcina na planta (ATTIA; KIM; RO, 2012).

Os terpenóides são substâncias que agem como linha de frente na defesa das plantas contra patógenos, e são amplamente utilizados como cosméticos, aromatizantes, medicamentos e substitutos para combustível. São ainda importantes substitutos para o açúcar (diterpenóides e triterpenóides), sendo adoçantes naturais dominantes (ATTIA; KIM; RO, 2012). Em *L. dulcis*, destaca-se a hernandulcina, que é um componente volátil de seu óleo essencial, e é um sesquiterpeno bisabolano que faz parte de uma nova classe de adoçantes intensos não tóxicos, não mutagênicos, não calóricos e não cariogênico, considerada como sendo 1.000 a 1.500 vezes mais doce do que a sacarose. Foi o primeiro sesquiterpenóide de

sabor intensamente adocicado conhecido na planta, com estrutura 6-(1,5-dimetil-1-hidroxihex-4-enil)-3-metilciclohex-2-enona, e é um constituinte que representa apenas 0,004% p/p (porcentagem em peso por peso) da erva seca (COMPADRE; ROBBINS; KINGHORN, 1986; YANG et al., 1999; DE OLIVEIRA et al., 2012).

Nesta planta, destaca-se ainda a atividade farmacológica dos sesquiterpenos β -cariofileno, para o qual estudos apontaram atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, nefroprotetora, cardioprotetora e neuroprotetora, além de apresentar promissora ação antidiabética em ratos (ROCHA et al., 2022), e do α -bisabolol que apresentou redução na resistência à insulina, intolerância à glicose, além de redução na gordura do fígado, conforme demonstram estudos utilizando extrato de plantas ricas neste sesquiterpeno (RAMAZANI et al., 2022).

Outros fitoquímicos secundários de plantas como alcaloides, compostos fenólicos e flavonóides, têm demonstrado grande relevância por sua atividade terapêutica sobre várias doenças, incluindo processos inflamatórios e síndromes metabólicas, dentre elas o DM. Estes compostos, quando presentes em quantidade significativa na planta, a torna uma espécie com propriedades medicinais, com potencial para a indústria farmacêutica (AJIBOYE et al., 2023). Compostos fenólicos são encontrados em grande quantidade em plantas do gênero *Lippia* (Verbenaceae), tornando estas espécies amplamente utilizadas na medicina tradicional (TREVISAN et al., 2016). Em *Lippia dulcis* já foi descrita a presença de polifenóis, com destaque para o fenilpropanóide isoverbascosídeo, a quercetina e seu isômero 6-hidroxiluteolina (FURANI et al., 2012), e o verbascosídeo, que demonstrou *in silico* o potencial antidiabético da planta (RITTER RUAS et al., 2023).

Adicionalmente, plantas ricas em compostos fenólicos oferecem uma valiosa fonte de antioxidantes, podendo ser incorporadas na alimentação, ou aplicadas de várias maneiras para prevenir ou tratar doenças (KABACH et al., 2023). Flavonoides, cumarinas e alcaloides são relatados na literatura como sendo responsáveis pelo efeito hipoglicemiante de extratos de plantas medicinais. Estes compostos podem afetar o metabolismo da glicose, impactando positivamente na redução da absorção de açúcares no intestino, ativando a liberação de insulina pelas células β , controlando a liberação de glicose hepática, acionando os receptores de insulina para absorção da glicose pelos tecidos que respondem à insulina e controlando a produção de glicose pelo fígado (RAMADAN; SCHAALAN; TOLBA, 2017).

Pesquisas com produtos vegetais têm como objetivo identificar os compostos bioativos das plantas, ampliando o conhecimento sobre sua atividade farmacológica. A prospecção fitoquímica de plantas medicinais visa conhecer sua aplicação na medicina. Em virtude do uso

doméstico indiscriminado de ervas, principalmente sob a forma de decocção e infusão, ocorre que muitas vezes não há informação sobre os compostos químicos da planta, os quais podem causar efeitos adversos ou mesmo serem administrado para fins que não condizem com o potencial farmacológico de seus princípios ativos (FERREIRA et al., 2020).

2.5 Fármacos utilizados para indução do DM experimental

Estudos *in vivo* representam um papel importante na investigação e validação de tratamentos para o Diabetes Mellitus. Em modelos experimentais que propõem investigar a atividade hipoglicemiante de uma planta ou substância, a indução do DM pode ocorrer utilizando-se compostos químicos que atuam diretamente nas células β das ilhotas pancreáticas, inviabilizando a produção de insulina. A aloxana (ALX) e a estreptozotocina (STZ) são atualmente os fármacos mais utilizados para indução de DM1 e DM2 em animais, e as dosagens dependem da espécie, do estado nutricional em que o animal se encontra e da via de administração da droga (RODRIGUES et al., 2021; PANSARE et al., 2021).

A estreptozotocina (STZ) é uma substância antibiótica e quimioterápica de classe alquilante, com característica diabetogênica. Ela inibe a secreção de insulina levando a um estado insulino-dependente irreversível (LENZEN, 2008). Este fármaco age nas células β , a partir de um receptor GLUT-2, causando toxicidade celular e em órgãos como fígado, rins e intestino. A administração de STZ afeta o metabolismo de glicose nos animais, inibindo a produção de insulina, causando uma deficiência grave. A introdução do grupo alquil no DNA das células β provoca apoptose por perda de Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo (NAD), uma co-enzima celular que participa da produção energética. Cerca de 2h após a administração de STZ o animal já pode apresentar hiperglicemia avançada, evoluindo até atingir a deficiência total de insulina no organismo (LENZEN, 2008; GHASEMI; KHALIFI; JEDI, 2014).

A aloxana (ALX) é um derivado hidrofílico da piridina, sendo o análogo da glicose mais utilizado em modelos experimentais. Por apresentar estrutura semelhante à da glicose consegue aderir às células β também por meio de um transportador GLUT-2, onde desencadeia o processo diabetogênico. Esse processo pode ocorrer por duas vias: a inibição da glucoquinase, enzima atuante na fosforilação da glicose para glicose-6-fosfato, o que impede o fluxo normal do metabolismo de glicose, ou mesmo pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (RODRIGUES et al., 2021), que são moléculas reativas que provocam danos teciduais (SILVA; GONÇALVES, 2010). No pâncreas dos animais, após a administração da

ALX em doses de acordo com a espécie, a produção de insulina acaba sendo prejudicada com a necrose das células β , levando ao estado de hiperglicemia (PANSARE et al., 2021).

Fármacos diabetogênicos como STZ e ALX causam a apoptose das células β pancreáticas de maneira muito rápida, daí a vantagem de se utilizar em modelos experimentais, onde é possível alcançar hiperglicemia irreversível em até 72h após a administração (GAO et al., 2021). Muitos estudos utilizam a STZ para induzir o diabetes em animais em virtude da baixa toxicidade desse fármaco, além da estabilidade da molécula quando comparada à ALX, uma vez que esta costuma se degradar facilmente, sob influência da luz e da temperatura do ambiente (LENZEN, 2008). Entretanto, alguns estudos relatam desvantagens ao utilizar STZ, como aumento da sensibilidade à dor periférica nos animais (RODRIGUES et al., 2021).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a ação hipoglicemiante do Extrato Etanólico das partes aéreas de *Lippia dulcis* Trev. (EELD) em ratos machos da linhagem *Wistar* induzidos ao Diabetes Mellitus 2.

3.2. Específicos

- Avaliar o impacto de duas concentrações do EELD (100 mg/Kg e 500 mg/Kg) na glicemia em jejum dos animais, durante 21 dias de tratamento;
- Analisar a toxicidade oral aguda do EELD em ratos fêmeas da linhagem *Wistar*;
- Determinar a composição fitoquímica do extrato;
- Avaliar os efeitos do EELD nos níveis séricos de ureia, creatinina, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) dos animais diabéticos.

4. JUSTIFICATIVA

Seja para alimentação ou a fim de tratar sintomas de diferentes patologias, o uso empírico das plantas faz parte da cultura de um povo, sendo um conhecimento passado de geração em geração. Na região Norte do Brasil a influência da cultura indígena mantém vivo o uso tradicional de plantas medicinais, fazendo com que grande parte da população, em alguma fase da vida, ainda recorra a emplastos, infusões e decocções, por exemplo. Quando se trata de finalidade medicinal, os recursos vegetais são por vezes a primeira opção utilizada como alternativa para a cura, prevenção e para amenizar os sintomas de doenças.

Na saúde pública, o aumento nos casos de Diabetes Mellitus adquirida (DM2), principalmente relacionado aos maus hábitos alimentares e à falta de acesso a uma educação nutricional de qualidade, tem mobilizado a indústria farmacêutica para a descoberta de novos medicamentos. No entanto, ainda que representem uma opção eficaz para controlar os níveis de glicose sanguínea, as formulações químicas disponíveis no mercado apresentam algumas desvantagens ao paciente, como efeitos colaterais indesejáveis, meia-vida curta, o que requer administração frequente da droga, além de causar um impacto financeiro, uma vez que o indivíduo dependerá destes remédios ao longo de sua vida. Esta última condição pode inclusive afetar a adesão do paciente à terapia medicamentosa, pois o custo de tais medicações, muitas vezes associado a outros problemas de saúde que também requerem tratamento medicamentoso, se torna inviável para as famílias.

Em virtude disso a população vê nas plantas uma alternativa terapêutica, seja para controlar a doença, ou mesmo para amenizar seus sintomas. A busca por plantas com alguma propriedade de cura, seja ela comprovada ou não, ainda é frequente nas feiras populares da cidade. Mudas de *Lippia dulcis*, comercializada com o nome de capim-doce ou hortelã-doce, são indicadas para tratar gripes, tosse e para o controle do DM. Algumas pesquisas têm sido realizadas a fim de conhecer as propriedades farmacológicas dessa planta de folhas e flores adocicadas, como é o caso de um estudo recente de Ritter Ruas et al. (2023) utilizando modelagem molecular (*in silico*). Os pesquisadores conseguiram evidenciar que o verbascosídeo, um glicosídeo que estava presente em grande quantidade na fração etanólica do extrato dessa planta, inibiu a ação da α -glicosidase, enzima responsável pela liberação de glicose no sangue.

Pesquisas dedicadas à descoberta de novas drogas seguras, eficazes e acessíveis, são necessárias. O potencial terapêutico dos compostos químicos de *L. dulcis*, bem como a facilidade de cultivo desta planta na região Amazônica, caracterização fitoquímica e avaliação

do potencial hipoglicemiante *in vivo* do seu extrato etanólico contribuirão para o conhecimento da espécie e seu possível uso medicinal. Portanto, é necessária a validação farmacológica da planta para corroborar com os conhecimentos tradicionais, ou mesmo refutar seu uso, evitando inclusive possíveis casos de intoxicação. Se comprovada atividade redutora de glicemia em ratos, a aplicação dessa planta nas indústrias alimentícia e farmacêutica ganharia grande destaque, contribuindo para o tratamento e controle do Diabetes Mellitus.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no período de julho de 2022 a março de 2024, no Laboratório de Biotecnologia de Plantas Medicinais – LBPM/UFOPA, com a colaboração do Projeto Farmácia Viva/IBEF, e no Biotério da Universidade Estadual do Pará – UEPA.

5.1 Material vegetal

As mudas foram obtidas da EMBRAPA Amazônia Oriental em Belém/PA, identificadas pelo Laboratório de Botânica da EMBRAPA, sob o Registro no IAN nº 203.289. Foram cultivadas no viveiro de plantas medicinais da UFOPA sob os cuidados do Projeto Farmácia Viva - IBEF (**Figura 5**). Para a obtenção do extrato as partes aéreas da planta foram higienizadas em água corrente, e posteriormente secas em estufa de circulação de ar em temperatura constante de 40°C, por 72h. As partes aéreas secas (**Figura 6**) foram então fragmentadas manualmente.

Figura 5. Canteiro de *L. dulcis*



Fonte: Acervo pessoal (2023)

Figura 6. Partes aéreas de *L. dulcis* após secagem



Fonte: Acervo pessoal (2023)

5.2 Obtenção do extrato etanólico de *Lippia dulcis* TREV. (EELD)

A extração foi realizada utilizando equipamento Soxhlet, com 12g de material vegetal seco por vez, utilizando 250mL de etanol a 92,8° INPM (96°GL), por 6 horas. Após a extração o material foi filtrado e evaporado em rotaevaporador à temperatura de 40° C a vácuo, para remoção total do solvente, obtendo-se, então, o extrato etanólico bruto das partes

aéreas de *Lippia dulcis* (EELD), o qual foi armazenado sob refrigeração a 4°C até sua utilização (**Figura 7**).

Figura 7. Etapas de extração do EELD. A) Extração por Soxhlet. B) Evaporação do solvente. C) Extrato etanólico de *L. dulcis* bruto.



Fonte: Acervo pessoal (2023)

5.3 Análise da composição química do EELD

Utilizou-se o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para separação dos compostos presentes no EELD (DE OLIVEIRA et al., 2012). A CLAE foi realizada pela Central Analítica da Universidade de São Paulo (IQ-USP), utilizando um Cromatógrafo modelo Shimadzu Prominence-i LC2030C-3D. Foi injetado um volume de 10 µL da amostra em uma coluna Phenomenex Luna C18 (250x4,6mm-5µm), com temperatura do Forno de 40°C e operando em um comprimento de onda de 254nm. Esta amostra foi preparada utilizando água destilada a 0,04% TFA como solvente A no modo isocrático, e acetonitrila de grau HPLC 0,04% TFA. Os picos obtidos foram analisados com base em seus picos de retenção, e os analitos encontrados foram identificados comparando dados da literatura sobre a composição fitoquímica da planta.

5.4 Animais

O projeto de pesquisa foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFOPA), e aprovado sob o protocolo nº 0820230265/2023. Todos os testes com os animais atenderam às normas de ética em experimentação animal. Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério da Universidade do Estado do Pará - UEPA, localizado na cidade de Santarém/PA. Para avaliação da toxicidade oral aguda do EELD foram utilizados 06 ratos *Wistar* fêmeas com 12

semanas de vida, pesando entre 160g e 200g, nulíparas, não grávidas. Para avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato foram utilizados 20 ratos machos, com 60 ± 10 dias de idade, pesando de 190g a 250g. As gaiolas foram devidamente identificadas por etiquetas, e todos os animais foram mantidos sob temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), com livre acesso à comida e água, recebendo ração balanceada e água *ad-libitum* durante os experimentos. Os animais permaneceram durante os experimentos em gaiolas não individuais, mantidos em 03 ou 02 por gaiolas.

5.5 Protocolo experimental

5.5.1 Teste de Toxicidade Oral Aguda

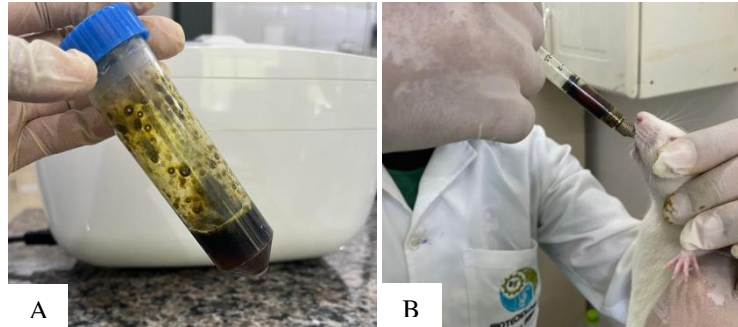
Considerando os trabalhos de Pérez et al. (2005), que administraram os extratos hexânico e etanólico de *Lippia dulcis* Trev. em ratos da linhagem *Wistar*, por via oral nas doses de 50, 100, 200 e 400 mg/Kg, e de Dodoala et al. (2010), que administraram por via oral 02 g/kg do extrato etanólico de *Phyla nodiflora* em ratos machos da linhagem *Wistar*, utilizou-se neste experimento a dose inicial de 2000mg/kg para verificar a toxicidade oral aguda nos animais. Para isso, o EELD bruto foi diluído em solução salina 0,9%, na proporção de 4mL de solução para cada 1g do extrato bruto. Ressalta-se que várias concentrações e solventes diferentes foram testadas para diluir, porém a concentração e o solvente citados foram os que homogeneizaram o extrato bruto com melhor eficácia. A administração das doses se deu por gavagem, respeitando o volume de 1 mL por 100 g de peso do animal (**Figura 8**).

Os animais permaneceram em jejum sólido por 12 horas antes da administração das doses de teste e foram selecionados aleatoriamente para compor os grupos. Utilizou-se 06 ratos *Wistar* fêmeas, 03 para avaliar os efeitos do EELD na dose de 2.000 mg/kg e 03 como grupo controle, o qual recebeu o veículo solução salina 0,9%, totalizando dois grupos experimentais. Os animais tiveram a alimentação sólida reestabelecida 4h após a administração do extrato. O comportamento dos animais foi observado aos 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas e, a partir de então, diariamente, até o 14º dia. Foram observados sinais e sintomas relativos à toxicidade, como alteração no comportamento, sonolência, letargia, alterações dermatológicas, oculares e nas mucosas (OECD 423, 2001).

Após 24h da administração dos tratamentos o sangue destes animais foi coletado para análise hematológica. Os animais tiveram água e ração à vontade até o final do experimento,

tendo seus pesos verificados ao 1º e 14º dias, quando foram eutanasiados por meio de superdosagem dos fármacos anestésicos Xilazina 2% (10 mg/kg) e Cetamina 10% (90 mg/kg) (GUIA DE EUTANÁSIA PARA ANIMAIS DE ENSINO E PESQUISA, 2019).

Figura 8. Toxicidade oral aguda. A) EELD bruto diluído em solução salina 0,9%. B) Administração do EELD 2.000mg/Kg por gavagem em rato Wistar fêmea.



Fonte: Acervo pessoal (2023)

5.5.2 Indução do diabetes experimental e determinação da atividade hipoglicemiante *in vivo*

Neste experimento, a indução do diabetes se deu inicialmente por meio de injeção intraperitoneal de aloxana monohidratada na dose de 150 mg/kg, diluída em solução salina 0,9%, conforme protocolo adotado por Kabach et al. (2023). Para indução do DM2, os animais foram submetidos a jejum sólido por 12h, tendo seu peso e glicemia verificados antes da administração. Por ser um composto que pode sofrer oxidação química na presença de luz, a aloxana foi preparada em uma sala escura, com meia luz, mantida sob baixa temperatura e em frasco âmbar, até o momento da administração nos animais.

A dose inicialmente utilizada neste experimento (150 mg/kg) causou a morte de todos os animais induzidos, a qual foi observada no dia posterior ao experimento. Essa dosagem foi então reduzida para 140 mg/kg do fármaco. Com esta concentração os animais desenvolveram um estado constante de hiperglicemia, observado após 72h da administração do agente diabetogênico, pela verificação dos níveis de glicose sanguínea utilizando aparelho glicosímetro do tipo G-TECH FREE®, a partir do sangue da veia caudal. Os animais que apresentaram glicemia superior à 200 mg/dL foram considerados diabéticos e utilizados nos grupos experimentais (AHMAD & AHMAD, 2018).

5.5.3 Divisão dos Grupos

Os animais foram então divididos em um delineamento inteiramente casualizado, em 04

grupos com 05 indivíduos cada, sendo:

- Grupo I (Controle Negativo) - animais com diabetes induzida pela administração de aloxana e tratados somente com o veículo (solução salina 0,9g NaCl/100 mL água);
- Grupo II (Controle Positivo): animais com diabetes induzida pela administração de aloxana e tratados com o fármaco comercial metformina (500 mg/kg);
- Grupo III (ratos diabéticos + EELD 100 mg/kg/dia): animais com diabetes induzida pela administração de aloxana e tratados apenas com extrato etanólico das partes aéreas de *L. dulcis* na concentração de 100 mg/kg/dia.
- Grupo IV (ratos diabéticos + EELD 500 mg/kg/dia): animais com diabetes induzida pela administração de aloxana e tratados apenas com extrato etanólico das partes aéreas de *L. dulcis* na concentração de 500 mg/kg/dia.

5.5.4 Aplicabilidade dos tratamentos

Os tratamentos administrados em todos os grupos se deram por gavagem, rotineiramente no mesmo horário, por 21 dias. O grupo I recebeu Solução Salina 0,9% (0,9g NaCl/100 mL água) não excedendo 1ml/100g/dia. O fármaco hipoglicemiante usado no Grupo II foi a Metformina, sendo este um dos fármacos mais prescritos para diabéticos tipo 2 (PADHI et al., 2020). A metformina foi manipulada em farmácia de manipulação especializada, sendo disponibilizada em pó e diluída em água destilada para administração nos animais, na concentração de 500 mg/kg/dia (NETO et al., 2013), na proporção de 500 mg para cada 10mL de água destilada.

Os animais dos grupos III e IV foram tratados com o Extrato Etanólico de *Lippia dulcis*. A escolha das concentrações do EELD (100 mg/kg e 500 mg/Kg) se deu em conformidade com a dosagem (mg) dos fármacos comerciais mais prescritos para o tratamento do DM2.

5.5.5 Avaliação da glicemia em jejum e peso corpóreo

A cada 07 dias de tratamento os animais tiveram a glicemia e o peso verificados, após passarem por jejum sólido de 12h. O sangue periférico foi obtido por meio de um corte na cauda dos animais (**Figura 9**). Utilizou-se aparelho glicosímetro G-TECH FREE® para verificar a glicose sanguínea dos ratos, e balança BALMAK ACTLIFE® para o peso.

Figura 9. Rato *Wistar* contido para retirada de sangue da cauda na verificação de glicemia em jejum.



Fonte: Autora (2024)

5.5.6 Avaliação dos Parâmetros bioquímicos nos animais

O protocolo de eutanásia após o período de experimentos foi executado mediante a utilização de anestésico injetável Xilazina 2% (20 mg/mL) associada com Cetamina 10% (100 mg/mL), adotando o seguinte cálculo: $(\text{Peso do camundongo (kg)} \times \text{dose letal (mg/kg)}) / \text{Concentração do fármaco em mg/mL}$. A via de administração foi intraperitoneal. O animal teve morte confirmada ao observar os seguintes aspectos: ausência de movimentos torácicos e sinais de respiração, ausência de batimentos cardíacos, perda da coloração das membranas mucosas por ausência de fluxo sanguíneo, e perda do brilho e umidade das córneas (GUIA BRASILEIRO DE BOAS PRÁTICAS EM EUTANÁSIA EM ANIMAIS, 2012).

Ao final dos 21 dias de tratamento, os animais de todos os grupos ficaram em jejum por 12 horas. Após esse período, foram eutanasiados, tendo seu sangue coletado por punção cardíaca para quantificação dos níveis séricos de ureia, creatinina, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP). Para comparar os parâmetros bioquímicos de ureia, creatinina, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) dos ratos neste experimento, utilizou-se os dados de valores de referência aludidos por Lima et al. (2014) em sua pesquisa com ratos *Wistar* saudáveis (**Tabela 2**). O descarte dos animais, após a verificação da morte, seguiu as normas previstas na legislação em vigor no País.

Tabela 2. Valores de referência para TGP, TGO, ureia e creatinina em ratos *Wistar* machos saudáveis.

Parâmetros (Unid.)	Média ± S.D. (n) Machos	Faixa Machos
TGP / ALT (U/L)	48,4 ± 6,46	36 - 58
TGO / AST (U/L)	131,7 ± 23,09	81 - 180
Ureia (mg/dL)	35,9 ± 3,58	30 - 42
Creatinina (mg/dL)	0,5 ± 0,05	0,44 - 0,64

Fonte: LIMA et al. (2014).

5.6 Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram submetidos a análises estatísticas utilizando os softwares Python e R. Inicialmente, os dados foram testados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, foram aplicadas estatísticas descritivas para todos os dados. ANOVA foi utilizada para verificar se havia diferença entre as médias analisadas. Foi utilizado o método LSD de Fisher para identificar as diferenças para os valores médios de glicemia em jejum e peso dos animais. O teste de Tukey foi empregado com níveis de significância de 5% e 1% para comparar as enzimas creatinina e ureia entre os grupos de animais.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização química do extrato etanólico de partes aéreas secas de *Lippia dulcis* (EELD)

A verificação do perfil cromatográfico do Extrato Etanólico de Partes Aéreas Secas de *Lippia dulcis* Trev. (EELD) foi realizada considerando as fragmentações observadas nos picos cromatográficos, obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (**Figura 10**). Utilizando como base os dados da literatura, quanto à composição fitoquímica da planta, com ênfase no perfil de compostos fenólicos, foi possível identificar flavonoides e fenilpropanóides presentes na amostra, conforme mostra a **Tabela 3**:

Figura 10. Perfil Cromatográfico Representativo do Extrato Etanólico de *Lippia dulcis* Trev.

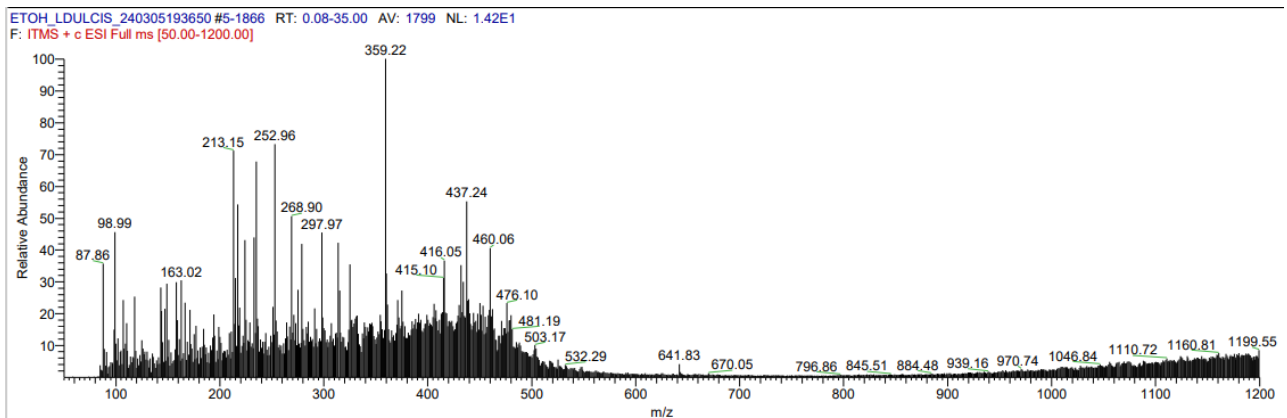


Tabela 3. Compostos fenólicos identificados na amostra do Extrato Etanólico de *Lippia dulcis* Trev., com base na literatura.

FLAVONOIDES				
Nº	<i>m/z</i> *	ID	Identificados	Referência bibliográfica
1	463	$[M-H]^+ / [M-H]^-$	6-Hidroxiluteolina 7-O-hexosídeo	Lin et al. (2007)
2	447	$[M-H]^+ / [M-H]^-$	Escutalareína 7-O-hexosídeo	Lin et al. (2007)
3	447	$[M-H]^+ / [M-H]^-$	Luteolina 7-O-glicosídeo	Lin et al. (2007)
4	447	$[M-H]^+ / [M-H]^-$	6-Hidroxiluteolina 7-O-ramnosídeo	Lin et al. (2007)
5	301	$[M-H]^-$	6-Hidroxiluteolina	Lin et al. (2007)
6	451	$[M-H]^+ / [M-H]^-$	3-Hidroxifloretina 60 -O-hexosídeo	Lin et al. (2007)
7	431	$[M-H]^+ / [M-H]^-$	Apigenina 7-O-glicosídeo	Lin et al.

				(2007)
8	435	$[M-H]^+ / [M-H]^-$	Floridzina	Lin et al. (2007)
9	285	$[M-H]^-$	Esculareína	Lin et al. (2007)
10	285	$[M-H]^-$	Luteolina	Lin et al. (2007)
11	301	$[M-H]^-$	Quercetina	Lin et al. (2007)
12	271	$[M-H]^+ / [M-H]^-$	Naringenina	Lin et al. (2007); Trevisan et al. (2015)
13	299	$[M-H]^+ / [M-H]^-$	6-Metilescutelareína	Lin et al. (2007)
14	285	$[M-H]^-$	Sakuranetina	Lin et al. (2007)
15	255	$[M-H]^-$	Pinocembrina	Lin et al. (2007)
16	269	$[M-H]^+ / [M-H]^-$	Galangina	Lin et al. (2007)
17	283	$[M-H]^+ / [M-H]^-$	Metilgalangina	Lin et al. (2007)
18	285	$[M-H]^-$	Luteolina	Trevisan et al. (2015)
19	345	$[M-H]^-$	5,7,3',4'-Tetrahydroxi-3,6-dimetoxi flavona (Espinacetina)	Trevisan et al. (2015)
20	269	$[M-H]^-$	Apigenina	Trevisan et al. (2015)
21	299	$[M-H]^-$	6-Metoxi apigenina (Hispidulina)	Trevisan et al. (2015)
22	359	$[M-H]^-$	5,7,3'-Trihidroxi-3,6,4'-trimetóxi flavona	Trevisan et al. (2015)
23	329	$[M-H]^-$	5,7,4'-Trihidroxi-3,6-dimetoxi flavona	Trevisan et al. (2015)
24	285	$[M-H]^-$	Naringenina-4'-éter metílico	Trevisan et al. (2015)
25	343	$[M-H]^-$	5,7-Diidroxi-3,6,4'-trimetoxi flavona (Santin)	Trevisan et al. (2015)
26	327	$[M-H]^-$	5-Hidroxi-3,7,4'-trimetoxi flavona	Trevisan et al. (2015)
FENILPROPANÓIDES				
27	623	$[M-H]^-$	Verbascosídeo	Funari et al. (2012)
28	623	$[M-H]^-$	Isoacteosídeo	Trevisan et al. (2015)

*m/z - etapa em que ocorreu a separação dos íons de acordo com a relação massa/carga.

Nesta pesquisa foi utilizada CLAE para separar os compostos da amostra de EELD. Este método permite separar analitos de diferentes matrizes e polaridades, o que o torna versátil na quantificação de princípios ativos em plantas (GOMES; SANTOS; FARIA, 2020). Na biotecnologia, as plantas e seus metabólitos têm se tornado cada vez mais objetos de estudo por suas atividades biológicas. Os mecanismos de sua influência, seu potencial para diminuir os níveis de glicose sanguínea e controlar o Diabetes Mellitus, as tornam importantes opções para o desenvolvimento de novos medicamentos. Além disso, a utilização combinada de extratos de plantas ou de seus compostos pode resultar em efeitos sinérgicos, potencializando sua eficácia no tratamento de diversas doenças e seus agravos. Flavonóides, catequina, flavona, fenilpropanóides e metabólitos cumarínicos são compostos que demonstram grande impacto no controle do DM (BAHMANI et al., 2014).

Os analitos predominantemente observados no EELD, após comparação com a literatura, pertencem à classe de compostos químicos fenólicos. Esses compostos naturais representam uma poderosa arma contra o estresse oxidativo, já que demonstram uma notável eficiência na remoção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Quando há um desequilíbrio entre a produção de ERO e a atividade das proteínas antioxidantes, ocorre um estado constante de estresse oxidativo. Esse estresse impacta as proteínas, os lipídios e os ácidos nucleicos, causando danos à estrutura e às funções celulares do organismo. Além disso, a formação de AGE (produtos finais de glicação avançada) agrava o quadro evolutivo do DM, provocando um aumento na formação de ERO e, conseqüentemente, um quadro inflamatório crônico no paciente. Essas desordens contribuem para o surgimento das complicações no DM, como retinopatia, cardiopatia, neuropatia e problemas hepáticos (KABACH et al., 2023, RODRIGUES et al., 2021).

As pesquisas científicas utilizando flavonoides receberam um incentivo a mais com a descoberta do seu potencial terapêutico com ênfase para baixa taxa de mortalidade cardiovascular e também da prevenção de problemas do coração. Tais benefícios à saúde são atribuídos às propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-mutagênicas e anticancerígenas dos destes compostos, juntamente com sua capacidade de regular a atividade das principais enzimas celulares. Conseqüentemente, os flavonoides têm sido reconhecidos como elementos essenciais em uma diversidade de usos que abrangem desde produtos nutracêuticos e farmacêuticos (KUBICA et al., 2020).

Os fenilpropanóides, como o verbascosídeo e o isoacteosídeo presentes no EELD, são ácidos fenólicos com ampla distribuição em vegetais. Eles pertencem ao maior grupo de metabólitos secundários produzidos por plantas, sendo sintetizados nos vegetais em resposta a

estresses bióticos ou abióticos. Apresentam atividade biológica variada, incluindo atividade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana, antidiabética, hepatoprotetora e nefroprotetora (NEELAM; KHATKAR; SHARMA, 2020).

Um estudo de Ávila-Reyes et al. (2017) determinou os perfis fenólicos foliares e a atividade antioxidante de 10 espécies de plantas da Família Verbenaceae, a fim de contribuir para o desenvolvimento de quimiomarcadores específicos desta Família. As plantas analisadas apresentaram importantes compostos fenólicos antioxidantes, como a quercetina, luteolina 7-O-glicosídeo, apigenina 7-O-glicosídeo e esclareína. Além disso, estudos do perfil fitoquímico de plantas do gênero *Lippia* demonstram que algumas espécies como a *Lippia citriodora* são importantes fontes do fenilpropanóides verbascosídeo, composto que apresenta propriedades antioxidantes, antimicrobianas, imunossupressoras e antitumorais, o que demonstra a importância medicinal das plantas do gênero (OMBITO et al., 2014).

6.2 Toxicidade oral aguda do EELD

Os pesos inicial e final dos animais de cada grupo estão apresentados na **Tabela 4**. No segundo dia de experimentos ocorreu a morte de um dos animais do grupo controle (Controle III), após a administração da dose anestésica (Xilazina 2% e Cetamina 10%) para retirada do sangue para realização do exame hemograma, logo, não foi possível coletar o sangue deste para análise. Todos os animais apresentaram ganho ponderal, conforme indica a tabela abaixo.

Tabela 4. Peso inicial e final dos animais (Toxicidade Oral Aguda do EELD).

	Grupo Controle (DIA 01)	Grupo Controle (DIA 14)	Grupo 2.000mg/kg EELD (DIA 01)	Grupo 2.000mg/kg EELD (DIA 14)
Animal I (A1)	172 g	198 g	168 g	200 g
Animal II (A2)	175 g	205 g	157 g	188 g
Animal III (A3)	163 g	189 g	165 g	198 g

Fonte: Autora (2023).

Durante os 14 dias de observação, após administração dos tratamentos, não foi observada alteração comportamental nos animais de nenhum dos grupos. Os animais que receberam a concentração de 2.000 mg/kg do extrato etanólico de *Lippia dulcis* não exibiram quaisquer sinais clínicos ou físicos de inflamações e/ou infecções, assim como ocorreu com os animais do grupo controle (**Tabela 5**), apresentando, inclusive, ganho de peso.

Tabela 5 – Sinais e sintomas que foram avaliados nos ratos *Wistar* fêmeas após administração da Solução Salina 0,9% e do EELD na concentração de 2.000 mg/kg, durante 14 dias.

Sinais e Sintomas	Grupo Controle Solução Salina 0,9%	Grupo 2.000mg/kg EELD (DIA 01)	Tempo em dias
Irritabilidade	Ausente	Ausente	-
Letargia	Ausente	Ausente	-
Convulsões	Ausente	Ausente	-
Tremores	Ausente	Ausente	-
Queda de pelos	Ausente	Ausente	-
Lesões na pele	Ausente	Ausente	-
Poliúria/anúria	Ausente	Ausente	-
Diarreia	Ausente	Ausente	-
Salivação excessiva	Ausente	Ausente	-
Mucosas desidratadas	Ausente	Ausente	-
Perda do brilho ocular	Ausente	Ausente	-
Óbito	Ausente	Ausente	-

Fonte: A autora (2023).

Ensaio que envolve a testagem de plantas em animais, seja pela utilização de óleo essencial ou extrato bruto, exigem testes que possibilitem a avaliação do potencial toxicológico do material vegetal a ser utilizado. O teste de toxicidade oral aguda permite avaliar a ocorrência de reações tóxicas de um insumo administrado via oral, a fim de garantir a segurança do experimento (TROMBETA et al., 2014). É um dos métodos mais utilizados para avaliar a segurança de compostos químicos. O objetivo desse teste é determinar o potencial de uma substância em causar efeitos adversos agudos após sua ingestão, seja em uma dose única alta ou em doses repetidas. Para esta pesquisa seguiu-se o determinado pelo protocolo da OECD - The Organization for Economic Co-operation and Development – 423 (2001), “Toxicidade Aguda de Classe”, que determina as concentrações a serem utilizadas em estudos (05 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg ou 2.000 mg/kg).

A dose do EELD administrada neste experimento (2.000 mg/Kg) não apresentou toxicidade aguda nos ratos. Os animais do grupo testado com a concentração do extrato não demonstraram quaisquer reações ao longo dos 14 dias em observação, assim como no grupo controle (solução salina 0,9%). Pérez et al. (2005) utilizaram os extratos hexânico e etanólico de partes aéreas secas de *Lippia dulcis* Trev. em ratos e camundongos machos para avaliar suas propriedades anti-inflamatórias. Por via oral, os ratos foram tratados com 50, 100, 200 ou 400 mg/kg de ambos extratos, não demonstrando sinais de toxicidade aguda em nenhum animal dos grupos. No referido modelo experimental, o extrato etanólico de *L. dulcis* produziu efeito positivo contra a inflamação induzida nos animais, na dose de 400 mg/Kg.

Em um estudo utilizando o extrato etanólico das folhas de *Lippia citriodora* (Verbenaceae) para avaliar sua atividade anticonvulsionante em camundongos, a testagem de toxicidade oral foi realizada com a dose de 2.000 mg/kg de extrato dissolvido em carboximetilcelulose (CMC). A administração se deu em dose única e os animais foram avaliados quanto aos sinais e sintomas de toxicidade e/ou alteração comportamental por até 48 horas, e depois diariamente por 14 dias. Não houve sinal de toxicidade nem mortalidade nos grupos testados (RASHIDIAN et al., 2016).

Ainda neste contexto, empregando o extrato etanólico de *Phyla nodiflora*, também pertencente à família Verbenaceae, Dodoala et al. (2010), administraram 0,5, 1, 2, 4 e 8 g/kg/via oral do extrato em ratos machos da linhagem *Wistar*. O produto foi considerado não tóxico, pois não causou morte de nenhum animal, nem mesmo na dose máxima administrada. Os animais dos grupos tratados com o referido extrato não apresentaram alterações no comportamento, com exceção de um aumento no volume urinário, o que foi justificado pelos autores devido à propriedade diurética da planta.

Dados específicos sobre a toxicidade do extrato etanólico de *L. dulcis* são escassos. Considerando a utilização tradicional da planta e visando garantir a segurança da administração dos extratos, infusões e decocção, são necessários mais estudos a fim de elucidar os riscos associados ao seu uso.

6.3 Glicemia em jejum dos animais durante experimentação para análise de efeito hipoglicemiante do EELD

Todos os animais utilizados neste estudo de atividade hipoglicemiante foram induzidos ao DM2. Após a indução dos 20 animais, apenas 03 apresentaram glicemia inferior à 300mg/dL. Os demais exibiram um quadro de hiperglicemia grave, apresentando inclusive sinais e sintomas do diabetes (sede excessiva, poliúria, apatia, diarreia diabética). Os ratos foram distribuídos aleatoriamente nos grupos, iniciando os tratamentos após 72h da confirmação do DM2.

Os animais do grupo Controle Negativo (Grupo I) mantiveram estado de hiperglicemia do início ao final do tratamento, quando comparados com o Controle Positivo (Grupo II). No Grupo IV, tratado com EELD 500 mg/dL, três animais apresentaram redução da glicemia em jejum no último dia de experimentação, quando comparada à sua glicemia inicial (animais A1, A2 e A4).

A glicemia em jejum dos ratos foi monitorada ao longo de um período de 21 dias.

Utilizando as médias aritméticas das glicemias dos animais por grupo, observou-se que o grupo I (controle negativo) manteve-se constantemente em estado de hiperglicemia, com variações mínimas ao longo do período. Por outro lado, o grupo II (tratados com metformina 500 mg/kg) demonstrou uma tendência decrescente. Os grupos III e IV (EELD 100 mg/kg e EELD 500 mg/Kg, respectivamente) também tiveram tendências decrescentes, porém mantendo níveis elevados de glicose em jejum, e atingiram valores médios semelhantes no 21° dia. Os dados médios de glicemia em jejum (mg/dL) para os grupos estão representados na **Tabela 06**.

Tabela 6 – Média de glicemia em jejum dos grupos de animais observada ao 1°, 7°, 14° e 21° dia.

Dia de verificação	Glicemia (mg/dL) Controle Negativo	Glicemia (mg/dL) Controle Positivo	Glicemia (mg/dL) EELD 100 mg/Kg	Glicemia (mg/dL) EELD 500 mg/Kg
1° dia	505 ± 104.9	463 ± 133	406 ± 124.1	377 ± 133.5
7° dia	428 ± 140.8	328 ± 54.3	322 ± 208.1	370 ± 209.4
14° dia	582 ± 36.0	270 ± 29.2	317 ± 169.8	346 ± 155.7
21° dia	525 ± 84.2	167 ± 25.8	312 ± 178.7	318 ± 169.7

Fonte: Autora (2024).

Observou-se que, apesar de iniciarem os experimentos com a glicemia em jejum elevada, os animais dos Grupos III e IV, tratados com as duas concentrações de EELD, apresentaram média mais baixa que a dos animais do grupo Controle Negativo, não tratados. As médias analisadas por ANOVA apontaram diferença estatística entre os grupos tratados (**Tabela 7**). As diferenças de médias foram identificadas pelo método LSD de Fisher (**Tabela 8**). Notavelmente, o grupo Controle Negativo divergiu-se dos outros grupos, apresentando médias de glicemia em jejum bastante aumentadas.

Tabela 7: Análise de Variância (ANOVA) considerando os fatores glicemia x grupo e glicemia x dia.

Fonte	Gl	Sq (aj.)	Qm (aj.)	Valor (f)	Valor (p)
Grupo	3	428383	142794	7,60	0,000*
Dia	3	108726	36242	1,93	0,135
Grupo/Dia	9	207117	23013	1,22	0,297
Erro	61	18800		1146829	
Total	76			1897409	

* $P < 0,05$ expressa diferença da fonte.

Tabela 8: Dados de glicemia em jejum expressos utilizando médias para os grupos. Diferenças identificadas pelo método LSD de Fisher.

Grupo	N	Média	Agrupamento
Controle Negativo	17	507,90	A*
Controle Positivo	20	307,05	B
EELD 100 mg/Kg	20	339,40	B
EELD 500 mg/Kg	20	347,50	B

*Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

O diabetes é um distúrbio metabólico caracterizado por uma disfunção das células das ilhotas pancreáticas, causando deficiência de secreção ou resistência à insulina. Os sintomas do diabetes incluem estado crônico de hiperglicemia, polidipsia, poliúria, polifagia e perda de peso corporal (MAKENA et al., 2018). Entre os grupos tratados, dois com o EELD em concentrações diferentes, controle negativo e controle positivo, houve diferença na glicemia em jejum.

No estudo de Ritter Ruas et al. (2023) os autores utilizaram extrato bruto de *Lippia dulcis* em um método de modelagem molecular (*in silico*) para quantificar o verbascosídeo da amostra e testá-lo sobre a α -glicosidase obtida de uma bactéria. O verbascosídeo é um glicosídeo fenilpropanóide natural que pode ser encontrado em uma variedade de plantas medicinais. Apresenta atividades biológicas variadas, dentre estas atividade anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante e antibacteriana (NIGRO et al., 2020). A enzima α -glicosidase pertence ao grupo de enzimas glicosídeo hidrolases, e tem participação importante na digestão de carboidratos. Sua função principal é promover a quebra dos depósitos de glicogênio, liberando glicose na corrente sanguínea a fim de gerar energia. Sendo assim, em pessoas diabéticas a ação dessa enzima implica em mais glicose sérica circulante, acentuando o estado de hiperglicemia (WADOOD et al., 2018).

A fim de avaliar uma potencial inibição desta enzima, Ritter Ruas et al. (2023) utilizaram o extrato etanólico bruto de folhas secas de *L. dulcis* e suas frações, identificando a presença de verbascosídeo nas amostras por meio de HPLC-DAD. Neste estudo de docking molecular os pesquisadores concluíram que o extrato etanólico e suas frações apresentaram efeito inibitório da enzima α -glicosidase, sendo as frações mais purificadas as que apresentaram melhor eficácia. No entanto, observaram que na presença de fluido gástrico simulado o efeito inibitório do verbascosídeo de *L. dulcis* foi reduzido, indicando que o pH exerce uma influência relevante na estabilidade ou solubilidade das substâncias presentes nas frações dos extratos.

Nesta mesma perspectiva, outros estudos têm demonstrado a atividade terapêutica do

verbascosídeo no diabetes, fornecendo evidências de que este glicosídeo age nas células β pancreáticas protegendo-as com sua ação antioxidante. O verbascosídeo, também denominado acteosídeo, tem a capacidade de proteger as células β contra o estresse oxidativo e processos inflamatórios, ao influenciar a ativação da resposta proteica e melhorar a dinâmica mitocondrial. Isso resulta no aumento da sobrevivência das células β e na produção de insulina (GALLI, et al., 2020).

Uma pesquisa com planta *Marrubium vulgare* (Lamiaceae), a qual apresentou grande quantidade de moléculas complexas derivadas do verbascosídeo, utilizou o extrato aquoso de partes aéreas da planta em ratos diabéticos induzidos por aloxana. O extrato melhorou o estado de hiperglicemia sanguínea dos animais, demonstrando efeito semelhante ao grupo controle positivo (glibenclamida). *Marrubium vulgare* costuma ser muito utilizada em países africanos para controlar o DM. Os resultados desta pesquisa enfatizaram a relevância biológica da planta, relacionando-a com uma variedade de metabólitos, dentre estes derivados de verbascosídeo e polifenóis, como os flavonoides (BOUDJELAL et al., 2012).

Outro composto presente na composição do EELD, a floridzina, um flavonóide fenilpropanóide, também apresenta uma potencial ação contra o diabetes bem documentada na literatura. Este composto, encontrado em grande quantidade em maçãs e algumas plantas medicinais, direciona sua ação para os mecanismos patogênicos do DM, como o transportador de glicose 4 (GLUT4) e o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- γ), a fim de reduzir a resistência à insulina em estados de hiperglicemia. Além disso, a floridzina age nos processos inflamatórios e oxidativos, com o intuito de atenuar a progressão das complicações macro e microvasculares associadas ao diabetes (SHELKE et al., 2024).

Segundo uma pesquisa conduzida por Zhang et al. (2021) em ratos diabéticos, a fim de investigar os efeitos hipoglicêmicos e hipolipemiantes da floridzina isolada a partir das folhas de sweet tea, verificou-se uma melhoria nos sintomas do DM nos grupos tratados com o flavonoide. Adicionalmente, a floridzina demonstrou capacidade de reduzir a glicemia de jejum, melhorar os níveis séricos de colesterol e triglicérides no sangue, proteger contra danos às ilhotas pancreáticas e reduzir a gordura nas células do fígado, enfatizando a ação terapêutica deste composto sobre a hiperglicemia crônica e seus agravos.

6.4 Estado ponderal dos animais durante experimentação

Em termos de valores gerais, foram observadas as médias aritméticas dos pesos corporais dos animais agrupados ao longo dos dias do experimento (**Tabela 9**). Todos os

animais dos Grupos I (controle negativo) e II (controle positivo) apresentaram perda de peso ao final dos tratamentos. Observou-se perda ponderal nos animais do Grupo III (EELD 100 mg/kg), até o 14º dia. No entanto, na última verificação de peso dos animais (21º dia) a média indicou leve ganho ponderal. Os animais do Grupo IV, tratados com o EELD a 500 mg/kg, também apresentaram média indicativa de ganho de peso no 21º dia, identificado na pesagem final, quando comparada à média de peso na pesagem inicial. O animal de número 01 (A1) deste grupo foi o que teve maior ganho ponderal, iniciando o experimento com 249 g, e passando a 290 g no último dia de experimento.

Tabela 9 – Média de peso dos grupos de animais observada ao 1º, 7º, 14º e 21º dia.

Dia de verificação/peso	Peso (g) Controle Negativo	Peso (g) Controle Positivo	Peso (g) EELD 100 mg/Kg	Peso (g) EELD 500 mg/Kg
1º dia	256g ± 28	269g ± 13.3	261g ± 23.4	249g ± 23.3
7º dia	240g ± 32.7	224g ± 24	229g ± 18.5	246g ± 26.8
14º dia	225g ± 38.2	206g ± 36.7	225g ± 15.7	239g ± 40.1
21º dia	222g ± 44.9	204g ± 36.1	230g ± 15.3	263g ± 49.3

Fonte: Autora (2024).

Na imagem abaixo temos uma comparação do tamanho de dois ratos de grupos diferentes, Grupo I e Grupo IV, no seu último dia de experimentação. Os animais iniciaram o experimento com pesos aproximados (Grupo I A4 = 256 g, Grupo IV A1 = 249 g), e no último dia evidenciaram uma significativa diferença (Grupo I A4 = 208 g, Grupo IV A1 = 290 g) (**Figura 11**).

Figura 11. Diferença de tamanho de animal do Grupo I, à esquerda (A4), e Grupo IV, à direita (A1), no último dia de tratamento.



Fonte: Autora (2024)

Conforme observado utilizando as médias aritméticas, notou-se que os pesos médios dos animais dos grupos tratados com as duas concentrações do EELD indicaram um ganho ponderal no 21º dia de tratamentos, diferindo-se dos demais grupos. Ao aplicar os testes ANOVA nas médias observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o peso dos animais durante os dias de tratamento (**Tabela 10**). Utilizando o método LSD de Fisher, evidenciou-se que houve diferença entre o 1º dia e os outros dias de avaliação de peso (**Tabela 11**).

Tabela 10: Análise de Variância (ANOVA) considerando os fatores peso x grupo e peso x dia.

Fonte	Gl	Sq (aj.)	Qm (aj.)	Valor (f)	Valor (p)
Grupo	3	4138	1379,3	1,44	0,239
Dia	3	9781	3260,2	3,41	0,023*
Grupo*Dia	9	3658	406,4	0,42	0,917
Erro	61	58348	956,5		
Total	76	75605			

* $P < 0,05$ expressa diferença da fonte.

Tabela 11: Dados de peso expressos utilizando médias para dias. Diferenças identificadas pelo método LSD de Fisher.

Dia	N	Média	Agrupamento
1	20	256,100	A*
7	19	234,650	B
14	19	227,275	B
21	19	231,225	B

* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

O estado ponderal dos animais reflete significativamente o estado de saúde, sendo um sinal clínico fácil de observar. O baixo peso está associado ao estado de hiperglicemia, onde o excesso de glicose na corrente sanguínea obriga as células a usarem aminoácidos e ácidos graxos como fonte de energia, resultando eventualmente na diminuição dos tecidos adiposo e muscular. Sendo assim, a utilização elevada das proteínas dos tecidos devido à diminuição da sensibilidade à insulina, juntamente com a deficiência de carboidratos para o metabolismo energético no DM, leva à redução do peso corporal (RAMADAN; SCHAALAN; TOLBA, 2017).

Kabach et al. (2023) avaliaram em sua pesquisa o fator ponderal entre camundongos diabéticos induzidos por aloxana (150 mg/Kg) e tratados com os extratos aquoso e metanólico de *Oxalis pes-caprae*, camundongos diabéticos induzidos não tratados e camundongos do grupo controle normal, durante 21 dias. Seus resultados indicaram que os animais tratados com o extrato metanólico da planta apresentaram um aumento de 25% do seu peso corporal

ao final do experimento, aproximando-se do ganho de peso dos animais do grupo controle normal (27,12%). Em contrapartida, os animais do grupo diabético tiveram uma perda considerável de 27% do seu peso corporal ao longo da experimentação. O ganho de peso nos grupos tratados indicou a eficácia do tratamento com a dosagem do extrato de *Oxalis pes-caprae* na redução da glicemia sérica, o que foi atribuído à presença de compostos fenólicos no extrato metanólico.

6.5 Níveis séricos de ureia, creatinina, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) dos animais

As médias aritméticas dos parâmetros bioquímicos de ureia, creatinina, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) encontradas nos exames dos animais deste estudo foram comparadas com as médias encontradas por Lima et al. (2014), utilizadas como valores de referência. Conforme evidenciado na **Tabela 12**, os dados deste estudo ficaram consideravelmente acima dos valores de referência, com exceção da creatinina.

Tabela 12 – Médias dos valores das enzimas dos animais, comparada aos valores de referência de Lima et al. (2014).

Parâmetro bioquímico	Média dos grupos	Valores de referência (LIMA et al., 2014)
Creatinina (mg/dL)	0,28	0,5 ± 0,05
Ureia (mg/dL)	186,57	35,9 ± 3,58
TGO (U/L)	224,86	131,7 ± 23,09
TGP (U/L)	186,57	48,4 ± 6,46

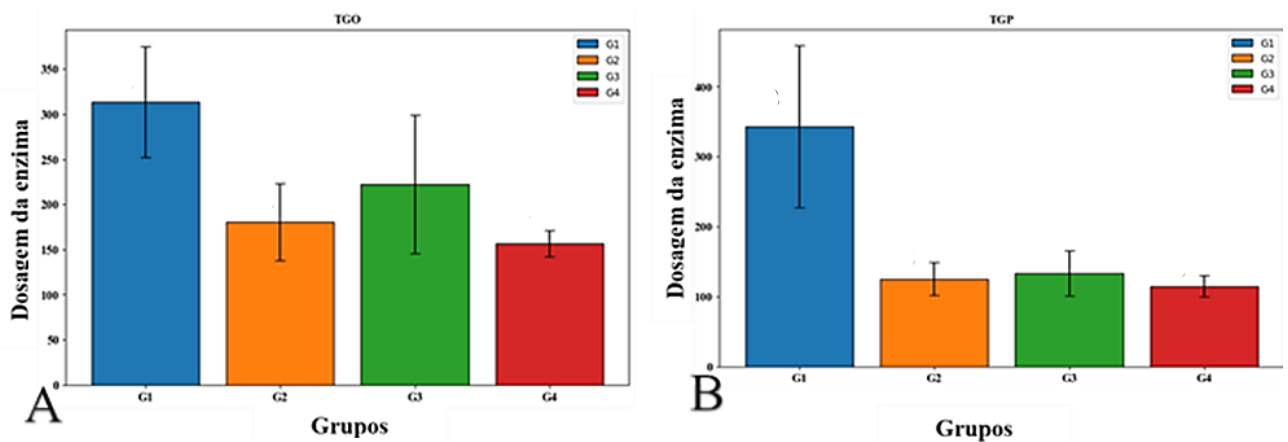
Fonte: Autora (2024).

Ao analisar a média ± desvio padrão da enzima TGO entre os grupos experimentais, observou-se uma tendência decrescente nas quantidades detectadas desta enzima por grupo. A maior média foi encontrada para o grupo I (Controle Negativo), com 290 ± 123.36 , seguida por uma redução no grupo II para 180.4 ± 42.7 . Essa tendência continuou decaindo no grupo III, com uma média de 140 ± 171.45 , e no grupo IV, que apresentou uma média de 135 ± 32.85 . É importante notar que o grupo IV mostrou o menor desvio padrão, indicando uma maior homogeneidade em relação aos outros grupos. Esses resultados estão representados na **Figura 12A**.

Seguindo o mesmo padrão de análise, para a TGP também foram analisadas as médias

± desvio padrão dos grupos, e, assim como ocorreu com o TGO, também houve redução entre os grupos. O grupo I (Controle Negativo) apresentou média de 343 ± 232.3 , enquanto o grupo II (Controle Positivo) apresentou média de 125 ± 23.1 . O grupo III (EELD 100 mg/Kg), teve média de 133 ± 71.99 , enquanto o grupo IV (EELD 500 mg/Kg), apresentou média de 115 ± 34.81 . Notavelmente, o grupo IV demonstrou menor desvio padrão, indicando uma maior homogeneidade em relação aos outros grupos. Esses resultados estão representados na **Figura 12B**.

Figura 12. Comparação de média e desvio padrão das dosagens de enzimas por grupos de teste. (A): transaminase oxalacética (TGO); (B): transaminase pirúvica (TGP).



Fonte: Autora (2024)

Transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) no soro podem refletir a função hepática e/ou lesão neste órgão (SHIBABAW et al., 2019). Os níveis de Transaminase pirúvica (TGP) sérica após 21 dias de experimentos estiveram elevados comparados aos valores de referência, portanto, o EELD em ambas as concentrações não apresentou impacto positivo no controle deste parâmetro. Também não houve diferença estatística nos níveis de Transaminase oxalacética (TGO) entre os grupos, demonstrando valores acima do normal nos animais.

Os ratos do grupo controle positivo, tratados com metformina 500 mg/Kg, apresentaram índices elevados de TGO e TGP ao final dos 21 dias de tratamento. Apesar do potencial hepatoprotetor da metformina ter sido relatado em estudos com a droga em animais, reduzindo os níveis séricos de TGO e TGP (SAEEDI et al., 2016), o resultados da presente pesquisa corroboram com o estudo de Khadre et al. (2011), que administraram metformina (500 mg/kg) em ratos diabéticos induzidos por aloxana (150 mg/Kg). Em sua pesquisa, após 28 dias dos tratamentos, os parâmetros sanguíneos bioquímicos dos animais foram avaliados. Observaram então que a administração de aloxana levou a um aumento na atividade de TGO e TGP nos animais de todos os grupos induzidos, quando comparados ao controle normal. Os

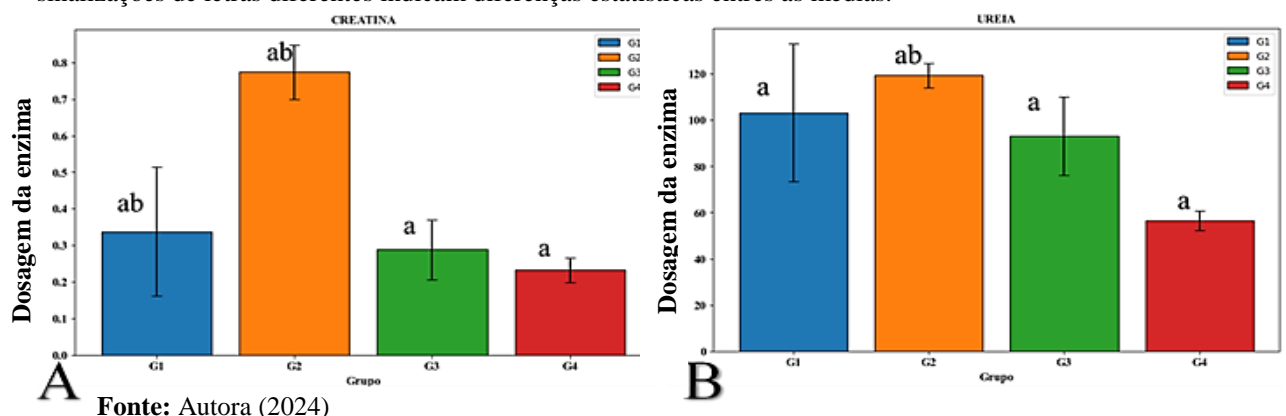
valores para TGO nos ratos tratados com metformina ($123,8 \pm 36$ U/L) foram mais elevados quando comparados ao controle diabético ($115,8 \pm 32,71$ U/L). Os níveis de TGP nos ratos tratados com metformina também estavam elevados ao final do experimento ($77,4 \pm 7,99$) (KHADRE et al., 2011).

De acordo com Lucchesi; Cassettari; Spadella (2015), aloxana altera as vias normais do metabolismo celular, provocando inativação de enzimas e causando danos hepáticos que podem ser irreversíveis. Em sua pesquisa com ratos diabéticos induzidos por aloxana a 42 mg/Kg, observaram que uso desta substância elevou os níveis das enzimas hepáticas nos animais. Os níveis séricos TGO e TGP permaneceram altos nas duas primeiras semanas de tratamentos, no entanto, apenas a TGP continuou elevada até o final dos experimentos. Tais resultados sugerem ação tóxica da aloxana, tornando seus efeitos associados à droga mais do que ao próprio DM (LUCCHESI; CASSETTARI; SPADELLA, 2015). A referida pesquisa sustenta os resultados obtidos com este estudo.

Em relação à creatinina, foram observadas diferenças estatísticas significativas, entre os grupos experimentais. Utilizando ANOVA e teste Tukey, verificaram-se diferenças entre os grupos I (Controle Negativo) e II (Controle Positivo), com média de $-0,436$ e um valor de p de 0.031; entre os grupos II e III (EELD 100 mg/Kg), com média de 0.486 e um valor de p de 0.01; e entre os grupos II e IV (EELD 500 mg/kg), com uma média de 0.542 e um valor p de 0.004. Esses resultados estão representados na **Figura 13A**.

Outro parâmetro bioquímico estudado no qual foi possível verificar uma diferença estatisticamente significativa, de acordo com os testes aplicados, foi a ureia. Essa diferença foi observada apenas entre os grupos II e IV, com uma média de 62.9 e um valor de p de 0.047. As comparações entre os demais grupos não apresentaram diferenças significativas: grupo I e II (média de $-16,1$ e valor de p de 0.894); I e III (média de 10,2, p valor de 0.97); I e IV (média de 46,8 e p valor de 0.216); II e III (média de 26,3, p valor de 0.626) e III e IV com média de 36,6 e um valor de p de 0.59. Esses resultados estão representados na **Figura 13B**.

Figura 13. Comparação de médias pelo teste Tukey (5% de confiabilidade) das dosagens de enzimas por grupos de teste. (A): Creatinina; (B): Ureia. Sinalizações de mesma letra correspondem a valores estatisticamente iguais, sinalizações de letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as médias.



Os animais dos grupos III (EELD 100 mg/Kg) e IV (EELD 500 mg/Kg) apresentaram valores séricos de creatinina dentro da faixa normal de referência (LIMA et al., 2014). Um estudo com *Taraxacum officinale* (L.) Weber (Dente-de-leão), determinou o perfil polifenólico da planta e sua atividade nefroprotetora em ratos *Wistar* com lesão renal aguda induzida por gentamicina. Os resultados da composição química da planta demonstraram uma grande concentração dos compostos apigenina, luteolina e quercetina na sua tintura. Os testes bioquímicos dos animais evidenciaram uma redução nos níveis de creatinina sérica com a concentração de tintura feita com partes aéreas secas da planta, de 0,5 mg peso seco de material vegetal para 10 ml de etanol 70%, reforçando o potencial antioxidante e protetor dos compostos fenólicos (EPURE et al., 2022).

Quanto ao nível de ureia, todos os grupos apresentaram valores alterados, acima do normal. No entanto, os animais do Grupo IV (EELD 500 mg/Kg) demonstraram os valores mais baixos em relação aos demais grupos. Um estudo avaliou a ação da quercetina, um composto polifenólico, em coelhos hiperlipidêmicos, mensurando parâmetros bioquímicos dos animais após 28 dias de tratamento. A quercetina, associada à bixina, um pigmento carotenoide, foi capaz de reduzir os níveis de ureia sérica nos animais, além do colesterol LDL (LIMA; OLIVEIRA; NAGEN, 2003). A quercetina foi um dos compostos fenólicos observados no EELD de *Lippia dulcis*.

Os níveis de ureia e creatinina no sangue são indicativos essenciais, amplamente documentados na literatura, para avaliar a toxicidade renal causada por medicamentos e injúrias metabólicas em animais e humanos. Isso se deve ao fato de que, entre suas diversas funções, uma das mais importantes é contribuir para a excreção de substâncias nocivas do corpo. Embora a creatinina seja mais precisa que a ureia na avaliação da função renal, a análise da relação entre esses compostos permite identificar a presença de alterações no funcionamento dos rins (SINGH et al., 2016). Elevações nos níveis de ureia no sangue podem indicar problemas renais, mas também podem ser resultado de condições como desidratação, uso de diuréticos ou doença hepática. Portanto, embora sejam dosadas ambas as substâncias para avaliar a função renal, a creatinina é considerada mais específica e confiável nesse contexto (INGOGLIA et al., 2021).

Considerando os achados nesta pesquisa, propõe-se que o DM2 induzido por aloxana nos ratos da linhagem *Wistar* resultou em um aumento grave na glicemia dos animais de todos os grupos, com isso elevando seus níveis séricos de TGP, TGO e ureia, inclusive no grupo tratado com Metformina (500 mg/Kg), Grupo II. A creatinina esteve alta nos animais dos grupos I e II (Controle Negativo e Controle Positivo, respectivamente). A administração de

aloxana no Grupo II pode ter causado danos irreversíveis nos órgãos associados ao metabolismo de glicose, como fígado e rins, o que não foi abrandado nem com a utilização da droga hipoglicemiante.

Entretanto, os animais dos Grupos III e IV, tratados com duas concentrações do EELD apresentaram níveis séricos normais de creatinina quando comparados aos valores de referência.

7. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o Extrato Etanólico de *Lippia dulcis* Trev. (EELD) não demonstrou toxicidade nos animais. Quanto à glicemia em jejum, houve diferença estatística entre os grupos de animais, tendo os grupos II (Controle Positivo), III (EELD 100 mg/kg) e IV (EELD 500 mg/kg) se diferenciado do Grupo I (Controle Negativo), apresentando glicemia em jejum mais baixa ao final dos experimentos, evidenciando a eficácia de ambas as concentrações do extrato.

Os animais dos grupos III e IV, tratados com ambas as concentrações do EELD, apresentaram média indicativa de ganho de peso no 21º dia de avaliação ponderal. O EELD também impactou nos níveis séricos de creatinina dos animais tratados, deixando-o dentro dos valores de referência.

Pode-se inferir que a atividade terapêutica do EELD está relacionada aos compostos fenólicos presentes em sua composição. É importante destacar que outros estudos precisam ser conduzidos com *Lippia dulcis* e seus extratos, além de uma análise fitoquímica mais aprofundada, a fim de quantificar seus compostos fenólicos, o que contribuirá para o conhecimento da espécie e suas atividades biológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, Uswa; AHMAD, Rabia Shabi. **Anti-diabetic property of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves in Streptozotocin-induced diabetes in albino rats.** *BMC complementary and alternative medicine*, 18, 1-11, 2018.
- AJIBOYE, B. O., DADA, S., FATOBA, H. O., LAWAL, O. E., OYENIRAN, O. H., ADETUYI, O. Y., ... & OYINLOYE, B. E. ***Dalbergiella welwitschia* (Baker) Baker f. alkaloid-rich extracts attenuate liver damage in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 168, 115681, 2023.
- AL-SNAI, Ali Esmail. **Pharmacological and therapeutic effects of *Lippia nodiflora* (Phyla nodiflora).** *IOSR Journal of Pharmacy*, 9(8), 15-25, 2019.
- ANDRADE-CETTO, Adolfo; BECERRA-JIMÉNEZ, Jaime; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, René. **Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes.** *Journal of ethnopharmacology*, 116(1), 27-32, 2008.
- ARIKA, W. M.; ABDIRAHMAN, Y.A.; MAWIA, M. M., WAMBUA, K. F., NYAMAI, D. M., OGOLA, P. E.; KIBOI, N.G.; NYANDORO, H.O.; NJAGI, S.M.; AGYIRIFO, D.S.; Ngugi, M.P. **Hypoglycemic effect of *Lippia javanica* in alloxan induced diabetic mice.** *J Diabetes Metab*, 6(2), 624-630, 2015.
- ATTIA, Mohamed; KIM, Soo-Hun.; RO, Dae-Kyun. **Molecular cloning and characterization of (+)-epi- α -bisabolol synthase, catalyzing the first step in the biosynthesis of the natural sweetener, hernandulcin, in *Lippia dulcis*.** *Archives of biochemistry and biophysics*, 527(1), 37-44, 2012.
- ÁVILA-REYES, J.A; ALMARAZ-ABARCA, N; CHAIDEZ-AYALA, A.I.; RAMÍREZ-NOYA, D.; DELGADO-ALVARADO, E.A.; TORRES-RICARIO, R.; ALANÍS-BAÑUELOS, R.E. **Foliar phenolic compounds of ten wild species of *Verbenacea* as antioxidants and specific chemomarkers.** *Brazilian Journal of Biology*, 78, 98-107, 2017.
- BAHMANI, Mahmoud; GOLSHAHI, ,Hannane; SAKI, Kourosh; RAFIEIAN-KOPAEI, Mahmoud; DELFAN, Bahram; MOHAMMADI, Tahereh. **Medicinal plants and secondary metabolites for Diabetes Mellitus control.** *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, S687-S692, 2014.
- BAQUEIRO-PEÑA, Itzamná; GUERRERO-BELTRÁN, José. **Uses of *Justicia spicigera* in medicine and as a source of pigments.** *Functional Foods in Health and Disease*, 4(9), 401-414, 2014.
- BARBOSA, Júnia; OLIVEIRA, Suzana; SEARA, Luci. **O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52, 940-950, 2008.
- BOUDJELAL, Amel; HENCHIRI, Cherifa; SIRACUSA, Laura; SARI, Madani; RUBERTO, G. **Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion.** *Fitoterapia*, 83(2), 286-292, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Biblioteca Virtual em Saúde (BMV): Dia 26/06 - Dia nacional do Diabetes**. 2020. Disponível em: <<https://bvsmis.saude.gov.br/26-6-dia-nacional-do-diabetes-4/>>. Acesso em 21 de fevereiro de 2023.

CALVACHE, Olga Lucía Benavides; VILLOTA, Johana Mireya; TOVAR, Darmely Milena. **Caracterización del aceite esencial presente en las hojas de *Phyllanthus nodiflorus* (L.) Greene (orozul)**. *Universidad Y Salud*, 1(12), 2010.

CAPOZZI, Megan E., D'ALESSIO, David A.; CAMPBELL, Jonathan E. **The past, present, and future physiology and pharmacology of glucagon**. *Cell metabolism*, 34(11), 1654-1674, 2022.

CARDOSO, Pedro Henrique; O'LEARY, Nataly; OLMSTEAD, Richard G.; MORONI, Pablo. **An update of the Verbenaceae genera and species numbers**. *Plant Ecology and Evolution*, 154(1), 80-86, 2021.

CARE, D. **Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes**. *Diabetes Care*, 45(1), S113-S124, 2022.

CASTILLO, Leyde N; CALVA, James; RAMÍREZ, Jorge; VIDARI, Giovanni; ARMIJOS, Chabaco. **Chemical Analysis of the Essential Oils from Three Populations of *Lippia dulcis* Trevir. Grown at Different Locations in Southern Ecuador**. *Plants*, 13(2), 253, 2024.

CATALAN, Cesar A.N.; DE LAMPASONA, Marina E.P. **The chemistry of the genus *Lippia* (Verbenaceae)**. *Oregano: the genera Origanum and Lippia*, 127-149, 2002.

COMPADRE, César M.; ROBBINS, Eugene F.; KINGHORN, A. Douglas. **The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquiries, and constituents**. *Journal of ethnopharmacology*, 15(1), 89-106, 1986.

COUTINHO, M.; LIMA, F.; DU BÚ, E.A.; ARAÚJO, C. **Potencial hipoglicemiante da *Cissampelos sicyoides* L. (insulina vegetal)**. *Rev. Bras. Pl. Med*, 18(4), 878-886, 2016.

DE CASTRO, Rebeca Machado Ferreira; DO NASCIMENTO SILVA, Alana Manuela; DA SILVA, Ana Karoline; DE ARAÚJO, Bárbara; MALUF, Bianca Vitória; FRANCO, Jorgeane. **Diabetes Mellitus e suas complicações-uma revisão sistemática e informativa**. *Brazilian Journal of Health Review*, 4(1), 3349-3391, 2021.

DE OLIVEIRA, Patrícia; MACHADO, Ricardo A.F; BOLZAN, Ariovaldo; BARTH, Daniele. **Supercritical fluid extraction of hernandulcin from *Lippia dulcis* Trev.** *The Journal of Supercritical Fluids*, 63, 161-168, 2012.

DE PINHO, Lucineia; AGUIAR, Ana Paula; OLIVEIRA, Máira; BARRETO, Nair.; FERREIRA, Cristiane. **Hipertensão e dislipidemia em pacientes Diabetes Mellitus tipo 2: uma revisão integrativa**. *Renome*, 4(1), 87-101, 2015.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2019-2020. Disponível em: <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf>. Acesso em 21 de fevereiro de 2023.

DODOALA, Sujatha; DIVITI, Ranganayakulu; KOGANTI, Bharathi; PRASAD, K.V.S.R. G. **Effect of ethanolic extract of *Phyla nodiflora* (Linn.) Greene against calculi producing diet induced urolithiasis.** *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(3), 314-321, 2010.

EPURE, Alexandra; PARVU, Alina; VLASE, Laurian; BENEDEC, Daniela; HANGANU, Daniela; VLASE, Ana Maria; ONIGA, Ilioara. **Polyphenolic compounds, antioxidant activity and nephroprotective properties of Romanian *Taraxacum officinale*.** *Farmacica*, 70(1), 47-53, 2022.

FERREIRA, L.R.D; DA SILVA, A.F; DA SILVA SIQUEIRA, J; DA CONCEIÇÃO SANTOS, R., DA SILVA LIMA, V; DE OLIVEIRA, A.M; SOARES, L.A.L; DA SILVA, G. C. **Estudo do perfil fitoquímico e avaliação dos efeitos citotóxicos do rizoma da *Microgramma Vacciniifolia*.** *Brazilian Journal of Health Review*, 3(1), 1185-1202, 2020.

FLORÊNCIO, Rêncio Bento; DE ARAÚJO FONSECA, Luiza Gabriela; DA SILVA, Vivian Fernanda; LIMA, Ília; GUALDI, Lucien. **Diabetes Mellitus hospitalization and mortality rate according to a national database in Brazil: a longitudinal study.** *BMC Public Health*, 21(1), 1-7, 2021.

FUHR, Joana Cortelete; RAMOS, Maria Eduarda Kegler; PIOVESAN, Fabiana; RENNER, Luciana de Oliveira; SIQUEIRA, Luciano de oliveira. **Relação dos produtos finais de glicação avançada na hipertensão de pacientes com diabetes: uma revisão sistemática.** *Brazilian Journal of Nephrology*, 2022.

FUNARI, Cristiano S. et al. **High resolution ultra high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species.** *Journal of Chromatography A*, v. 1259, p. 167-178, 2012.

GALICIA-GARCIA, Unai; BENITO-VICENTE, Asier; JEBARI, Shifa; LARREA-SEBAL, Asier; SIDDIQI, Haziq; URIBE, Kepa; MARTÍN, César. **Pathophysiology of type 2 Diabetes Mellitus.** *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6275, 2020.

GALLI, Alessandra; MARCIANI, Paola; MARKU, Argelta; GHISLANZONI, Silvia; BERTUZZI, Federico; ROSSI, Rafaella; PEREGO, Carla. **Verbascoside protects pancreatic β -cells against ER-stress.** *Biomedicines*, 8(12), 582, 2020.

GAO, Xiang; HE, Junsheng; ZHU, Anming; XIE, Kang; YAN, Kaixuan; JIANG, Xue; GUO, Jiao. **Modelling gestational Diabetes Mellitus: large animals hold great promise.** *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 22, 407-420, 2021.

GHASEMI, Asghar; KHALIFI, S; JEDI, S. **Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes.** *Acta Physiologica Hungarica*, 101(4), 408-420, 2014.

GIOVANNINI, Pedro; HOWES, Melanie-Jayne R.; EDWARDS, Sarah E. **Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America: A review.** *Journal of ethnopharmacology*, 184, 58-71, 2016.

GOMES, Kátia A.; SANTOS, Allyson L.R.; FARIA, Anizio M. **Avaliação de aditivos de fase móvel e temperatura na vida útil de colunas para cromatografia líquida de alta eficiência.** *Química Nova*, 43, 300-306, 2020.

GRANADOS-DIESELDORFF, N; PAREDES, M; ORDÓÑEZ, M; MARTÍNEZ, V. *Phyla dulcis* (Trevir.) Moldenke: **Descripción de características anatómicas diagnósticas de la droga cruda.** *Revista Científica*, 23(1), 68-77, 2013.

GUIA BRASILEIRO DE BOAS PRÁTICAS EM EUTANÁSIA EM ANIMAIS - Conceitos e Procedimentos Recomendados – Brasília, 1v. (62p) 15 x 21cm. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Disponível em <https://www.cfmv.gov.br/guia-brasileiro-de-boas-praticas-para-a-eutanasia-em-animais/comunicacao/publicacoes/2020/08/03/#4>. 2012. Acesso em 12 de Fevereiro de 2023.

GUIA DE EUTANÁSIA PARA ANIMAIS DE ENSINO E PESQUISA 1ª edição – 2019
Elaborado por Samantha Mesquita Favoretto Denise Isoldi Seabra Márcia Carolina Millán Olivato Aprovado por CEUA/UNIFESP – 2019.

HALL, Hurst; BANERJEE, Subhash; MCGUIRE, Darren. **Variability of clopidogrel response in patients with type 2 Diabetes Mellitus.** *Diab Vasc Dis Res*, London, v. 8, n. 4, p. 245-53, 2011.

HOTWANI, Kavita; BALIGA, Sudhindra; SHARMA, Krishna. **Phytochemistry: use of medicinal plants.** *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 11(4), 233-251, 2014.

HUANG, Mei; JOSEPH, Jamie. **Assessment of the metabolic pathways associated with glucose-stimulated biphasic insulin secretion.** *Endocrinology*, 155(5), 1653-1666, 2014.

IATRIDIS, Nikos; KOUGIOUMTZI, Anastasia; VLATAKI, Katerina; PAPADAKI, Styliani; MAGKLARA, Angeliki. **Anti-Cancer Properties of *Stevia rebaudiana*; More than a Sweetener.** *Molecules*, 27(4), 1362, 2022.

INGOGLIA, Filippo; CHONG, Jean-Leon; PASQUALI, Marzia; LONGO, Nicola. **Creatine metabolism in patients with urea cycle disorders.** *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 29, 100791, 2021.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. About diabetes – IDF – **What is diabetes.** Disponível em <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes>. Acesso em 18 de agosto de 2022.

KABACH, Imad; BOUCHMAA, Najat; ZOUAOUI, Zaquia; ENNOURY, Abdelhamid; EL ASRI, Sara, LAABAR, Abdelmounaim; MRID, Reda Ben **Phytochemical profile and antioxidant capacity, α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of *Oxalis pes-caprae* extracts in alloxan-induced diabetic mice.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 160, 114393, 2023.

KHALID, Mariyam; PETROIANU, Georg; ADEM, Abdu. **Advanced glycation end products and diabetes mellitus: mechanisms and perspectives.** *Biomolecules*, 12(4), 542, 2022.

KASHANI, K; ROSNER, M. H.; OSTERMANN, M. **Creatinine: from physiology to clinical application.** *European journal of internal medicine*, 72, 9-14, 2020.

KATSAROU, Anastasia; GUDBJÖRNSDOTTIR, Soffia; RAWSHANI, Araz; DABELEA, Dana, BONIFACIO, Ézio; ANDERSON, Bárbara; LERNMARK, Ake. **Type 1 Diabetes Mellitus.** *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-17, 2017.

KEARNEY, Jessica; GNUDI, Luigi. **The pillars for renal disease treatment in patients with type 2 diabetes.** *Pharmaceutics*, 15(5), 1343, 2023.

KENE, Kumsa; WONDIMNEW, Tesaka; WELDE, Mengistu; MATEOs, Tigist; ADUGNa, Tesfaye; GEREMA, Urge; ABERA, Deriba. **Prevalence and determinants of Impaired Serum Creatinine and Urea among type 2 diabetic patients of jimma medical center, Jimma, Southwestern Ethiopia, 2019.** *Endocrine and Metabolic Science*, 3, 100096, 2021.

KHADRE, S., IBRAHIM, H., SHABANA, M., & EL-SEADY, N. **Effect of metformin and glimepiride on liver and kidney functions in alloxan-induced diabetic rats.** *Journal of High Institute of Public Health*, 41(2), 282-310, 2011.

KUBICA, P; SZOPA, A; KOKOTKIEWICZ, A; MICELI, N; TAVIANO, M. F; MAUGERI, A; EKIERT, H. **Production of verbascoside, isoverbascoside and phenolic acids in callus, suspension, and bioreactor cultures of *Verbena officinalis* and biological properties of biomass extracts.** *Molecules*, 25(23), 5609, 2020.

LAKHTAKIA, Ritu. **The history of Diabetes Mellitus.** *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 13(3), 368, 2013.

LENDE, Michelle; RIJHSINGHANI, Asha. **Gestational diabetes: overview with emphasis on medical management.** *International journal of environmental research and public health*, v. 17, n. 24, p. 9573, 2020.

LENZEN, Sigurd. **The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes.** *Diabetologia*, 51(2), 216-226, 2008.

LIMA, C. M., LIMA, A. K., MELO, M. G. D., DÓRIA, G. A. A., SERAFINI, M. R., ALBUQUERQUE-JÚNOR, R. L. C., & ARAÚJO, A. A. S. **Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes.** *Scientia plena*, 10(3), 2014.

LIMA, Leonardo Ramos; OLIVEIRA, Tânia Toledo de; NAGEM, Tanus Jorge. **Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos.** *Revista de Nutrição*, 16, 305-314, 2003.

LIN, Long-Ze; MUKHOPADHYAY, Sudarsan; ROBBINS, Rebecca J.; HARNLY, James M. **Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis.** *Revista de composição e análise de alimentos*, v. 20, n. 5, pág. 361-369, 2007.

LIRA NETO, José Cláudio; OLIVEIRA, Jales Fhelipe; SOUZA, Maria Amélia; ARAÚJO, Márcio; DAMASCENO, Marta Maria; FREITAS, Roberto. **Prevalência da síndrome**

metabólica e de seus componentes em pessoas com Diabetes Mellitus tipo 2. Texto & Contexto-Enfermagem, 27, 2018.

LUCCHESI, Amanda Natália; CASSETTARI, Lucas; SPADELLA, César. **Alloxan-induced diabetes causes morphological and ultrastructural changes in rat liver that resemble the natural history of chronic fatty liver disease in humans.** *Journal of diabetes research, 2015, 2015.*

MAKENA, Wusa; HAMMAN, Wilson O; BURAIMOH, Adebayo; DIBAL, Nathan I; OBAJE, S. G. **Therapeutic effects of balanitoside in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Journal of Taibah University medical sciences, 13(4), 402-406, 2018.*

MALVIYA, Neelesh; JAIN, Sanjay; MALVIYA, Sapna. **Antidiabetic potential of medicinal plants.** *Acta pol pharm, 67(2), 113-118, 2010.*

MARÍN-PEÑALVER, Juan José, MARTÍN-TIMÓN, Iciar; SEVILLANO-COLLANTES, Cristina; DEL CAÑIZO-GÓMEZ, Francisco Javier. **Update on the treatment of type 2 Diabetes Mellitus.** *World journal of diabetes, 7(17), 354, 2016.*

MATALQAH Sina M.; AL-TAWALBEH, Deniz M. **Medicinal plants potential against Diabetes Mellitus.** *Diabetes. 9(10):11, 2019.* Disponível em: <http://ijpjournal.com/wp-content/uploads/2019/03/1-Vol.-6-Issue-2-Feb-2019-IJP-RE-239.pdf>. Acesso em 02 de Fevereiro de 2023.

MELO, Eduardo; CARVALHO, Ivone. **Alfa e b-glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos.** *Química Nova, 29, 840-843, 2006.*

MESQUITA GERMANO, Carolina; RUAS, Natália; LAMEIRA, Osmar; RIBEIRO, Fernanda; TEIXEIRA ROCHA, Tainá; DE CARVALHO, Alexandre; Bertolucci, Suzana Kelly. **Seasonal variations during two years in the essential oil of *Lippia dulcis* Trevir., an exotic aromatic of the Amazon.** *Journal of Essential Oil Research, 1-9, 2022.*

MUSABAYANE, C. T. **The effects of medicinal plants on renal function and blood pressure in Diabetes Mellitus.** *South African Journal of Diabetes and Vascular Disease, 9(3), 114-119, 2012.*

NAMJOO, Abdolrasool; MIRVAKILI, Mohammad; SHIRZAD, Hedayatollah; FAGHANI, Mostafa. **Biochemical, liver and renal toxicities of *Melissa officinalis* hydroalcoholic extract on balb/C mice.** *Journal of HerbMed Pharmacology, 2(2), 35-40, 2013.*

NEELAM, Khatkar, A; SHARMA, K. K. **Phenylpropanoids and its derivatives: biological activities and its role in food, pharmaceutical and cosmetic industries.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60(16), 2655-2675, 2020.*

NETO, Mário C; DE VASCONCELOS, Carlos F.; THIJAN, Valerium. N.; CALDAS, Germana F.; ARAUJO, Alice V.; COSTA-SILVA, Antônio; WANDERLEY, Almir. G. **Evaluation of antihyperglycaemic activity of *Calotropis procera* leaves extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats.** *Revista brasileira de farmacognosia, 23(6), 913-919, 2013.*

NIGRO, O; TUZI, A; TARTARO, T; GIAQUINTO, A; VALLINI, I; PINOTTI, G. **Biological effects of verbascoside and its anti-inflammatory activity on oral mucositis: A review of the literature.** *Anti-cancer drugs*, 31(1), 1-5, 2020.

NYAKUDYA, T. T; TSHABALALA, T., DANGAREMBIZI, R., ERLWANGER, K. H; NDHLALA, A. R. **The potential therapeutic value of medicinal plants in the management of metabolic disorders.** *Molecules*, 25(11), 2669, 2020.

OGUNTIBEJU, Oluwafemi O. **Medicinal plants and their effects on diabetic wound healing.** *Veterinary world*, 12(5), 653, 2019.

OKHALE, E; MICHAEL-NWANOSIKE, E; TEMITOPE FATOKUN, O; FOLASHADE-KUNLE, O. **Phytochemistry and ethnopharmacology of *Lippia* genus with a statement on chemotaxonomy and essential oil chemotypes.** *International Journal of Pharmacognosy IJP*, 3(5), 201-211, 2016.

OMBITO, Japheth Omollo; SALANO, Elsie Nyangweso; YEGON, Philemon Kipkirui; Ngetich, Wesley Kipkirui; Mwangi, Elizabeth Muthoni. **"A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (*Verbenaceae* family)."** *J Sci Innov Res* 3.4: 460-466, 2014.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity Acute Toxic Class Method.** Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

PADHI, Santwana; NAYAK, Amit Kumar; BEHERA, Anindita. **Type II Diabetes Mellitus: a review on recent drug based therapeutics.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110708, 2020.

PAHO - Pan American Health Organization. **ENLACE: Data Portal on Noncommunicable Diseases, Mental Health, and External Causes, 2022.** Disponível em: <https://www.paho.org/en/enlace/technical-notes>. Acesso em 23 de Abril de 2024.

PANSARE, Kajal; UPASANI, Chandrashekhar; UPANGALWAR, Aman; SONAWANE, Ganesh; PATIL, Chadrashkhar. **Streptozotocin and alloxan induced diabetic nephropathy: Protective role of natural products.** *Journal of the Maharaja Sayajirao University of Baroda ISSN*, 25, 0422, 2021.

PASCUAL, M. E; SLOWING, K; CARRETERO, E; MATA, D. S; VILLAR, A. ***Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review.** *Journal of ethnopharmacology*, 76(3), 201-214, 2001.

PÉREZ, S.; MECKES, M.; PÉREZ, C.; SUSUNAGA, A.; ZAVALA, M.A. **Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*.** *Journal of ethnopharmacology*, 102(1), 1-4, 2005.

PRETE, Ana Cristina Lo. **Bioquímica metabólica aplicada à nutrição.** Editora Senac São Paulo, 2019. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=MBmsDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT2&dq=Bioqu%20ADmica+metab%20%B3lica+aplicada+%20A0+nutri%20A7%20A3o&ots=q2s8Cw64uA&sig=izJt9d-4GyuypaN1k4abjG131Sk#v=onepage&q=Bioqu%20ADmica%20metab%20B3lica%20aplicada%20A0%20nutri%20A7%20A3o&f=false>. Acesso em setembro de 2023.

PUTNIK, Predrag; BEZUK, Iva Bezuk; BARBA, Francisco J.; LORENZO, Jose M; POLUNIĆ, Iva; BURSAC, Danijela. **Sugar reduction: Stevia rebaudiana Bertoni as a natural sweetener.** In *Agri-food industry strategies for healthy diets and sustainability* (pp. 123-152). Academic Press, 2020.

RAMADAN, Basma, SCHAALAN, Mona; TOLBA, Amina. **Hypoglycemic and pancreatic protective effects of *Portulaca oleracea* extract in alloxan induced diabetic rats.** *BMC complementary and alternative medicine*, 17, 1-10, 2017.

RAMALHO, S; NORTADAS, R. **Anticorpos na Diabetes Mellitus tipo 1.** *Revista Portuguesa de Diabetes*, 16(2), 73-79. 2021. Disponível em http://www.revportdiabetes.com/wp-content/uploads/2021/07/RPD_Junho_2021_ARTIGO-DE-REVISAO_73-79.pdf. Acesso em 28 de Outubro de 2023.

RAMAZANI, Elham; AKABERI, Maryam; EMAMI, Seyed Ahmad; TAYARANI-NAJARAN, Zahra. **Pharmacological and biological effects of alpha-bisabolol: An updated review of the molecular mechanisms.** *Life Sciences*, 120728, 2022.

RASHIDIAN, Amir; FARHANG, Forogh; VAHEDI, Habib; DEHPOUR, Ahmad R.; MEHR, Saeed. E.; MEHRZADI, S; REZAYAT, Seyed Mahdi. **Anticonvulsant effects of *Lippia citriodora* (Verbenaceae) leaves ethanolic extract in mice: role of gabaergic system.** *International journal of preventive medicine*, 7(1), 97, 2016.

RITTER RUAS, Natália; Carvalho Pereira, Aline; Lopes Silva Pereira, Luciana; MESQUITA GERMANO, Carolina; FONTES FERREIRA DA CUNHA, Elaine; ALVES DE CARVALHO, Alexandre; KELLY VILELA BERTOLUCCI, Sylvan. **Inhibition of α -Glycosidase by *Lippia dulcis* Trevir.(Verbenaceae) Preparations, Quantification of Verbascoside, and Study of Its Molecular Docking.** *Chemistry & Biodiversity*, 20(2), e202200760, 2023.

ROCHA, Tainá; ARAÚJO, Diene; DA SILVA, André Maciel; DE OLIVEIRA, Jean Paulo; DE CARVALHO, Alexandre Alves; GAVILANES, Manuel Losada; BERTOLUCCI, Suzan Kelly; ALVES, Eduardo; PINTO, José Eduardo. **Morphoanatomy and changes in antioxidant defense associated with the natural ventilation system of micropropagated *Lippia dulcis* plantlets.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-15, 2022.

ROCHA, Tainá; ARAÚJO, Diene; DE ASSIS, Rafael; DE CARVALHO, Alexandre; BERTOLUCCI, Suzan Kelly; PINTO, José Eduardo. **Establishment and clonal propagation of *Lippia dulcis* Trevir. through in vitro single node cultures.** *Plant Cell Culture & Micropropagation-ISSN 1808-9909*, 19, 19-e190, 2023.

RODRIGUES, Paula Vieira; LEMOS, Bruna Moreira; DA SILVA, Maria Vitória; DE CAMPOS LIMA, Thaís; DE OLIVEIRA SANTOS, Débora; LEMES, Júlia Borges Paes; DA CRUZ LOTUFO, Celina Monteiro. **Alloxan as a better option than streptozotocin for studies involving painful diabetic neuropathy.** *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 112, 107090, 2021.

ROSSANEIS, Mariana Angela; ANDRADE, Selma; GVOZD, Raquel; PISSINATI, Paloma; HADDAD, Maria do Carmo. **Fatores associados ao controle glicêmico de pessoas com Diabetes Mellitus.** *Ciência & Saúde Coletiva*, 24, 997-1005, 2019.

SAEEDI Saravi, S. S., HASANVAND, A., SHAHKARAMI, K., & DEHPOUR, A. R. **The protective potential of metformin against acetaminophen-induced hepatotoxicity in BALB/C mice.** *Pharmaceutical Biology*, 54(12), 2830-2837, 2016.

SALEHI, B.; ATA, A.; V. ANIL KUMAR, N.; SHAROPOV, F.; RAMIREZ-ALARCON, K., RUIZ-ORTEGA, A.; SHARIFI-RAD, J. **Antidiabetic potential of medicinal plants and their active components.** *Biomolecules*, 9(10), 551, 2019.

SCHMITT, Rainer; CAPPI, Michael; POLLNER, Gwendola; GREGER, Veronika. **Key Aroma Compounds in *Lippia dulcis* (Dushi Button).** *J Agric Food Chem.* 66(10):2410-2413. doi: 10.1021/acs.jafc.6b04677. Epub 2016 Dec 5. PMID: 29534573, 2016.

SCHOFIELD, Jonathan; HO, Jan; SORAN, Handrean. **Cardiovascular risk in type 1 Diabetes Mellitus.** *Diabetes Therapy*, 10, 773-789, 2019.

SHAHWAN, Moyad Jamal; JAIROUN, Ammar Abdulrahman; FARAJALLAH, Alla; SHANABLI, Sawsan. **Prevalence of dyslipidemia and factors affecting lipid profile in patients with type 2 diabetes.** *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(4), 2387-2392, 2019.

SHELKE, Vishwadeep; KALE, Ajinath ; KULKARNI, Yogesh. A.; GAIKWAD, Anil. B. **Phloretin: a comprehensive review of its potential against diabetes and associated complications.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, rgae010, 2024.

SHIBABAW, Tewodros; DESSIE, Gashaw; MOLLA, Meseret Derbew; ZERIHUN, Muluken Fekadie; AYELIGN, Birhanu. **Assessment of liver marker enzymes and its association with type 2 Diabetes Mellitus in Northwest Ethiopia.** *BMC research notes*, 12, 1-5, 2019.

SILVA, Andreza Amaral; GONÇALVES, Roberto Calderon. **Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais.** *Ciência Rural*, 40, 994-1002, 2010.

ŠIMONIENĖ, Diana; PLATŪKIENE, Aksana; PRAKAPIENĖ, Edita; RADZEVIČIENĖ, Lina; VELIČKIENE, Džilda. **Insulin resistance in type 1 Diabetes Mellitus and its association with patient's micro-and macrovascular complications, sex hormones, and other clinical data.** *Diabetes Therapy*, 11, 161-174, 2020.

SINGH, Harsimran; SIDHU, Shabir; CHOPRA, Kanwaljit; KHAN, M. U. **Hepatoprotective effect of trans-chalcone on experimentally induced hepatic injury in rats: inhibition of hepatic inflammation and fibrosis.** *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 94(08), 879-887, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES - SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes [Internet]. 2019-2020. Disponível em <https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf>. Acesso em 03 de Novembro de 2023.

SOK YEN, Foo; SHU QIN, Chan., TAN SHI XUAN, Sharryl; JIA YING, Puah., YI LE, H., DARMARAJAN, T; SALVAMANI, Shamala. **Hypoglycemic Effects of Plant Flavonoids: A Review.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021.

TAPSELL, Linda; NEALE, Elizabeth; SATIJA, Ambika; HU, Frank. **Foods, nutrients, and dietary patterns: interconnections and implications for dietary guidelines.** *Advances in Nutrition*, 7(3), 445-454, 2016.

TREVISAN, Maria; MARQUES, Ricardo; SILVA, Maria; SCHERER, Dominique; HAUBNER, Roswitha; ULRICH, Cornelia; OWEN, Robert. **Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: identification, quantitation and antioxidant capacity.** *Records of Natural Products*, 10 (4), 485, 2016.

TROMBETA, Dayanne Castro, PIRES, João Eduardo, DOS SANTOS, Márcio Galdino, SPADACCI-MORENA, Diva Denelle; PIRES, Francisco Airtton. **Avaliação da toxicidade aguda oral do Extrato Hidroalcoólico das folhas de pequi (*Caryocar brasiliense*) em camundongos.** *REVISTA VETERINÁRIA EM FOCO* , 11 (2), 2014.

VARGAS-ARANA, Gabriel; RENGIFO-SALGADO, Elza; SIMIRGIOTIS, Mario. **Potencial antidiabético de plantas medicinales de la amazonía peruana: Una revisión.** *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 22(3), 277-300, 2023.

VILLA- RUANO, Nemésio; CASTRO- JUÁREZ, Carlos J.; LOZOYA- GLORIA, Edmundo; RAMÍREZ- GARCÍA, Sergio Alberto; CRUZ- DURÁN, Ramiro; VARELA- CASELIS, Jenaro Leocádio. **Hernandulcin production in cell suspensions of *Phyla scaberrima*: exploring hernandulcin accumulation through physical and chemical stimuli.** *Chemistry & Biodiversity*, 18(11), e2100611, 2021.

WADOOD, Abdul; GHUFRAN, Meehren, KHAN, Ajmal; AZAM, Syed S.; JELANI, Musharraf; UDDIN, Reaz. **Selective glycosidase inhibitors: a patent review (2012–present).** *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, 111, 82-91, 2018.

YANG, H.J; KIM, H. J; WHANG, Y; CHOI, J.K; LEE, I.S. **Microbial transformation of the sweet sesquiterpene (+)-hernandulcin.** *Natural Product Sciences*, 5(3), 151-153, 1999.
ZHANG, Wei; CHEN, Shiqi; FU, Hualin; SHU, Gangue; TANG, Huaqiao; ZHAO, Xiau; LIN, Juchun. **Hypoglycemic and hypolipidemic activities of phlorizin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd in diabetes rats.** *Food Science & Nutrition*, 9(4), 1989-1996, 2021.

ZHENG, Yan; LEY, Sylvia; HU, Frank. **Global aetiology and epidemiology of type 2 Diabetes Mellitus and its complications.** *Nature reviews endocrinology*, 14(2), 88-98, 2018.