



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

DANIELLE CRISTINE DA CRUZ LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOGLICÊMICA DO OLEO ESSENCIAL DE
FOLHAS DE *Piper marginatum* EM CAMUNDONGOS**

**SANTARÉM - PA
2020**

DANIELLE CRISTINE DA CRUZ LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOGLICÊMICA DO OLEO ESSENCIAL DE
FOLHAS DE *Piper marginatum* EM CAMUNDONGOS**

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.

Área de concentração: Fisiologia geral. **Linha de pesquisa:** Biologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro

Coorientadora: Profa. Dra. Tânia Mara Pires Moraes

**SANTARÉM - PA
2020**

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

L864a Lopes, Danielle Cristine da Cruz
 Avaliação da atividade hipoglicêmica do óleo essencial de folhas de *Piper Mar-*
ginatum em Camundongos. / Danielle Cristine da Cruz Lopes – Santarém, 2020.
 82 p. : il.
 Inclui bibliografias.

Orientadora: Kelly Christina Ferreira Castro

Coorientadora: Tânia Mara Pires Moraes

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-reitoria de Pesquisa, Pós Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

1. Atividade hipoglicêmica. 2. Diabetes. 3. Piperaceae. I. Castro, Kelly Christina Ferreira, *orient.* II. Moraes, Tânia Mara Pires, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 616. 466

DANIELLE CRISTINE DA CRUZ LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOGLICÊMICA DO OLEO ESSENCIAL DE
FOLHAS DE *Piper marginatum* EM CAMUNDONGOS**

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.

Área de concentração: Fisiologia geral. **Linha de pesquisa:** Biologia Experimental.

Conceito: APROVADA

Data de aprovação: 18/12/2020



Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro – Orientadora
Programa de Pós-graduação em Biociências - Universidade Federal do Oeste do Pará



Profa. Dra. Tânia Mara Pires Moraes – Coorientadora
Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal do Oeste do Pará



Profa. Dra. Livia Trindade Lôbo - Avaliadora Externa
Unifamaz – Centro Universitário Metropolitano da Amazônia



Profa. Dra. Gabriela Bianchi dos Santos – Avaliadora Externa
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Oeste do Pará

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser meu fortalecedor, meu protetor, meu auxílio bem presente diante das angústias.

Àos meus pais, Orbélio e Maria de Nazaré, por sempre estarem ao meu lado e me ajudando no que for preciso, principalmente no cuidado com meu filho mais velho enquanto eu estava ausente por conta das aulas ou do experimento.

À meu esposo, Adan, que sempre esteve me apoiando e por não deixar desistir. Aos meus filhos, Johann e Heloísa. Fiquei grávida em um momento complicado do mestrado, e conciliar com o trabalho, se tornou ainda mais difícil, mas meu bebê nasceu e me trouxe alegria. Foi uma solução quando pensei que seria um problema.

À professora Kelly Christina Ferreira Castro por ter aceitado meu convite para ser minha orientadora. Serei sempre grata a ela porque quando eu não acreditava que seria possível, ela vinha com a calma em forma de música.

À professora Tânia Mara Pires Moraes por todo o apoio, disponibilidade e colaboração com o projeto. Sou grata até pelas broncas porque me fez amadurecer.

Aos alunos Kennedy, Karine, Lúcia pelo apoio no desenvolvimento do experimento.

Aos técnicos do Biotério da UEPA, Arilda e Hermam pela paciência e parceria.

*À Deus por ter me sustentado até aqui e
aos familiares pelo apoio.*

“Calma, calma, não se preocupe, tenha calma.
Calma, calma, eu dedico esse refrão pra sua alma”.
(Leandro Borges)

RESUMO

O Diabetes Mellitus é a condição crônica que mais cresce, principalmente nos países em desenvolvimento. Considerando o crescente número de casos de diabetes, altos custos relacionados ao seu controle, o tratamento de suas complicações, inúmeros efeitos colaterais causados pelos medicamentos orais e injetáveis e pela espécie *Piper marginatum* ser incidente na região, esse estudo objetivou avaliar a atividade hipoglicemiante do óleo essencial de folhas de *P. marginatum* em camundongos. O projeto de dissertação foi submetido à Comissão de Ética no uso de Animais da UFOPA – CEUA/UFOPA tendo sido aprovado sob o protocolo nº 1120180048/2019. Para a avaliação da toxicidade oral aguda foram submetidos ao experimento 12 camundongos fêmeas, isogênicos da linhagem Swiss, os quais foram divididos em grupo controle e grupo teste no qual receberam o óleo essencial (OE) de folhas de *P. marginatum* na concentração única de 2000mg/kg e observados por 14 dias, seguindo o protocolo OECD 423/2001. Para verificar a ação do OE de *P. marginatum*, os níveis glicêmicos foram mensurados em 36 camundongos machos Swiss e as concentrações de 100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 400 mg/Kg administradas por gavagem durante 20 dias. Foram avaliados glicemia, consumo de água e de ração, peso corpóreo e parâmetros bioquímicos. O OE foi obtido por hidrodestilação em aparelho Clevenger e a sua caracterização química por Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM). Na composição química foram identificados um total de quarenta e três compostos, sendo os majoritários: 3-Carene (13,28%), seguido pelo Cariofileno (12,57%), Copaeno (9,50%), 3,4-metilenodioxipropiofenona (7,96%), Elixeno (6,02%), β -Cubebeno (5,60%). Em relação a toxicidade oral aguda os camundongos apresentaram ganho de peso corpóreo e ausência de sintomas ou sinais clínicos de intoxicação e de óbito. Na avaliação glicêmica, o OE de folhas de *P. marginatum* não apresentou atividade antidiabética por manter a hiperglicemia nos camundongos tratados com o óleo até o final do experimento. Além disso, durante os 20 dias os camundongos apresentaram polidipsia, polifagia e emagrecimento. Na avaliação bioquímica, a Alanina aminotransferase (ALT) e a creatinina não apresentaram alterações significativas, com exceção da uréia que apresentou valores 2,2 vezes maior em relação ao grupo controle não diabético. O marcador hepático Aspartato aminotransferase (AST) dos animais tratados com o OE de folhas de *P. marginatum*

diminuíram gradativamente a medida que a dose em mg/Kg era aumentada. Esses resultados mostraram que embora o OE de folhas de *P. marginatum* não tenha apresentado um efeito satisfatório na redução da glicemia nos modelos experimentais, acredita-se que os resultados desta pesquisa contribuíram para o conhecimento toxicológico da espécie estudada, pois não demonstrou toxicidade ao ser administrada por via oral. Por isso, faz-se necessário investir em mais estudos experimentais e com abordagem in vitro a fim de identificar potencial biológico e complementar as informações apresentadas neste estudo.

Palavras-chave: Atividade hipoglicêmica. Diabetes. Piperaceae.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is the fastest growing chronic condition, especially in developing countries. Considering the growing number of diabetes cases, high costs related to its control, treatment of its complications, numerous side effects caused by oral and injectable medications and by the *Piper marginatum* species being incident in the region, this study aimed to evaluate the oil's hypoglycemic activity of leaves of *P. marginatum* in mice. The dissertation project was submitted to the Ethics Committee on the Use of Animals at UFOPA - CEUA / UFOPA and was approved under protocol No. 1120180048/2019. For the evaluation of acute oral toxicity, 12 female mice, isogenic from the *Swiss* strain, were submitted to the experiment, which were divided into a control group and a test group in which they received the essential oil (OE) of leaves from *P. marginatum* in a single concentration of 2000mg / kg and observed for 14 days, following the protocol OECD 423/2001. To verify the action of the OE of *P. marginatum*, glycemic levels were measured in 36 male *Swiss* mice and concentrations of 100 mg / kg, 200 mg / kg and 400 mg / kg administered by gavage for 20 days. Blood glucose, water and feed intake, body weight and biochemical parameters were evaluated. The OE was obtained by hydrodistillation in Clevenger apparatus and chemical characterization by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-EM). In the chemical composition, a total of forty-three compounds were identified, the major ones being: 3-Carene (13.28%), followed by Karyophyllene (12.57%), Copaene (9.50%), 3,4-methylenedioxypropiofenone (7.96%), Elixene (6.02%), β -Cubebene (5.60%). Regarding acute oral toxicity, the mice showed body weight gain and absence of symptoms or clinical signs of intoxication and death. In the glycemic evaluation, the OE of leaves from *P. marginatum* did not show antidiabetic activity as it maintained hyperglycemia in the mice treated with the oil until the end of the experiment. In addition, during the 20 days the mice showed polydipsia, polyphagia and weight loss. In the biochemical evaluation, Alanine aminotransferase (ALT) and creatinine showed no significant changes, with the exception of urea, which presented values 2.2 times higher in relation to the non-diabetic control group. The hepatic marker Aspartate aminotransferase (AST) of the animals treated with the OE of leaves from *P. marginatum* gradually decreased as the dose in mg / kg was increased. These results showed that although the OE of leaves from *P. marginatum* did not have a satisfactory effect in reducing glycemia in

experimental models, it is believed that the results of this research contributed to the toxicological knowledge of the species studied, as it did not demonstrate toxicity when administered orally. Therefore, it is necessary to invest in more experimental studies with an in vitro approach in order to identify biological potential and complement the information presented in this study.

Keywords: Hypoglycemic activity. Diabetes. Piperaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de distribuição pantropical das espécies pertencentes à família Piperaceae	32
Figura 2 – Mapa de distribuição geográfica no Brasil das espécies pertencentes à família Piperaceae	33
Figura 3 – Espécie de <i>Piper marginatum</i>	34
Figura 4 – Espécie de <i>Piper marginatum</i> em estufa a 40°C.	39
Figura 5 – Extração de óleo essencial de folhas <i>Piper marginatum</i> pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger.....	40
Figura 6 – Fluxograma de ensaio para teste de toxicidade oral aguda.....	42
Figura 7 – Punção Cardíaca.....	48
Figura 8 – Analisador automático	48
Figura 9 – Administração por gavagem	53
Figura 10 – Glicemia em jejum (mg/dL) de camundongos Swiss (n:6) dos grupos controles e experimentais no período de acompanhamento: pré indução, pós indução e no 3° dia, 10° dia e 20° dia de tratamento. Dados expressos em Média ± Desvio padrão da média, ANOVA de duas vias seguido de <i>post test Tukey</i> , $p<0,05$	56
Figura 11 – Peso corporal (g) de camundongos Swiss (n:6) dos grupos controles e experimentais no período de acompanhamento: pré indução, pós indução e a cada 3 dias de tratamento. Dados expressos em Média ± Desvio padrão da média, ANOVA de duas vias seguido de <i>post test Tukey</i> , $p<0,05$	57
Figura 12 – A ingesta hídrica (mL) de camundongos Swiss (n:6) dos grupos controles e experimentais no período de acompanhamento: pré indução, pós indução e no 3° dia, 10° dia e 20° dia de tratamento. Dados expressos em Média ± Desvio padrão da média, ANOVA de duas vias seguido de <i>post test Tukey</i> , $p<0,05$	58
Figura 13 – Ingesta alimentar (g) de camundongos Swiss (n:6) dos grupos controles e experimentais no período de acompanhamento: pré indução, pós indução e no 3° dia, 10° dia e 20° dia de tratamento. Dados expressos em Média ± Desvio padrão da média, ANOVA de duas vias seguido de <i>post test Tukey</i> , $p<0,05$	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores glicêmicos para o diagnóstico de diabetes e pré-diabetes.....	22
Tabela 2 - Triagem e Diagnóstico de DMG.....	23
Tabela 3 - Principais efeitos adversos dos hipoglicemiantes orais e insulinas.	26
Tabela 4 - Prevalência de plantas medicinais utilizadas como hipoglicemiante	30
Tabela 5 – Rendimento dos óleos essenciais de folhas de <i>Piper marginatum</i> nos meses de setembro de 2018 (1), janeiro (2) e abril (3) de 2019	50
Tabela 6 – Composição Química do óleo essencial de folhas de <i>Piper marginatum</i> , destacando como componentes majoritários (*) aqueles acima de 5%.....	51
Tabela 7 – Sinais e sintomas apresentados pelos camundongos Swiss fêmeas expostos oralmente ao veículo e ao óleo essencial de folhas de <i>Piper marginatum</i> na concentração de 2000 mg/Kg.....	54
Tabela 8 – Média do peso de camundongos Swiss fêmeas expostos oralmente ao veículo e ao OE de folhas de <i>Piper marginatum</i> na concentração de 2000 mg/Kg. Dados expressos em Média ± Erro padrão da média, ANOVA de duas vias seguido de <i>post test Tukey</i> , $p < 0,05$	55
Tabela 9 – Parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss (n:6) expostos oralmente ao veículo e ao óleo essencial de folhas de <i>Piper marginatum</i> nas concentrações de 100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 400 mg/Kg. Dados expressos em Média ± Erro padrão da média, ANOVA de duas vias seguido de <i>post test Tukey</i> , $p < 0,05$.	60

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotranferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG - EM	Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CEUA	Comitê de Ética no uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus 1
DM2	Diabetes Mellitus 2
eV	Elétron – Volts
GAD65	Anticorpo contra a isoforma de 65 KDa da Descarboxilase do Ácido Glutâmico
GHS	Globally Harmonized Classification System
HbA1c	Hemoglobina Glicada A1c
HDL	High Density Lipoproteins
HSTM	Herbário da Universidade Federal do Oeste do Pará
IDF	International Diabetes Federation
ICA	Anticorpos anti-ilhotas pancreáticas
IAA	Anticorpos anti-insulina
IR	Índice de retenção
LDL	Low Density Lipoproteins
MS	Ministério da Saúde
mg/kg	Miligrama/quilograma
MIC	Concentração inibitória mínima
mL	Mililitro
m/z	Relação massa/carga
mm	Milimetro
mg/dL	Miligrama/Decilitro

NPH	Neutral Protamine Hagedorn
NIST	National Institute of Standards and Technology
NaCl	Cloreto de Sódio
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
OMS	Organização Mundial de Saúde
PE	Pernambuco
pH	Potencial de Hidrogênio
P&DBIO	Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Bioativos
rpm	Rotação por minuto
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará
UEPA	Universidade do Estado do Pará
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1 Diabetes mellitus	19
2.1.1 Epidemiologia do DM	20
2.1.2 Diagnóstico do DM	21
2.1.3 Complicações do DM	24
2.1.4 Tratamento do DM	25
2.2 Plantas medicinais	27
2.3 Plantas medicinais usadas no diabetes	28
2.4 Família Piperaceae e o gênero <i>Piper</i>	32
2.4.1 <i>Piper marginatum</i>	34
2.4.2 Descrição botânica	34
2.4.3 Aspectos fitoquímicos	35
2.4.4 Aspectos etnofarmacológicos	35
3. OBJETIVOS	38
3.1 Geral	38
3.2 Específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Material Botânico	39
4.2 Extração do óleo essencial	40
4.3 Caracterização química do óleo essencial de folhas de <i>Piper marginatum</i>	41
4.4 Animais	41
4.5 Toxicidade oral aguda	42
4.6 Indução do diabetes experimental	43
4.7 Planejamento experimental	45
4.8 Método aplicado no tratamento	45
4.9 Avaliação da glicemia em jejum	46

4.10 Avaliação dos parâmetros fisiológicos	47
4.11 Avaliação da função renal e hepática	47
4.12 Análise Estatística	49
5. RESULTADOS	50
5.1 Rendimento do óleo essencial de folhas de <i>Piper marginatum</i>.....	50
5.2 Caracterização química do óleo essencial de folhas de <i>Piper marginatum</i>	50
5.3 Avaliação da toxicidade oral aguda do óleo essencial de folhas de <i>Piper marginatum</i> em camundongos.	53
5.4 Avaliação da Glicemia em jejum dos camundongos	55
5.5 Avaliação do peso corporal dos camundongos.	56
5.6 Avaliação da ingesta hídrica dos camundongos	57
5.7 Avaliação da ingesta alimentar dos camundongos	58
5.8 Avaliação das funções hepáticas e renais	59
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS.....	83

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é a condição crônica que mais cresce, principalmente nos países em desenvolvimento. Destaca-se pela gravidade das suas complicações, além de ser considerado um problema de saúde pública em virtude do crescimento e envelhecimento populacional, da crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevivência das pessoas com diabetes (WHITING, 2011).

Segundo a International Diabetes Federation (IDF, 2019), a prevalência do DM no mundo, para o ano de 2019 e prevista para 2045, mostra valores alarmantes: sendo que em 2019, 463 milhões de pessoas já foram diagnosticadas com DM e a projeção para 2045 é que este número aumente para 700 milhões.

O Brasil, considerado o 5º país no mundo com diabetes, apresenta estimativas de que até 2045 aproximadamente 26 milhões de adultos (20-79 anos) serão diabéticos, sendo que em 2019 foram 16,8 milhões de adultos diagnosticados com DM (SBD, 2019).

De acordo com a Secretaria Municipal de Saúde (2019), até 2019, o município de Santarém cadastrou 8.421 diabéticos, sendo que 3.899 são pacientes com DM tipo 2, 3.692 apresentam diabetes e hipertensão e 830 são pacientes que fazem uso de insulina nas Estratégias de Saúde da Família.

O DM tipo 1 é caracterizado por distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas devido a destruição da célula beta e consequente deficiência na produção de insulina pelo pâncreas e o DM tipo 2 pelo aumento na resistência à insulina em tecidos periféricos, principalmente no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, causando prejuízos na captação de glicose e aumento dos níveis hepáticos de glicose (OLOFSSON; MARLUND; BEHNDIG, 2009).

A prevalência do DM tipo 2 na população abrange cerca de 90% dos casos de diabetes, sendo seguido em frequência pelo DM tipo 1, que responde por aproximadamente 8%. Além desses tipos, o diabetes gestacional também merece destaque, devido a seu impacto na saúde da gestante e do feto (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

Os custos totais estimados para 16 milhões de adultos portadores de diabetes no Brasil no ano de 2019 foram cerca de 50 bilhões de dólares, sendo que a China

com 115 milhões de adultos com diabetes gastou 45 bilhões de dólares (IDF, 2019). Os gastos se dão em torno de custos com medicamentos antidiabéticos que por sua vez causam efeitos adversos, são dispendiosos e de difícil acesso as regiões mais longínquas, somado a isso, tem o tratamento ambulatorial e hospitalar e custos indiretos com a aposentadoria precoce por conta de sequelas.

Diante disso, as pessoas recorrem às plantas com propriedades medicinais. No entanto, a maioria não tem comprovação científica sobre suas propriedades medicinais, além disso, também são poucos os estudos sobre a segurança das plantas, podendo causar toxicidade. Algumas destas substâncias podem ter potencial terapêutico, enquanto outras podem produzir hipoglicemia como efeito colateral devido à sua toxicidade, especialmente hepatotoxicidade (NEGRI, 2005).

Nesse sentido, o Ministério da Saúde (MS) com a intenção de implantar a utilização das terapias complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e promover pesquisas com as plantas medicinais, garantindo assim, o uso correto e seguro destas e de fitoterápicos, elaborou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada pelo Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006).

A busca de substâncias bioativas provenientes de plantas ou de substâncias isoladas pode ser considerada uma alternativa para o tratamento de doenças que atinge a população. Assim sendo, é importante a realização de estudos etnofarmacológicos para que o conhecimento tradicional seja devidamente resgatado, preservado e utilizado como subsídio de pesquisa com plantas medicinais (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Entre as espécies utilizadas em estudos está as pertencentes a Família Piperaceae. Kumar et al. (2013) apontaram a redução da glicemia nas concentrações de 100 e 200 mg/Kg do óleo de *Piper longum*. O extrato das folhas de *Piper marginatum* tem sido usado na medicina popular para tratar doenças hepáticas e doenças da vesícula e também como tônico e antiespasmódico (BERG, 2010). No Brasil tem sido usado para aliviar o prurido causado por picadas de insetos (PEREIRA et al., 2011).

Considerando a alta incidência da espécie *P.marginatum* na região Norte, o uso hipoglicêmico de espécies da Família Piperaceae, além, do crescente número de casos de diabetes, altos custos relacionados ao seu controle e o tratamento de

suas complicações buscou-se avaliar a atividade hipoglicemiante do óleo essencial de folhas de *P. marginatum* em camundongos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Diabetes mellitus

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica caracterizada por distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas devido à deficiência na produção de insulina pelo pâncreas e/ou ao aumento na resistência à insulina em tecidos periféricos, principalmente no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, causando prejuízos na captação de glicose e aumento dos níveis hepáticos de glicose (OLOFSSON; MARLUND; BEHNDIG, 2009).

O aumento da prevalência de diabetes, principalmente em países desenvolvidos, deve-se, sobretudo, ao crescimento e envelhecimento populacional, maior urbanização, aumento dos hábitos não saudáveis, assim como aumento da obesidade e do sedentarismo (FERREIRA; FERREIRA, 2009). Além dos fatores mencionados, a Sociedade Brasileira de Diabetes (2019) por meio de estudo considera também o tempo de escolaridade do indivíduo acima de 18 anos, ou seja, quanto menor o período (anos) de estudo maior a prevalência de DM.

No Brasil, assim como em muitas outras localidades, o DM está sendo reconhecido como um importante problema de Saúde Pública, principalmente nos países em desenvolvimento, onde tem ocupado um percentual de 30 a 40% das causas de morbidade entre adultos. Nesse sentido, o Global Burden of Disease (2017) destaca que entre as causas de morte relacionada a doenças crônicas não transmissíveis, o diabetes no Brasil, ocupou em 1990 o 11º no ranking e em 2017 passou a ocupar o 3º lugar, atrás somente de doenças cardiovasculares e neoplasias.

Os termos „Diabetes Mellitus insulino dependente“ e „Diabetes Mellitus insulino independente“ não são mais utilizados como ordem classificatória, pois de acordo com a classificação atual de DM proposta pela OMS e *American Diabetes Association* (ADA), baseia-se na etiologia, e não no tipo de tratamento. A atual classificação inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional (MILECH et al., 2016).

O DM1 ocorre devido à deficiência absoluta na produção de insulina, em geral ocasionada por processo autoimune, que leva à destruição das células beta das ilhotas de Langherans, as células produtoras de insulina. Pacientes com este tipo de diabetes dependem de tratamento com insulina exógena para a sustentação da vida. A maioria destes indivíduos desenvolvem anticorpos anti-ilhota pancreática (ICA), anticorpos anti-insulina (IAA), anticorpo contra a isoforma de 65 KDa da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65) e antígenos associados ao insulinoma 1A-2A. Alguns indivíduos diabéticos com características do DM1 não possuem evidências de autoimunidade e são classificados como do tipo 1 idiopático. A maior incidência do DM1 ocorre na infância e na adolescência (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

O DM2, com maior incidência em adultos, deve-se à deficiência relativa na produção pancreática de insulina associada à redução da sensibilidade dos tecidos ao hormônio, também conhecida como resistência periférica à insulina. A resistência insulínica ocorre quando uma concentração normal desse hormônio produz uma resposta biológica inadequada nos tecidos periféricos, como o tecido adiposo e muscular. Essa resistência periférica à insulina ocorre por vários fatores como por defeito na ação da insulina em função do número menor de receptores ou afinidade menor destes pela insulina, redução na quantidade de proteínas transportadoras de glicose ou na translocação destas do citoplasma para a membrana, sendo esta última considerada a mais importante. A transição da resistência insulínica para o DM é determinada principalmente pela incapacidade do pâncreas em aumentar a secreção da insulina adequadamente em resposta à hiperglicemia (MCLELLAN et al., 2007).

A Diabetes gestacional é qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. Segundo o IDF (2019) a prevalência da hiperglicemia na gestação se dá em torno de 14% e nas gestantes com faixa etária de 45 a 49 anos. Na maioria dos casos, há reversão para a tolerância normal após a gravidez, porém há de 10 a 63% de risco de desenvolver DM2 dentro de cinco a 16 anos após o parto (KIM, NEWTON e KNOOP, 2002).

2.1.1 Epidemiologia do DM

A prevalência do DM no mundo, em 2019 e prevista para 2045, mostra valores alarmantes: sendo que em 2019, 463 milhões de pessoas já foram diagnosticadas com DM e a projeção para 2045 é que este número aumente para 700 milhões (IDF, 2019).

A estimativa mais alarmante está relacionada ao continente africano com aumento de 143%, de 19 milhões em 2019 para 47 milhões em 2045. Tais projeções podem estar associadas aos baixos índices de desenvolvimento no país. Esses estudos realizados pelo International Diabetes Federation (2019) também apontam aumento de 55% de números de pessoas (20-79 anos) com diabetes na América do Sul e Central, aumentando de 32 milhões em 2019 para 49 milhões em 2045.

O Brasil, considerado o 5º país no mundo com diabetes, apresenta estimativas que até 2045 aproximadamente 26 milhões de adultos (20-79 anos) serão diabéticos, sendo que em 2019 16,8 milhões de adultos foram diagnosticados com DM. Em contrapartida, na faixa etária entre 0 a 14 anos, o Brasil apresenta cerca de 51.500 indivíduos diagnosticados com diabetes tipo 1, atrás somente da Índia e Estados Unidos (SBD, 2019).

O município de Santarém apresenta 8.421 diabéticos, número que corresponde 2,76% da população, sendo que 3.899 são pacientes com DM tipo 2, 3.692 são diabético/hipertenso e 830 são pessoas que fazem uso de insulina e acompanhados nas Estratégias de Saúde da Família, o total de diabéticos corresponde 2,76% da população (SEMSA, 2019).

2.1.2 Diagnóstico do DM

O diagnóstico é realizado pela detecção de hiperglicemia segundo os critérios de valores glicêmicos (Tabela 1) e dos sinais e sintomas característicos “quatro P’s”: poliúria, polidipsia, polifagia e perda inexplicada de peso. Embora possam estar presentes no DM tipo 2, esses sinais são mais agudos no tipo 1, podendo progredir para cetose, desidratação e acidose metabólica, especialmente na presença de estresse agudo. Sintomas mais vagos também podem estar presentes, como prurido, visão turva e fadiga (BRASIL, 2013).

Tabela 1 – Valores glicêmicos para o diagnóstico de diabetes e pré-diabetes.

Exame	Pré-Diabetes	Diabetes Mellitus
Glicemia de jejum	100 - 125 mg/dL	≥ 126 mg/dL
Glicemia ao acaso	-	≥ 200 mg/dL
Glicemia 2 h após sobrecarga com 75 g de glicose (TTG):	140 - 199 mg/dL	≥200 mg/dL
A1C	5,7% - 6,4%	≥ 6,5%

Fonte: American Diabetes Association, 2018.

Para se considerar um paciente portador de DM, devem ser obtidos valores de glicemia de jejum (de 8 a 12h) acima de 126 mg/dL ou quando ocorrer positividade no parâmetro nos testes de glicemia ao acaso, Teste de tolerância à glicose (TTG) e hemoglobina glicada. É importante destacar que a glicemia ao acaso é realizada em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia.

No entanto, a presença de índice glicêmico entre 100 mg/dL à 126 mg/dL os resultados devem ser confirmados com o teste de TTG, que consiste na ingestão de 75 g de glicose anidra dissolvida em água, seguida de uma coleta de sangue após 2 horas de ingestão dessa glicose.

A hemoglobina glicada, também conhecida como glico-hemoglobina e pelas siglas A1C e HbA1C, é um teste muito importante para avaliar o controle glicêmico de médio prazo. Como a glicose circulante liga-se a algumas proteínas do organismo, numa média que é diretamente proporcional aos níveis de glicemia (“glicação”); quanto maiores forem os níveis de glicose circulante, maior será o percentual de ligação dessa glicose com a hemoglobina. O resultado do teste é expresso em porcentagem, indicando o percentual de hemoglobina que se encontra ligada à glicose (BRASIL, 2013).

Um grupo importante a ser destacado são as gestantes, uma vez que tornam-se vulneráveis a desenvolver Diabetes mellitus gestacional (DMG) e por isso o acompanhamento no Pré Natal deve ser voltado ao controle do peso e alimentação saudável, evitando complicações para mãe e feto.

Tabela 2 - Triagem e Diagnóstico de DMG

Exame	Tempo	DMG
Uma etapa TTGO de 75g (em jejum)	Jejum	≥92 mg/dL (5,1 mmol/L)
	1 h	≥180 mg/dL (10,0 mmol/L)
	2 h	≥153 mg/dL (8,5 mmol/L)
Duas etapas (1) TTGO de 50g (sem jejum) (2) TTGO 100g (em jejum)	1 h	≥130 mg/dL (7,2 mmol/L)
	Jejum	≥95 mg/dL (5,3 mmol/L)
	1 h	≥180 mg/dL (10,0 mmol/L)
	2 h	≥155 mg/dL (8,6 mmol/L)
	3 h	≥140 mg/dL (7,8 mmol/L)

Fonte: American Diabetes Association, 2018.

O exame de TTGO é indicado para gestante de 24 a 28 semanas que apresentem fatores de riscos para desenvolver DMG. Na estratégia com apenas uma etapa é realizada a administração de 75g de glicose com medição de glicose no plasma em jejum às 1 e 2 h. O diagnóstico de DMG é feito quando qualquer um dos seguintes valores (Tabela 2) de glicose no plasma é atingido ou excedido.

No entanto, na estratégia duas etapas, é realizada primeiramente a administração de 50g de glicose na gestante sem precisar estar em jejum. A medição de glicose no plasma ocorre após 1 h, assim, quando a glicemia for maior ou igual a 130mg/dL é indicado realizar o TTGO 100g. Para isso a gestante precisa estar em jejum, dessa forma, o diagnóstico de DMG será quando dois dos quatro níveis de glicemia forem atingidos.

Ao longo do tempo, ambos os tipos de diabetes levam a sérias complicações no organismo, que incluem nefropatia, retinopatia, neuropatia, dislipidemia e doenças cardiovasculares (GHORBANI et al., 2010). Por isso, se faz necessário que os pacientes considerados pré-diabéticos adotem novo estilo de vida, incluindo alimentação saudável e prática de atividade física a fim de prevenir a DM2.

2.1.3 Complicações do DM

As complicações do DM incluem cegueira, insuficiência renal e amputações de membros, sendo responsável por gastos expressivos em saúde, além de substancial redução da capacidade de trabalho e da expectativa de vida (SCHMIDT et al., 2010). As complicações do DM podem ser classificadas em complicações agudas (hipoglicemia, hiperglicemia, cetoacidose e coma hiperosmolar), crônicas ou microvasculares, como a retinopatia, a nefropatia, e a neuropatia diabéticas; e complicações macrovasculares, como o acidente vascular cerebral.

A cetoacidose considerada uma emergência endocrinológica decorrente da deficiência absoluta ou relativa de insulina, potencialmente letal, com mortalidade em torno de 5%. A cetoacidose ocorre principalmente em pacientes com DM tipo 1, sendo, diversas vezes, a primeira manifestação da doença. A pessoa com DM tipo 2, que mantém uma reserva pancreática de insulina, raramente desenvolve essa complicação (BRASIL, 2013).

A nefropatia diabética é uma complicação microvascular do diabetes associada com morte prematura por uremia ou problemas cardiovasculares. É a principal causa de doença renal crônica em pacientes que ingressam em serviços de diálise (BRUNO, 2000).

Além das alterações renais, o DM também pode produzir complicação hepática devido à insulinoresistência e hiperinsulinemia que despoletam mecanismos que induzem à inflamação e fibrose hepática. A incidência de fígado gordo não alcoólico (FGNA) e hepatocarcinoma é significativamente superior em diabéticos comparados com não diabéticos, este risco é duas vezes superior e independente de outros fatores (demográficos, álcool, vírus) (EL-SERAG, 2002)

A neuropatia diabética apresenta um quadro variado, com múltiplos sinais e sintomas. A neuropatia sensitivo-motora é a mais comum neuropatia diabética periférica e apresenta três estágios: inicial, sintomático e grave. O estágio inicial é, em geral, assintomático, mas pode haver diminuição de sensibilidade. O período sintomático é caracterizado por perda de sensibilidade, dormência e, muitas vezes, parestesias e/ou dor. O estágio grave apresenta envolvimento motor com limitação funcional e com potencial para ulceração nos membros inferiores (BRASIL, 2013).

2.1.4 Tratamento do DM

O tratamento do DM tipo 1, além da terapia não farmacológica, exige sempre a administração de insulina, a qual deve ser prescrita em esquema intensivo, de três a quatro doses de insulina/dia, divididas em insulina basal e insulina prandial, cujas doses são ajustadas de acordo com as glicemias capilares, realizadas ao menos três vezes ao dia (DUNCAN, 2013).

Existem duas classes de insulinoterapia as insulinas de ação rápida ou intermediária. A insulina de ação rápida, como a insulina regular, é a que possui a ação mais rápida e curta. Este tipo de insulina frequentemente começa a diminuir a concentração sérica de glicose em 20 minutos, atinge a atividade máxima em 2 a 4 horas e sua ação dura 6 a 8 horas (NEGRI, 2005).

A insulina NPH de ação intermediária como a de zinco em suspensão ou insulina isófano em suspensão, de pH neutro e acrescida de protamina para modificar o tempo de ação começa a agir em 1 a 3 horas, atinge a atividade máxima em 6 a 10 horas e sua ação dura 18 a 26 horas. Esse tipo de insulina pode ser utilizada pela manhã, para dar cobertura durante a primeira parte do dia, ou ao entardecer, para prover a quantidade necessária durante a noite (PASSOS; BARRETO; DINIZ, 2005).

A insulina também é considerada uma terapia farmacológica no diabetes tipo 2 quando os níveis de glicose plasmática estiverem descompensados, na primeira avaliação ou no momento do diagnóstico, principalmente se acompanhado de perda de peso, cetonúria e cetonemia (GUSSO; LOPES, 2012).

Atualmente, ao lado da insulina, os medicamentos mais utilizados para diabetes são hipoglicemiantes orais, como as biguanidas (metformina), sulfoniluréias (glibenclamida, gliclazida), inibidores da alfa- glicosidase, agonistas da incretina e inibidores da dipeptidil peptidase-4 (LORENZATI et al., 2010).

Os antidiabéticos orais constituem-se a primeira escolha para o tratamento do DM tipo 2 não responsivo a medidas não farmacológicas isoladas, uma vez que promovem, com controle estrito, redução na incidência de complicações, têm boa aceitação pelos pacientes, simplicidade de prescrição e levam a menor aumento de peso em comparação à insulina (GUSSO; LOPES, 2012).

Embora os medicamentos orais sejam bem aceitos pelos pacientes diabéticos há reações indesejadas (Tabela 3), e isso inclui para quem faz uso de insulina.

Tabela 3 - Principais efeitos adversos dos hipoglicemiantes orais e insulinas.

Denominação genérica	Efeitos adversos
Cloridrato de Metformina	Hipotensão postural, hipertensão de rebote na retirada, sedação, distúrbio do sono, cefaléia, vertigens e tonturas, depressão, sinais e sintomas psicóticos, diminuição da libido, xerostomia, hepatotoxicidade, anemia hemolítica, febre.
Glibenclamida	Hipoglicemia, particularmente em idosos, distúrbios gastrintestinais, cefaléia, reações cutâneas, distúrbios hepáticos, alterações hematológicas, aumento de peso. Hipersensibilidade pode ocorrer nas seis primeiras semanas de tratamento.
Gliclazida	Hipoglicemia, particularmente em idosos, distúrbios gastrintestinais, reações cutâneas, distúrbios hepáticos.
Insulina (NPH e Regular)	Hipoglicemia, aumento de peso, edema, hipersensibilidade cutânea, reação no local de aplicação.

Fonte: BRASIL, 2010.

A metformina é um derivado da biguanida, um composto hipoglicemiante proveniente da planta *Galega officinalis*. No fígado, este medicamento promove a inibição da produção de glicose, na musculatura esquelética aumenta a captação da glicose promovendo redução da glicemia plasmática, e melhora a afinidade dos receptores de insulina (RANG et al., 2003). Além de reduzir o nível da glicemia, com uma redução média de 1,5% em média na Hb1Ac, a metformina também diminui os triglicerídeos, provoca pequena diminuição do LDL e aumento muito modesto no HDL (MCCULLOCOCH, 2011).

As sulfoniluréias exercem sua principal função sobre as células beta, estimulando a secreção de insulina e reduzindo o nível plasmático de glicose (RANG et al., 2003) e a HbA1C entre 1% e 2%. A glibenclamida e a glicazida são as sulfoniluréias disponíveis no SUS. A glibenclamida e a glicazida possuem eficácia,

toxicidade e farmacocinética similares, sendo praticamente intercambiáveis (BRASIL, 2010).

Contudo, é cada vez mais comum os pacientes diabéticos associarem o tratamento com hipoglicemiantes orais e injetáveis com o uso de plantas medicinais a fim de obter um melhor controle glicêmico. No entanto, essa associação pode promover eventos adversos indesejados, por isso a necessidade de conhecer a propriedade das plantas medicinais.

2.2 Plantas medicinais

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta com cerca de 23% das espécies vegetais existentes em todo o mundo (BATALHA et al., 2003) o que, associado à uma rica diversidade étnica e cultural, detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais e tem o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas que resultem em tecnologias e terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2006).

A biodiversidade do país contribuiu para que o uso das plantas medicinais fosse considerado um campo estratégico para o Brasil, cujo maior potencial econômico da biodiversidade está na descoberta de novos fitoterápicos derivadas diretamente ou sintetizadas a partir de recursos biológicos (BRITO, 2010).

Nesse sentido, existem medicamentos fitoterápicos, por exemplo, o Imunomax que utiliza diretamente o óleo essencial obtido da planta unha-de-gato (*Uncaria tomentosa* Willd. ex Schult. DC.) como princípio ativo original dos vegetais (RUPPELT et al, 2018).

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65 a 80% da população de países em desenvolvimento dependiam de fitoterápicos como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005).

Plantas são utilizadas na medicina popular com a finalidade de tratar o DM (VOLPATO et al., 2002) e representa uma alternativa viável para o controle desta doença. Dados etnobotânicos relatam que cerca de 800 plantas com potencial antidiabético apresentaram resultados positivos em ensaios experimentais

(GROVER et al., 2002). Apesar do frequente uso das plantas medicinais se faz necessários mais estudos científicos nessa área a fim de comprovar a eficácia das espécies de plantas.

As propriedades benéficas encontradas em algumas plantas, tais como: o controle do metabolismo de carboidratos, liberação da insulina, prevenção e restauração da integração e função das células pancreáticas, a melhora da captação e utilização da glicose, torna essas plantas excelentes fontes de pesquisa como modelo terapêutico (ROCHA et al., 2006).

A busca por novos métodos de tratamento utilizando espécies de plantas medicinais para o tratamento de determinadas doenças tem sido alvo de pesquisas. Diante disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define que os fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal e assim como todo medicamento, deve oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população (BRASIL, 2009).

O objetivo da ação fitoterápica não é substituir medicamentos registrados e comercializados por laboratórios, mas sim atuar como uma alternativa terapêutica aos usuários do sistema de saúde e profissionais que cuidam da enfermidade (NASCIMENTO, 2003). De acordo com Brasil (2012) a escolha de um tratamento racional proporciona ao usuário mais garantia de benefício terapêutico com eficácia, segurança e menor custo, contribuindo para a integralidade do cuidado à saúde. Além disso pode proporcionar melhoria do padrão de atendimento, maior resolubilidade do sistema e significativa redução de gastos para as instituições de saúde.

2.3 Plantas medicinais usadas no diabetes

O DM, por ser doença crônica, prevalente, com sérias complicações e de tratamento contínuo, é alvo interessante para a busca de novos métodos de tratamento com a possibilidade de uso de várias espécies de plantas medicinais para o tratamento, contribuindo para triagens etnofarmacológicas e direcionamento de pesquisas que relacionem o potencial de espécies brasileiras para o tratamento desta condição patológica (CECÍLIO et al., 2008).

No Brasil existe um grande número de plantas medicinais usadas popularmente para o tratamento do DM, dentre elas: pau-pereira (*Aspidosperma parvifolium* A. DC), Quina (*Cinchona officinalis*), Pau-ferro (*Caesalpinia férrea*), Assa-peixe (*Vernonia Polyanthes* e *Vernonia ferruginea* Less) (CARVALHO, DINIZ e MUKHERJEE, 2005).

Nesse contexto, Almeida et al (2006) avaliaram a atividade antidiabética do extrato foliar de *Bauhinia cheilandra* (Bong.) Steudel sobre os níveis de glicose em ratos diabéticos induzido por aloxana e encontraram que os tratamentos nas doses de 300, 600 e 900mg kg⁻¹, apresentaram atividade hipoglicemiante significativa.

Em outro estudo com diferentes frações do extrato foliar de *Bauhinia candicans* Benth, os resultados mostraram que o tratamento utilizando doses de 8mg kg⁻¹ da fração III (kaempferol-3-O- β -rutinosídeo) reduziu significativamente os níveis de glicemia de coelhos com diabetes induzida por aloxano, evidenciando uma potente atividade hipoglicemiante do flavonóide (FUENTES et al., 2004).

Inúmeros experimentos enfatizam a ação hipoglicemiante de plantas como a condessa - *Annonas quamosa* L. (SHIRWAIKAR et al., 2004), caju roxo - *Anacardium occidentale* L. (ARDUÍNO & SOARES, 1951), maracujá (*Passiflora edulis* Sims) (KRAHN et al., 2008), romã - *Punica granatum* L. (JAFRI et al., 2000), quixaba - *Bumelia sartorum* Mart. (CARVALHO et al., 2005), jiló - *Solanum gilo* Raddi (SILVA et al., 1998), melão de São Caetano - *Momordica charantia* L. (MARLES & FARNSWORTH, 1995), alho - *Allium sativum* L. e cebola - *Allium cepa* L. (BALUCHNEJADMOJARAD et al., 2003), berinjela - *Solanum melongena* (DERIVI et al., 2002), dentre outras espécies.

Dentre os compostos ativos antidiabéticos têm-se destacados polissacarídeos, proteínas, esteróides, terpenóides, alcalóides, flavonóides, glicosídeos, triterpenos, óleos, vitaminas, saponinas, peptídeos e aminoácidos (ABDEL-HASSAN et al., 2000).

Em estudos sobre a atividade antidiabética a espécie mangiferina demonstrou em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, droga supressora de insulina por destruição de células pancreáticas β . Os efeitos de mangiferina sobre a hiperglicemia e aterogenicidade de ratos diabéticos foram observados através da diminuição significativa dos níveis de glicemia bem como pelo decréscimo nas

concentrações séricas de triglicerídios, colesterolis totais e LDL (HUANG et al., 2006).

A ação hipoglicemiante de *Cissus verticillata*, na hiperglicemia em coelhos induzida experimentalmente após injeção intraperitoneal de aloxana 120mg/kg, droga que provoca citotoxicidade nas células β do pâncreas, foi avaliada com o uso de extrato hidroalcoólico liofilizado das folhas nas doses de 4,5mg/kg e 13,5mg/kg, que corresponde à dose de uso popular (VASCONCELOS et al., 2007). Observou-se redução da glicemia em 35% com a dose de 4,5mg/kg e de 60% com a dose de 13,5mg/kg (NEGRI, 2005).

Santos, Nunes e Martins (2012) revelam, na tabela 4, a prevalência de plantas medicinais com relato de atividade hipoglicemiante utilizadas por pacientes no município de Vitória de Santo Antão - PE, e, dentre elas, aparece uma espécie denominada de *Peperomia pellucida*, mais conhecida como língua de sapo. Essa referência nos motiva a realizar experimentos e investigar a possibilidade de atividade antidiabética em piperáceas, uma vez que uma espécie do gênero Piper já vem sendo estudada química e biologicamente no laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Naturais Bioativos da Universidade Federal do Oeste do Pará (MACÊDO et al., 2020).

Tabela 4 - Prevalência de plantas medicinais utilizadas como hipoglicemiante.

Família	Nome científico	Nome popular	(%)	Referências
Fabaceae	<i>Bahuinia</i> sp	Pata de vaca	16,82	Pepato et al., 2002; Lino et al., 2004; Fuentes et al., 2004; Cecílio et al.,2008.
Myrtaceae	<i>Syzygium jambolanum</i> DC.	Azeitona roxa	15,88	Grover et al., 2000; Soares et al., 2000; Zanoello et al., 2001; Rao et al., 2001; Rathi et al., 2002; Prince et al.,2003.
Vitaceae	<i>Cissus sicyoides</i> L.	Insulina	14,01	Pepato et al., 1998; Carvalho et al., 2005.
Asteraceae	<i>Cynara scolymus</i> L.	Alcachofra	5,6	-
Annonaceae	<i>Annona Squamosa</i> L.	Condessa	4,67	Bragança, 1996; Shirwaikar et al., 2004.
Anacardiaceae	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Caju roxo	3,73	Arduíno & Soares (1951).
Caesalpinaceae	<i>Tamarindus</i> sp	Tamarindo	3,73	-
Passifloraceae	<i>Passiflora</i> spp	Maracujá	2,8	Córdova et al., 2005;

				Krahn et al., 2008
Myrtaceae	<i>Punica granatum</i> L.	Romã	2,8	Jafri et al., 2000.
Malvaceae	<i>Malva</i> spp	Malva branca	1,86	-
Chrysobalanaceae	<i>Licania rigida</i> Benth	Oiticica	1,86	-
Sapotaceae	<i>Sideroxylon obtusifolium</i> (Roem. & Schult.) T.D. Penn	Quixaba	1,86	Almeida et al, 1982; Naik et al., 1991;
Labiatae	<i>Plectranthus barbatus</i> Andr.	Sete dores Malva-santa	1,86	-
Piperaceae	<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth	Língua de sapo	1,86	-
Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i> L.	Picão	1,86	-
Bignoniaceae	<i>Crescentia cujete</i> L.	Coité	0,93	-
Moraceae	<i>Artocarpus altilis</i> (Park.)Forberg (A. <i>communis</i>)	Fruta pão	0,93	-
Lamiaceae	<i>Salvia aff. officinalis</i> L.	Sálvia	0,93	-
Solanaceae	<i>Solanum gilo Raddi</i>	Jiló	0,93	Silva et al., 1998.
Apiaceae	<i>Coriandrum sativum</i> L.	Coentro	0,93	-
Musaceae	<i>Musa x paradisiaca</i> L.	Banana prata	0,93	-
Equisetaceae	<i>Equisetum</i> sp	Cavalinha	0,93	-
Myrtaceae	<i>Eugenia uniflora</i> L.	Pitanga	0,93	-
-	-	Pau de sapo	0,93	-
Cucurbitaceae	<i>Mormodica charantia</i> L.	Melão de São Caetano	0,93	Correa, 1984; Marles & Farnsworth, 1995; Bragança, 1996.
Euphorbiaceae	<i>Manihot esculenta</i> Crantz.	Mandioca	0,93	-
Lamiaceae	<i>Ocimum urticifolium</i> Roth.	Alfavaca	0,93	-
Liliaceae	<i>Allium sativum</i> L.	Alho	0,93	Baluchnejadmojarad et al., 2003;
Costaceae	<i>Costus</i> sp	Cana de macaco	0,93	-

Asteraceae	<i>Artemisia absinthium</i> L.	Losna	0,93	-
Asteraceae	<i>Egletes viscosa</i> (L). Less	Marcela	0,93	-
Solanaceae	<i>Solanum melongena</i> L.	Berinjela	0,93	Derivi et al., 2002.
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i> L.	Manga espada	0,93	-
Misturas de ervas	-	Garrafada	0,93	-
	-	Chá da vida**	0,93	-

Fonte: SANTOS; NUNES; MARTINS, 2012.

2.4 Família Piperaceae e o gênero *Piper*

A família Piperaceae é uma família de ervas, arbustos, pequenas árvores, árvores aromáticas e trepadeiras, representada por cinco gêneros: *Verhuellia*, *Zippelia*, *Manekia*, *Piper* e *Peperomia*, compreendendo aproximadamente 4000 espécies (MONTEIRO; GUIMARÃES, 2009).

As espécies do gênero *Piper* (Piperaceae) estão inclusas entre as angiospermas basais e possui distribuição pantropical (Figura 1) (QUIJANO-ABRIL et al., 2006). A *Piper amalago* L. nativa do México, é popularmente conhecida pelo nome “pariparoba”. É utilizado na medicina popular para o tratamento de dores estomacais e também como um anti-inflamatório (FALCAO et al., 2005).

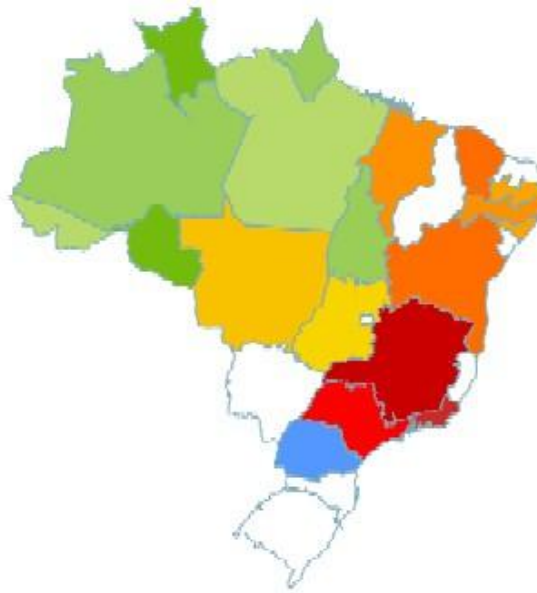
Figura 1 – Mapa de distribuição pantropical das espécies pertencentes à família Piperaceae.



Fonte: Sample, 2013.

O gênero *Piper* é o mais representativo, com mais de 700 espécies encontradas em todo o mundo, sendo que 170 são nativas do Brasil (PARMAR, 1997). As espécies estão distribuídas em todas as regiões brasileiras, a Região Norte se destaca, uma vez que todos seus Estados apresentam alguma espécie, como mostra a figura 2.

Figura 2 – Mapa de distribuição geográfica no Brasil das espécies pertencentes à família Piperaceae.



Fonte: Guimarães; Carvalho-Silva; Monteiro; Medeiros e Queiroz, 2015.

Da Amazônia, várias espécies já foram estudadas como *P. belte*, *P. nigrum*, *P. amapaense*, *P. duckei*, *P. bartlingianum*, *P. arboreum*. Nos trópicos são encontradas como plantas pioneiras e têm sido intensivamente analisadas em investigações fitoquímicas (FELIPPE et al., 2008).

Muitas espécies de Piperaceae são ricos em metabólitos secundários bioativos, incluindo alcalóides, amidas, flavonóides e terpenos, possuindo assim importância econômica e medicinal, como L. (pimenta-do-reino), L. *Piper nigrum*, *P. umbellatum* (pariparoba) e L. (kavakava) (BARROS et al., 1996), *P. methysticum*; (SILVA; MACHADO, 1999).

2.4.1 *Piper marginatum*

O botânico suíço Anne Casimir Pyrame de Candolle foi o primeiro a observar pequenas diferenças morfológicas entre diferentes coleções de *Piper marginatum* e reconheceu três subespécies: *P. marginatum* Jacq., *P. marginatum* var. *anisatum* (Kunth) C.D.C e *P. marginatum* var. *catalpifolium* (Kunth) C.D.C (CANDOLLE, 1902).

2.4.2 Descrição botânica

A espécie *P. marginatum* conhecida popularmente como caapeba cheirosa e malvarisco, é um arbusto ou arvoreta que pode atingir até cinco metros de altura. As folhas possuem lâmina ovalada com tamanho de dez a vinte centímetros de largura e sete a quinze centímetros de comprimento, com pecíolo de comprimento de dois a seis centímetros, base cordada, ápice acuminado, membranácea, glabra em ambas as faces, com exceção pela presença da densa ciliação na margem, palmatinérveas (Figura 3) (GUIMARÃES e GIORDANO, 2004). Para Guzman (2016) os dois marcos vegetativos para rápida identificação da espécie *P. marginatum* é a folha em forma de coração e um pecíolo alado.

Figura 3 – Espécie de *Piper marginatum*



Fonte: Danielle Lopes, 2019.

2.4.3 Aspectos fitoquímicos

Muitas espécies de *Piper* são aromáticas e, como consequência, a composição química dos óleos essenciais de várias espécies foi estudada em detalhe. Tais estudos revelaram uma diversidade de substâncias constituindo o óleo essencial, como monoterpenos, sesquiterpenos, aldeídos, cetonas, arilpropanóides, fenilpropanóides e álcoois de cadeia longa (DE BFFA et al., 2010). A análise fitoquímica das folhas sugere presença de óleo essencial, amidas, flavonóides e compostos fenólicos (LOPES et al., 2012).

A espécie *P. marginatum* apresenta uma fitoquímica distinta com a presença de metabólitos secundários específicos, não encontrados em outras espécies do gênero *Piper*. Por exemplo, a *P. marginatum* é a única espécie do gênero *Piper* contendo anetol, estragol, isoeugenol metil éter, os ácidos fenilalcanóides 3-farnesil-4-hidroxi-benzóico e 3-farnesil-4-metoxibenzóico e os glicosídeos marginatosídeo e vitexina (PARMAR et al., 1997). Nenhuma outra espécie do gênero *Piper* demonstrou a presença desses marcadores quimiotaxonômicos.

Para Guzman (2016) muitos outros compostos têm sido identificados em *P. marginatum* como, por exemplo: o 3,4 metilenedioxipropiofenona, Safrole, Metileugenol, trans-Anetol, trans-Isosafrol, 2,6-dimetoxi-3,4-metilenedioxi-1-(2-propenil)-benzeno, 3,4-metilenedioxi-1-(2E-octenil)-benzeno (Marginatina), (E,E)-N-Isobutil-2,4-octadienamida.

Estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Piper* demonstram uma grande diversidade de metabólitos secundários, inclusive com ação antifúngica (REIGADA et al., 2007; JOHNNY et al., 2011). Apesar disto, há poucos estudos com *P. marginatum* sobre o controle de fitopatógenos e com atividade hipoglicemiante.

2.4.4 Aspectos etnofarmacológicos

A atividade biológica de espécies do gênero *Piper* é muito diversificada e também muito utilizada na medicina popular para tratamento de inúmeras doenças (DI STASI, 2002; LORENZI & MATOS, 2002). Por isso a importância de se investigar o potencial terapêutico das plantas.

Os estudos farmacológicos publicados envolvem outras espécies do gênero *Piper* e tais pesquisas demonstraram efeito esquistossomicida *in vitro* (CARRARA et

al., 2013) efeito ansiolítico, ausência de efeito mutagênico ou genotóxico (LOPES et al., 2012), atividade acaricida (de BFFA et al., 2010), inseticida (SOUTO et al., 2012), antifúngica (VIEIRA et al., 2011), antimalárica (BAGATELA et al., 2013), antidiabética e anti hiperlipidêmica (KUMAR, SHARMA e VASUDEVA, 2013), tripanocida (FRANKLIM et al., 2013), efeito anti-inflamatório para neuro inflamação (AHMED et al., 2013), anti-ulceroso (BURCI et al., 2013), antituberculoso (SCODRO et al., 2013), anti-HBV (JIANG et al., 2013), entre muitos outros.

A substância N-[7-(3',4'-metilenodioxifenil)-2(Z),4(Z)-heptadieno] pirrolidina foi ainda menos estudada. Existem alguns estudos avaliando sua atividade anti-fúngica (ALECIO et al., 1998), anti-leishmania (CARRARA et al., 2013), anti-esquistossomose (CARRARA et al., 2013).

Segundo Aligiannis et al., (2001) pode-se considerar como de forte atividade, compostos obtidos a partir de plantas medicinais e aromáticas que apresentem MIC até 0,5 mg/ml, conforme observado *P. marginatum* contra *Staphylococcus aureus*; *Aloysiagratisissima*, e *M. laevigata* contra *Bacillus subtilis*. Além do exposto, o óleo essencial de *P. marginatum* tem ação fungitóxica significativa no controle dos fitopatógenos em condições de casa-de-vegetação e de campo (SILVA e BASTOS, 2007).

A espécie é recorrentemente empregada como uma decocção ou infusão por seus efeitos tônicos, diuréticos e carminativos (DE ALBUQUERQUE et al., 2007). É também utilizado no tratamento da vesícula biliar, fígado, estômago, baço, doenças urinárias e gastrointestinais (YUKES e BALICK, 2011), mas também disenteria.

O extrato de suas folhas é usado na medicina popular para tratar doenças hepáticas e doenças da vesícula e também como tônico e antiespasmódico (BERG, 2010). No estado da Paraíba folhas e talos de *P. marginatum* são utilizados contra picada de cobra e como sedativos (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

No Suriname, Trinidad e Porto Rico, a planta é amplamente usada para tratar doenças femininas, ajudar no parto e reduzir o fluxo menstrual, respectivamente (LANS e GEORGES, 2011). Na Guiana Francesa, a *P. marginatum* é usada no tratamento de erupções cutâneas (D'ANGELO et al., 1997), e no Brasil é usada para aliviar o prurido causado por picadas de insetos (PEREIRA et al., 2011).

O óleo essencial obtido a partir da folha, caule e flor da *P. marginatum* foi testado quanto à atividade contra *Aedes aegypti*, e foram encontradas potentes

misturas larvicidas (LC_{50} variando de 19,9 a 23,8 $\mu\text{g} / \text{ml}$) com o óleo essencial do caule e flor sendo levemente mais ativo que o óleo essencial da folha (AUTRAN et al., 2009).

Algumas plantas do gênero *Piper* são utilizadas pela medicina popular do Brasil objetivando a redução da pressão arterial e estudos científicos demonstraram tal efeito biológico utilizando-se extrato de *P. truncatum* e também alcalóide piperina extraído de *P. nigrum* e *P. officinarum* (TRINDADE et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliação da atividade hipoglicemiante do óleo essencial de folhas de *P. marginatum* em camundongos.

3.2 Específicos

- Caracterizar quimicamente o óleo essencial de folhas de *P. marginatum* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;
- Avaliar a toxicidade oral aguda do óleo essencial de folhas de *P. marginatum* em camundongos;
- Avaliar os níveis de glicemia em camundongos diabéticos induzidos por aloxana tratados com óleo essencial de folhas de *P. marginatum* nas concentrações de 100, 200 e 400mg/kg;
- Avaliar os parâmetros fisiológicos como o peso corporal, a ingestão hídrica e a ingestão alimentar nos camundongos não diabéticos e diabéticos tratados com o óleo essencial de folhas de *P. marginatum*;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos renais e hepáticos em camundongos não diabéticos e diabéticos tratados o óleo essencial de folhas de *P. marginatum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi submetido à Comissão de Ética no uso de Animais da UFOPA – CEUA/UFOPA tendo sido aprovado sob o protocolo nº 1120180048 (Anexo 1) e realizado em conformidade com as normas envolvendo animais.

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Farmacologia e Laboratório do P&DBIO da Universidade Federal do Oeste do Pará - Campus Tapajós e Biotério da Universidade do Estado do Pará - UEPA. O método usado na pesquisa foi experimental exploratório descritivo.

4.1 Material Botânico

As folhas de *P. marginatum* foram coletadas na Universidade Federal do Oeste do Pará (coordenadas 02°25'04.7 "Sul e 054°44'27.8 "Oeste), Campus Tapajós, no mês de setembro de 2018, janeiro e abril de 2019. A espécie utilizada nesse estudo foi identificada botanicamente e sua exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), sob o número HSTM - nº 00370.

Figura 4 – Espécie de *Piper marginatum* em estufa a 40°C.



Fonte: Danielle Lopes, 2019.

As folhas foram primeiramente submetidas a limpeza para remoção de sujeiras. Após a limpeza foram secas em estufa a 40°C por 4 dias (Figura 4). Foram trituradas em moinho analítico e pesadas obtendo-se na 1° coleta, realizada em setembro de 2018, 300 g, 2° coleta em janeiro de 2019, 300 g, e 3° coleta em abril de 2019, 293 g de amostra seca. O material triturado foi levado ao laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Bioativos (P&DBIO) do Instituto de Biodiversidade e Florestas da UFOPA para a obtenção do óleo essencial.

4.2 Extração do óleo essencial

O óleo essencial de *P. marginatum* foi extraído no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Bioativos (P&DBIO) do Instituto de Biodiversidade e Florestas da UFOPA, através do método de hidrodestilação utilizando o aparelho do tipo Clevenger (Figura 5).

Figura 5 – Extração de óleo essencial de folhas *Piper marginatum* pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger.



Fonte: Danielle Lopes, 2019.

Foram utilizados aproximadamente 300 gramas da amostra de folhas em cada extração, colocadas em um balão de fundo redondo contendo 3 L de água

destilada. A mesma foi aquecida em manta aquecedora até a ebulição da água, permanecendo por um tempo de destilação de 4h. Após obtenção do óleo essencial, foi calculado o rendimento utilizando uma balança analítica e o material foi armazenado em frasco de vidro âmbar, devidamente identificado e acondicionado sob refrigeração.

4.3 Caracterização química do óleo essencial de folhas de *P. marginatum*.

A caracterização química foi realizada por Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas - São Paulo (UNICAMP). Utilizou um cromatógrafo a gás Agilent, modelo HP6890 equipado com um detector seletivo de massas Agilent, modelo HP-5975 utilizando uma coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) nas seguintes condições: temperatura do injetor = 250°C, coluna = 80°C, taxa de aquecimento de 5°C/min até 280°C (20 min) e detector = 300°C. Foi utilizado hélio como gás de arraste numa vazão de 1mL/min e detector seletivo de massas operando a 70 eV, m/z =30 a 500 u.m.a. Os dados encaminhados foram analisados no programa Enhanced Data Analysis para identificação dos compostos majoritários do OE de folhas de *P. marginatum* através da comparação entre os índices de retenção (IR) calculados, com os disponíveis na literatura e a base de dados da biblioteca NIST05.

4.4 Animais

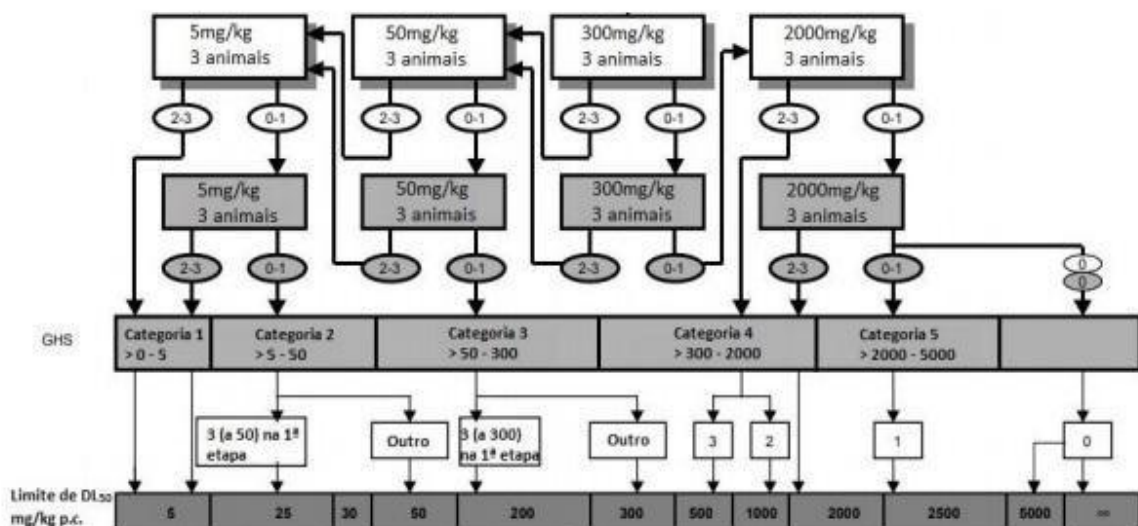
Foram utilizados 36 camundongos machos para a avaliação da atividade hipoglicêmica e 12 camundongos fêmeas para a toxicidade oral aguda, isogênicos da linhagem Swiss, pesando entre 30 e 50 g, provenientes do Biotério da Universidade do Estado do Pará. Os animais foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas, à temperatura ambiente controlada (23 \pm 2° C), com livre acesso à comida e água, recebendo ração padrão e água *ad-libitum*.

4.5 Toxicidade oral aguda

Foi realizada a avaliação da toxicidade oral aguda seguindo o protocolo da OECD - The Organization for Economic Co-operation and Development (2001), “Toxicidade Aguda de Classe”, que determina as concentrações a serem utilizadas no estudo (5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg ou 2000 mg/kg) que deve ser o mais provável de produzir mortalidade em alguns dos animais dosados e o número de animais por dose (3 camundongos).

Segundo este protocolo experimental quando não há conhecimento sobre a toxicidade da substância a ser testada, recomenda-se que se inicie com a concentração no valor de 300 mg/kg. Durante o andamento do experimento, caso aconteça uma ou nenhuma morte deve-se repetir a concentração. Se neste segundo teste apresentar o mesmo resultado, a concentração de 2000 mg/kg deve ser adotada para testar a substância. Entretanto, na ocorrência de duas ou três mortes após a administração de 300 mg/kg, a concentração inicial deve ser diminuída para 50 mg/kg e se repetir a mesma quantidade de morte, deve-se escolher a concentração de 5 mg/kg para o teste de toxicidade aguda (Figura 6).

Figura 6 – Fluxograma de ensaio para teste de toxicidade oral aguda.



Foram divididos 2 grupos experimentais de camundongos Swiss, com 3 animais cada, Swiss fêmeas com 8-10 semanas de idade. Esses grupos ficaram em jejum sólido durante 2 horas antes e 2 horas após a administração das

concentrações. A substância controle e teste foram administradas em concentração única por gavagem usando um tubo estomacal: o grupo 1 (controle) recebeu apenas o veículo (Salina, não excedeu 1 mL/Kg de peso), o grupo 2 (teste) recebeu o óleo essencial de *P. marginatum* na concentração de 2000mg/kg, o teste foi realizado novamente, totalizando 12 camundongos fêmeas.

Para acompanhamento da evolução da intoxicação, os animais foram marcados, a partir da base da cauda, com linha ao redor da cauda feitos com uma caneta marcadora permanente, indicando 1 (uma linha), 2 (duas linhas) e 3 (três linhas).

Os animais foram observados individualmente uma vez nos primeiros 30 minutos, no tempo de 1 hora, 2 horas, 4 horas após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Foram observados parâmetros como: alterações na pele, pelos, olhos e mucosas, motilidade, irritabilidade, tremores, convulsões, salivação, micção, diarreia, letargia, sono. Os dados obtidos foram registrados e a avaliação dos parâmetros foi considerada como ausência ou presença de toxicidade.

Além disso, os animais tiveram seu peso corporal verificado antes da administração das concentrações, no 7° e 14° dia pós-administração. A ingesta hídrica foi oferecida *ad libitum* até o final do experimento. Para alimentação foi utilizada a ração adequada para camundongos disponibilizada pelo Biotério da Universidade do Estado do Pará.

Os camundongos foram acomodados em gaiolas com grade aramada, comedouro e encaixe para mamadeira, piso com maravalha, a temperatura na sala experimental controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), sequência de ciclos claro/escuro de 12 horas, a limpeza realizada 2 vezes na semana.

4.6 Indução do diabetes experimental

A indução do diabetes foi realizada pela administração de Aloxana monohidratado diluída em Solução Fisiológica 0,9%, injetada por via intramuscular, na dose única de 150 mg/kg de peso corporal, utilizando o músculo da coxa traseira. Em virtude dessa substância ser sensível a luz e a temperatura foi necessário

prepará-la em ambiente escuro, utilizando frasco âmbar envolvido com papel alumínio e refrigerado até o momento da aplicação.

A aloxana, é um dos agentes diabetogênicos mais estudada e comumente utilizada no meio científico para a indução do diabetes experimental. Provoca sinais semelhantes aos encontrados na síndrome diabética em humanos, tais como perda de peso corporal, glicosúria, polifagia, polidipsia, hiperglicemia, cetonúria, cetonemia, além de possuir pequena ação oncogênica e menor custo comparada a estreptozotocina (STZ) (CAVALLI et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007).

Esta substância promove uma liberação maciça de insulina, presumivelmente em virtude do influxo de íons cálcio ao citosol das células β , no entanto, trata-se de uma liberação de curta duração, seguida por completa supressão da resposta das ilhotas pancreáticas à glicose, em decorrência de necrose das células β . A ação da aloxana no pâncreas é precedida por sua rápida absorção e acúmulo nas células beta, atribuída a uma elevada taxa de captação da droga por essa célula, através do transportador de glicose GLUT2 presente no plasma (SZKUDELSKI, 2001).

Para a indução do diabetes foram utilizados 30 camundongos machos da linhagem Swiss, outros 6 animais não receberam aloxana por fazerem parte do grupo I (animais não diabéticos). Os animais foram mantidos em jejum sólido por 12 horas, visto que em jejum são mais sensíveis à aloxana (LEME et al., 2010). Após esse período foi verificado o peso, por meio da balança semi-analítica e expresso em gramas, e a glicemia medida com glicosímetro modelo On call Plus por meio da punção da extremidade da cauda antes da administração da droga, vale ressaltar que todos os dados foram devidamente registrados.

Os animais foram direcionados ao Laboratório de Bioquímica da UEPA para o procedimento de indução e permaneceram por 30 minutos em suas gaiolas para adaptação ao ambiente. Em seguida, os animais dos grupos (GII, GIII, GIV, GV e GVI) foram retirados da gaiola e contidos com uma das mãos e a outra procedeu a inoculação da aloxana, utilizando-se agulhas de calibre 13 x 4,5 mm.

Após 72 h, os camundongos ficaram em jejum sólido de 12 h e a glicemia foi novamente avaliada. Os animais que apresentaram glicemia superior a 200 mg/dL, conforme protocolo desenvolvido por Lerco (2003), foram considerados diabéticos e incluídos nos grupos experimentais (n=6), os animais do Grupo I não receberam aloxana por fazerem parte do grupo - animais não diabéticos.

4.7 Planejamento experimental

Para formar os grupos experimentais os animais foram subdivididos em 6 grupos (n=6).

- Grupo I (camundongos não-diabéticos): animais normais do grupo controle tratados com veículo (Salina + DMSO).
- Grupo II (camundongos diabéticos + veículo): animais induzidos ao diabetes pela administração de aloxana e tratados com o veículo (Salina + DMSO).
- Grupo III (camundongos diabéticos + glibenclamida): animais induzidos ao diabetes pela administração de aloxana e tratados com glibenclamida 5mg/kg.
- Grupo IV (camundongos diabéticos + óleo essencial): animais induzidos ao diabetes pela administração de aloxana e tratados com óleo essencial de folhas de *P. marginatum* na concentração de 100 mg/kg de peso corporal por dia.
- Grupo V (camundongos diabéticos + óleo essencial): animais induzidos ao diabetes pela administração de aloxana e tratados com óleo essencial de folhas de *P. marginatum* na concentração de 200 mg/kg de peso corporal por dia.
- Grupo VI (camundongos diabéticos + óleo essencial): animais induzidos ao diabetes pela administração de aloxana e tratados com óleo essencial de folhas de *P. marginatum* na concentração de 400 mg/kg de peso corporal por dia.

4.8 Método aplicado no tratamento.

Os modelos experimentais receberam o tratamento diariamente e no mesmo horário, por gavagem, durante 20 dias consecutivos. A dose administrada foi calculada de acordo com os valores do peso, em gramas, do animal, respeitando a média de volume entre 150 a 200 µl para cada camundongo. Assim tem-se:

$$\text{(Cálculo 1) Dose individual: } \frac{\text{peso do animal (g)} \times \text{dose da droga (mg/kg)}}{\text{Volume total } (\mu\text{l})}$$

$$\text{(Cálculo 2) Volume a administrar: } \frac{\text{dose individual (mg)} \times \text{volume total } (\mu\text{l})}{\text{Soma da dose dos animais (mg)}}$$

O grupo I (camundongos não-diabéticos) e II (camundongos diabéticos + veículo) receberam a Solução Fisiológica 0,9% (0,9g NaCl/100 mL água) não excedendo 1ml/kg de peso do animal diluído com DMSO 3%, porcentagem calculada em cima do volume total (1000 μ L). O grupo III recebeu glibenclamida 5mg/kg diluída em DMSO 3% do volume total (1000 μ L). O uso do DMSO tem sido rotineiramente utilizado em alguns estudos para atuar na diluição do fármaco hipoglicêmico, conforme realizado previamente por Luz (2012).

Os animais dos grupos GIV, GV e GVI tratados com o OE de *P. marginatum* nas concentrações de 100 mg/kg, 200 mg/kg e 400 mg/kg, respectivamente, receberam o OE diluído em Solução Fisiológica 0,9% mais DMSO 3% do volume total (1000 μ L). O preparo das soluções foi realizado previamente a realização de cada experimento no Laboratório de Farmacologia da Ufopa. É imprescindível destacar que das três extrações de OE, a extração do mês de janeiro de 2019 foi utilizada no tratamento dos camundongos.

Os óleos essenciais são voláteis, insolúveis em água, viscosos e complexos, para a sua solubilidade por ser utilizado solventes (etanol, metanol) ou agentes emulsificantes, como o Tween e o DMSO (dimetil sulfóxido) (NASCIMENTO et al., 2007).

4.9 Avaliação da glicemia em jejum

A glicemia de todos os modelos experimentais foi mensurada em um aparelho da marca On call Plus, através da incisão na extremidade da cauda, antes da indução ao diabetes experimental, após indução, no 3° dia, 10° dia e 20° dia de tratamento. Para isso, os animais ficaram em jejum sólido de 12 horas e a água fornecida normalmente.

4.10 Avaliação dos parâmetros fisiológicos

O peso corporal de todos os animais experimentais foi mensurado antes da indução do diabetes experimental, após a indução e a cada 3 dias durante o tratamento em balança semi-analítica e expressos em gramas. A alimentação foi controlada durante o tratamento deixando apenas 15 g de ração por gaiola diário e um volume de 300 ml de água na mamadeira.

Tanto o volume de água ingerido (mL) quanto a quantidade de alimento consumido (g) foram mensurados, registrados e acompanhados por 24 horas antes e depois da indução, no 3° dia, 10° dia e 20° dia do tratamento. O total de água ingerida foi calculado mediante o volume de água (mL) encontrada no reservatório após as 24 h subtraído pelo volume inicial de água. Sendo que o alimento ingerido foi calculado mediante o peso da ração encontrada no reservatório após as 24 h subtraído pelo peso inicial de ração.

4.11 Avaliação da função renal e hepática

No 21° dia foi realizada a punção cardíaca em todos os animais no Laboratório de Bioquímica da UEPA. Antes do procedimento, os animais ficaram em jejum sólido por 12h e água *ad libitum* e foram pesados em balança semi analítica para o cálculo do anestésico.

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina 10% associado ao Cloridrato de Xilazina 2%, utilizando seringa de 1,0ml (tipo para insulina), pela via intraperitoneal (i.p.), com o volume de 0,1mL (100ul) da solução para cada 12 -15 g de peso (OLIVEIRA, 2019). À medida que o animal apresentou sinais de pouca deambulação foi fixado na base de isopor para facilitar a punção cardíaca (Figura 7).

Antes de inserir o bisel da agulha para realizar o procedimento precisou-se palpar o osso esterno do animal até encontrar o processo xifóide. Posteriormente, a agulha 25 x 0,7 mm foi introduzida abaixo do processo xifóide em um ângulo de 45° com uma leve inclinação para a esquerda de modo a perceber a perfuração da pele e do pericárdio, assim que o sangue apareceu na ponta da seringa de insulina foi aspirado lentamente até completar 1 mL.

Figura 7 – Punção Cardíaca

Fonte: Danielle Lopes, 2019.

As amostras de sangue foram centrifugadas em 1500 rpm durante 5 minutos para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros da função hepática (ALT, AST) e renal (uréia, creatinina) através dos kits Labtest. O soro foi armazenado em tubos eppendorf, previamente registrado com grupo e número do animal, e encaminhado para quantificação no Laboratório de Análise do Instituto de Esperança de Ensino Superior (Iespes) pelo analisador químico automático BS-200E Mindray (Figura 8).

Figura 8 – Analisador automático.

Fonte: Danielle Lopes, 2019.

Com a perfuração das camadas do coração, conseqüentemente, o sangue extravasa para a cavidade abdominal, resultando na morte dos animais por hipovolemia ou exsanguinação. Após confirmação do óbito, os animais foram descartados em sacos brancos com indicação de lixo patológico e armazenados no freezer do Biotério da UEPA para posterior coleta por empresa especializada.

4.12 Análise Estatística

O estudo das variáveis, pesos dos animais, toxicidade e parâmetros bioquímicos foi expresso como média \pm erro padrão da média, utilizando o software GraphPrism. Enquanto que as variáveis: peso do experimento, glicemia em jejum, ingesta hídrica e alimentar foi expresso em média \pm desvio padrão da média e analisado por meio da comparação múltipla de resultados paramétricos utilizando ANOVA seguido de *post test Tukey*. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Rendimento do óleo essencial de folhas de *P. marginatum*.

O rendimento do óleo essencial de folhas de *P. marginatum* foi calculado a partir do valor do material coletado. As folhas foram coletadas em área de vegetação da Universidade Federal do Oeste do Pará - Campus Tapajós nos meses de setembro de 2018, janeiro e abril de 2019.

Com relação a análise do percentual (Tabela 5), comparando-se o rendimento do óleo das três amostras, foi observado que a amostra 3, com as folhas coletadas no mês de abril de 2019, apresentou valor superior a amostra 1 e 2.

A quantidade de folhas coletadas no mês de setembro de 2018, após sua trituração, renderam 300 g de amostra seca e 1,54 g de óleo essencial, resultando em 0,51% de rendimento.

O material vegetal coletado nos meses de janeiro e abril de 2019 obteve-se, após sua trituração, 300 g e 293 g de amostra seca, 2,11 g e 3,58 g de óleo essencial, resultando em 0,70% e 1,22% de rendimento, respectivamente. Destaca-se o rendimento médio total de 0,80%.

Tabela 5 – Rendimento dos óleos essenciais de folhas de *Piper marginatum* nos meses de setembro de 2018 (1), janeiro (2) e abril (3) de 2019.

Amostra	Amostra seca Peso (g)	Óleo Peso (g)	Rendimento do óleo em %
1	300	1,54	0,51
2	300	2,11	0,70
3	293	3,58	1,22

5.2 Caracterização química do óleo essencial de folhas de *P. marginatum*.

Os compostos químicos majoritários do OE das folhas de *P. marginatum*, da amostra coletada em janeiro de 2019, foram identificados por meio da comparação entre os índices de retenção (IR) calculados, com os padrões já definidos na literatura e a base de dados da biblioteca NIST05.

Os resultados estão expressos em tabela, a primeira coluna (t_R (min)) representa o tempo de retenção em minutos, indicando o tempo em que o composto foi identificado. A segunda coluna (IR) refere-se ao índice de retenção. A terceira coluna aos compostos encontrados no OE de folhas de *P. marginatum* e a quarta (% Relativo) a porcentagem do composto no OE.

No método de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) foram identificados um total de 43 (quarenta e três) compostos, sendo os majoritários: 3-Carene (13,28%), seguido pelo Cariofileno (12,57%), Copaeno (9,50%), 3,4-metilenodioxipropiofenona (7,96%), Elixeno (6,02%), β -Cubebeno (5,60%), conforme mostra a tabela 6.

Tabela 6 – Composição Química do óleo essencial de folhas de *Piper marginatum* da amostra coletada em janeiro de 2019, destacando como componentes majoritários (*) aqueles acima de 5%.

t_R (min)	IR	Composto	%Relativo
5,387	931,8852	R- α -Pineno	1,92%
6,508	975,3685	(-)- β -Pineno	1,30%
6,865	989,2164	β -Pineno	0,94%
7,300	1004,539	α -Felandreno	0,39%
7,530	1011,188	3-Careno	13,28%*
7,930	1022,752	β -Cimeno	0,49%
8,068	1026,742	D-Limoneno	0,91%
8,359	1035,155	β -trans-Ocimeno	2,30%
8,719	1045,562	β -cis-Ocimeno	2,98%
10,153	1087,019	Terpineno	0,35%
10,580	1099,364	Linalol	2,33%
14,766	1203,43	cis-Verbenol	0,27%
18,279	1286,518	Safrol	4,80%
20,321	1335,368	δ -Elemeno	1,16%
21,430	1362,013	(+)-Cyclosativene	0,56%
21,953	1374,58	Copaeno	9,50%*

22,270	1382,196	β -Bourboneno	0,84%
22,500	1387,722	β -Cubebeno	0,62%
22,584	1389,741	β -Elemeno	0,67%
23,153	1403,524	Metileugenol	1,07%
23,753	1418,412	Cariofileno	12,57%*
24,069	1426,253	β -Cubebeno	0,92%
25,042	1450,397	α -Cariofileno	1,59%
26,014	1474,516	τ -Muuroleno	0,84%
26,190	1478,883	β-Cubebeno	5,60%*
26,361	1483,127	β -Selineno	1,11%
26,807	1494,194	Elixeno	6,02%*
26,945	1497,618	α -Muuroleno	1,33%
27,104	1521,027	β -Elemeno	0,39%
27,462	1530,98	τ -Cadineno	0,25%
27,848	1521,027	(-)- β -Cadineno	1,86%
28,230	1530,98	3,4- metilendioxiopropiofenona	7,96%*
29,199	1556,227	Elemicina	0,60%
29,439	1562,48	\pm -trans-Nerolidol	0,95%
29,926	1575,169	Espatulenol	3,68%
30,110	1579,964	Óxido de cariofileno	1,82%
31,835	1625,831	(-)-Espatulenol	0,94%
32,001	1630,316	2-Hydroxy-4,5- methylenedioxypropiofenone	1,96%
32,225	1636,369	Isoaromadendreno epóxido	0,62%
32,581	1645,988	β -Eudesmol	0,76%
32,745	1650,419	α -Cadinol	0,60%
32,885	1654,202	Eudesm-7(11)-en-4-ol	0,63%
33,099	1659,984	Calareno epóxido	0,32%

5.3 Avaliação da toxicidade oral aguda do óleo essencial de folhas de *P. marginatum* em camundongos.

O experimento de toxicidade oral aguda do óleo essencial de folhas de *P. marginatum* foi realizado com a administração de dose única, por gavagem, de 2000 mg/Kg de OE.

Após três dias do primeiro teste, os grupos (controle e 2000 mg/Kg) foram testados novamente com outros camundongos, totalizando 12 animais fêmeas. Posteriormente a administração do veículo e 2000 mg/Kg, os camundongos permaneceram dentro de suas respectivas gaiolas para observação do comportamento.

Figura 9 – Administração por gavagem.



Fonte: Arquivo pessoal.

A avaliação de toxicidade clínica é um recurso simples que fornece uma estimativa geral da natureza farmacológica e toxicológica de uma substância desconhecida sobre o estado consciente e disposição do animal, bem como sobre a atividade de coordenação do sistema motor, reflexos, atividade sobre o sistema nervoso central e sistema nervoso autônomo (LUCIO et al., 2000)

Após a observação dos animais durante os 14 dias do teste de toxicidade oral aguda, verificou-se que apenas os animais que receberam a concentração de

2000mg/Kg de OE de *P. marginatum* manifestaram sinais clínicos comparados aos animais do grupo que recebeu apenas o veículo (Tabela7).

Tabela 7 – Sinais e sintomas apresentados pelos camundongos Swiss fêmeas expostos oralmente ao veículo e ao óleo essencial de folhas de *Piper marginatum* na concentração de 2000 mg/Kg.

Sinais e sintomas	Grupo Controle (1) e (2)	Grupo 2000mg/Kg (1) e (2)	Tempo (min)
Alterações na pele, olhos e mucosas	Ausente	Ausente	-
Motilidade reduzida	Ausente	Presente	15
Irritabilidade	Ausente	Ausente	-
Tremores	Ausente	Ausente	-
Convulsões	Ausente	Ausente	-
Salivação	Ausente	Ausente	-
Poliúria/Anúria	Ausente	Ausente	-
Diarréia	Ausente	Ausente	-
Letargia	Ausente	Ausente	-
Sono	Ausente	Ausente	-
Óbito	Ausente	Ausente	-

(1) Primeiro teste; (2) Segundo teste

A motilidade reduzida foi um sinal clínico observado no teste 1 e teste 2 após a administração, por gavagem, do OE de *P. marginatum* na concentração de 2000mg/Kg, não persistindo após os 15 (quinze) minutos de observação. Além disso, não foi constatado óbito nos grupos controle e 2000mg/Kg.

Nas duas etapas do experimento os animais tiveram seu peso corporal (Tabela 8) verificado antes da administração do veículo e OE de folhas de *P. marginatum*, denominado dia 0 (zero), no 7º dia e 14º dia pós-administração. Tanto no primeiro teste quanto no segundo teste, verificou-se que não houve diferença significativa do peso dos animais do grupo 2000mg/Kg em relação aos animais do grupo controle.

Tabela 8 – Média do peso de camundongos Swiss fêmeas expostos oralmente ao veículo e ao OE de folhas de *Piper marginatum* na concentração de 2000 mg/Kg. Dados expressos em Média ± Erro padrão da média, ANOVA de duas vias seguido de *post test Tukey*, $p < 0,05$.

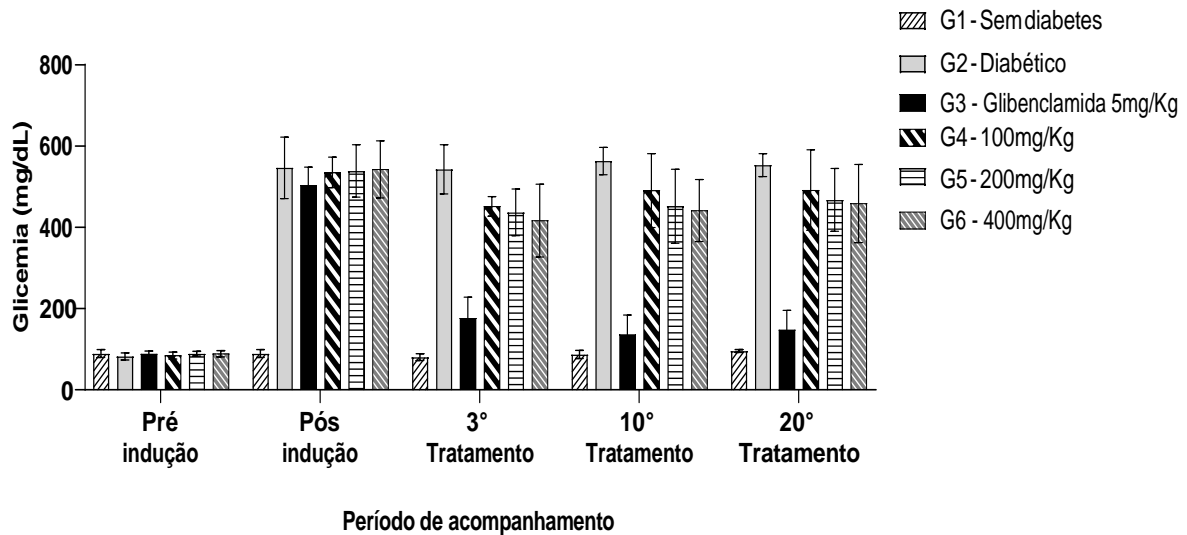
Dia	Teste 1		Teste 2	
	Controle	2000mg/Kg	Controle	2000mg/Kg
0	34,0±1,00 n=3	37,33±0,66 n=3	40,0±1,00 n=3	37,33±0,33 n=3
7	40,0±1,00 n=3	41,0±1,52 n=3	41,66±1,76 n=3	41,33±0,88 n=3
14	42,0±1,52 n=3	41,66±1,33 n=3	42,66±1,45 n=3	42,33±1,45 n=3

5.4 Avaliação da Glicemia em jejum dos camundongos

Os valores glicêmicos dos animais foram verificados, por meio do aparelho digital de marca On call Plus, em 5 (cinco) momentos: antes da indução do diabetes, após a indução e no 3° dia, 10° dia e 20° dia de tratamento conforme apresenta a figura 10.

Os animais que receberam a indução do diabetes experimental com aloxana apresentaram glicemia em jejum superior a 400mg/dL no período pós indução quando comparados aos animais do grupo I, sem diabetes, que não apresentaram diferença dos níveis glicêmicos durante os 20 dias de tratamento. Os animais que receberam as concentrações de 100mg/Kg, 200mg/Kg e 400mg/Kg de OE de folhas de *P. marginatum* mantiveram a hiperglicemia durante os 20 dias de tratamento quando comparados aos animais que receberam a droga padrão ($p < 0,0001$).

Figura 10 – Glicemia em jejum (mg/dL) de camundongos Swiss (n:6) dos grupos controles e experimentais no período de acompanhamento: pré indução, pós indução e no 3º dia, 10º dia e 20º dia de tratamento. Dados expressos em Média \pm Desvio padrão da média, ANOVA de duas vias seguido de *post test Tukey*, $p < 0,05$.



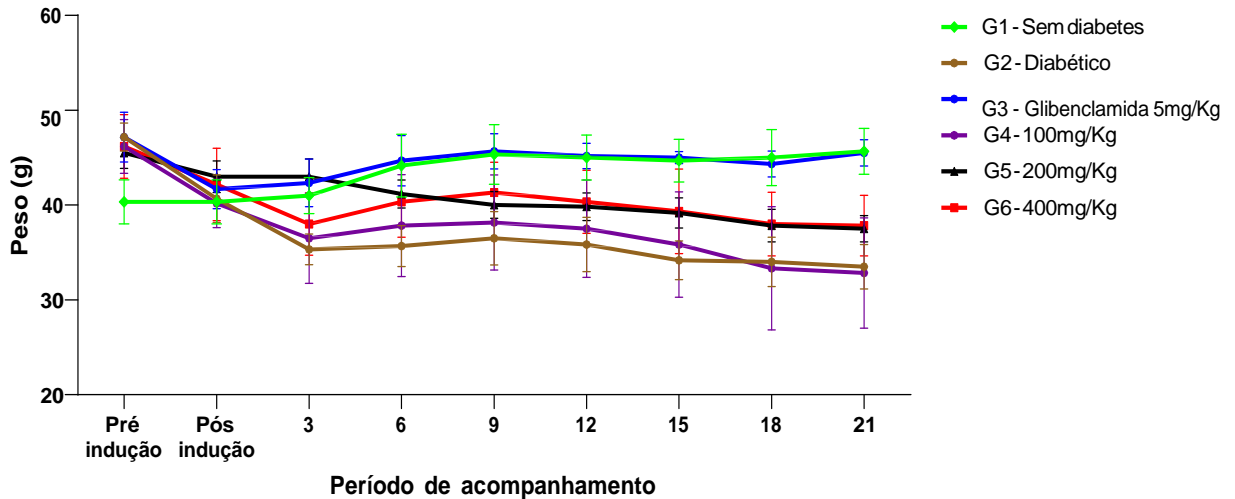
5.5 Avaliação do peso corporal dos camundongos.

O peso dos animais foi mensurado ao longo do experimento, ou seja, no período pré indução do diabetes, pós indução e a cada 3 (três) dias do tratamento em balança semi-analítica e expresso em gramas. Vale ressaltar que a ração foi controlada (15g/dia) para que não houvesse interferência nos dados.

Os animais que receberam a indução com aloxana apresentaram sua massa corporal diminuída quando comparados aos animais que não receberam a substância indutora de diabetes no período denominado, na figura 11, de pós indução. O peso dos animais diabéticos tratados apenas com veículo apresentou diminuição significativa em relação ao peso dos animais controle sem diabetes tratados com veículo.

Além disso, os animais diabéticos que receberam apenas o veículo apresentaram diminuição do peso a partir do 3º dia de tratamento quando comparados aos animais que receberam o OE de folhas de *P. marginatum*. Os animais que receberam o OE de folhas de *P. marginatum* apresentaram redução do peso durante os 21 dias de experimento quando comparados aos animais que receberam a droga padrão.

Figura 11 – Peso corporal (g) de camundongos Swiss (n:6) dos grupos controles e experimentais no período de acompanhamento: pré indução, pós indução e a cada 3 dias de tratamento. Dados expressos em Média \pm Desvio padrão da média, ANOVA de duas vias seguido de *post test Tukey*, $p < 0,05$.

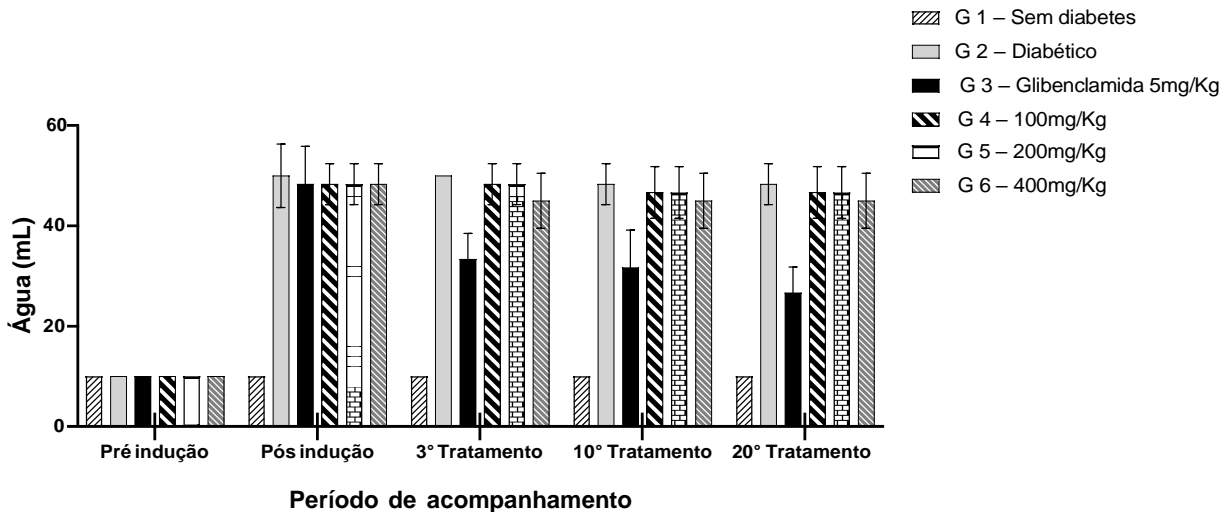


5.6 Avaliação da ingestá hídrica dos camundongos

A ingestá de água em 24 h entre os animais dos grupos controles e experimentais foi acompanhada no período antes da indução do diabetes experimental, após a indução e durante o 3°, 10° e 20° dia de tratamento. O total de água ingerida foi calculado mediante o volume de água (mL) encontrada no reservatório após as 24 h subtraído pelo volume inicial de água.

Os animais que foram induzidos ao diabetes experimental apresentaram aumento significativo da ingestá hídrica quando comparados aos animais que não receberam a substância aloxana ($p < 0,0001$) (figura 12). Não houve diferença significativa da ingestá hídrica dos animais diabéticos tratados com o OE de folhas de *P. marginatum* quando comparados aos animais diabéticos tratados apenas com o veículo. Os animais diabéticos que receberam a droga padrão apresentaram redução significativa em relação aos animais diabéticos que receberam o OE de folhas de *P. marginatum* durante os 20 dias de tratamento ($p < 0,0001$).

Figura 12 – A ingesta hídrica (mL) de camundongos Swiss (n:6) dos grupos controles e experimentais no período de acompanhamento: pré indução, pós indução e no 3º dia, 10º dia e 20º dia de tratamento. Dados expressos em Média \pm Desvio padrão da média, ANOVA de duas vias seguido de *post test Tukey*, $p < 0,05$.

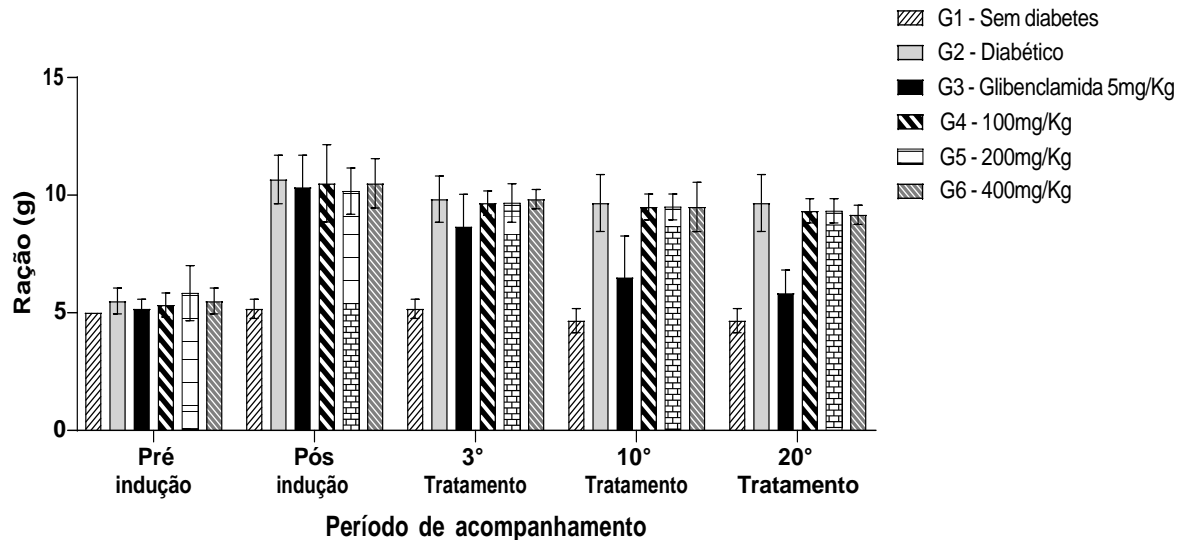


5.7 Avaliação da ingesta alimentar dos camundongos

A quantidade de ração consumida em 24 h entre os animais dos grupos controles e experimentais foi acompanhada no período antes da indução do diabetes experimental, após a indução e durante o 3º, 10º e 20º dia de tratamento. O total de alimento ingerido foi calculado mediante o peso da ração encontrada no reservatório após as 24 h subtraído pelo peso inicial de ração.

Todos os animais diabéticos apresentaram aumento significativo no consumo de ração quando comparados aos animais sem diabetes no período pós indução ($p < 0,0001$) (figura 13). Não houve diferença significativa da ingesta alimentar dos animais diabéticos tratados com o OE de folhas de *P. marginatum* quando comparados aos animais diabéticos tratados apenas com o veículo. Os animais diabéticos que receberam a droga padrão apresentaram redução significativa do consumo de ração em relação aos animais diabéticos que receberam o OE de folhas de *P. marginatum* durante os 20 dias de tratamento ($p < 0,0001$).

Figura 13 – Ingesta alimentar (g) de camundongos Swiss (n:6) dos grupos controles e experimentais no período de acompanhamento: pré indução, pós indução e no 3º dia, 10º dia e 20º dia de tratamento. Dados expressos em Média \pm Desvio padrão da média, ANOVA de duas vias seguido de *post test Tukey*, $p < 0,05$.



5.8 Avaliação das funções hepáticas e renais

Após os 20 dias de tratamento, os camundongos Swiss foram submetidos a punção cardíaca e todas as amostras de sangue foram analisadas para determinar os parâmetros bioquímicos das funções hepáticas (AST e ALT) e renais (uréia e creatinina). A tabela 9 revela os resultados bioquímicos (Média \pm Erro padrão da média) dos animais de cada grupo experimental expostos ao veículo, a glibenclamida ou ao OE de folhas de *P. marginatum*.

Os animais diabéticos tratados com o OE e veículo apresentaram aumento nos parâmetros de ALT e uréia quando comparados aos animais sem diabetes (Tabela 9). Os animais diabéticos que receberam a glibenclamida apresentaram valores de ALT inferior aos animais sem diabetes. O tratamento com a concentração de 400mg/Kg de OE de *P. marginatum* promoveu diminuição dos níveis de AST dos animais diabéticos em relação aos animais tratados com a droga padrão. Não houve diferença significativa dos níveis de creatinina dos animais diabéticos tratados com o OE de folhas de *P. marginatum* nas concentrações de 100mg/Kg, 200mg/Kg e 400mg/Kg quando comparados aos animais diabéticos tratados com a droga padrão.

Tabela 9 – Parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss (n:6) expostos oralmente ao veículo e ao óleo essencial de folhas de *Piper marginatum* nas concentrações de 100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 400 mg/Kg. Dados expressos em Média \pm Erro padrão da média, ANOVA de duas vias seguido de *post test Tukey*, $p < 0,05$.

Parâmetros	Sem diabetes	Diabético	Glibenc 5mg/Kg	100mg/Kg	200mg/Kg	400mg/Kg
ALT	61,16 \pm 9,78	163,16 \pm 20,11	51,33 \pm 7,56	84,66 \pm 10,27	105,83 \pm 10,43	92,0 \pm 5,20
AST	183,16 \pm 18,29	222,66 \pm 19,77	152,16 \pm 20,61	192,66 \pm 7,41	172,5 \pm 23,79	129,5 \pm 15,95
Uréia	36,16 \pm 2,52	93,83 \pm 7,18	41,83 \pm 3,50	80,3 \pm 4,67	66,33 \pm 3,86	75,83 \pm 3,25
Creatinina	0,16 \pm 0,03	0,36 \pm 0,04	0,38 \pm 0,03	0,43 \pm 0,04	0,38 \pm 0,04	0,18 \pm 0,03

6 DISCUSSÃO

O OE de folhas de *P. marginatum* apresentou uma variabilidade no rendimento ao ser extraído em estações diferentes, seca ou chuva, no município de Santarém. Percebeu-se que o percentual do rendimento do óleo aumenta a medida que se aproxima dos meses mais chuvosos. A estação quente em Santarém acontece entre os meses de setembro a dezembro, enquanto que os meses mais chuvosos estão entre janeiro e junho.

No presente trabalho as folhas coletadas no mês de abril considerado chuvoso, apresentou 1,22% de rendimento, isto é, mais que o dobro do rendimento da amostra 1, 0,51%, coletada no mês de setembro com temperaturas mais quente. Resultados semelhantes foram encontrados por Camargo (2018) ao analisar a sazonalidade em três regiões brasileiras. Na Região Norte o rendimento obtido no inverno e verão foi de 0,90% e 0,55%, respectivamente.

Em contrapartida, essa relação de maior rendimento com período de chuva não foi encontrada por Oliveira (2019) em estudo realizado no Estado do Amazonas. Sendo observado o mais alto rendimento no mês de outubro, período de seca intensa na região, (0,24%), enquanto que o mais baixo rendimento foi obtido no mês de fevereiro (0,10%), época mais chuvosa.

A divergência entre esses resultados pode ser explicada pelos diversos fatores que influenciam no rendimento e composição dos óleos essenciais, como variação genética, nutrição da planta, estresse durante o seu crescimento ou maturação, localização geográfica, clima, variações do tempo, processo de secagem e armazenamento após a coleta (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Na amostra coletada em janeiro de 2019 foram encontrados 43 componentes em sua composição. A análise química mostrou a presença de sesquiterpenos (56,15%), monoterpenos (27,46%), e fenilpropanóides (16,39%), além disso, revelou os constituintes majoritários: 3-Careno (13,28%), seguido pelo Cariofileno (12,57%), Copaeno (9,50%), 3,4-metilenodioxipropiofenona (7,96%), Elixeno (6,02%), β -Cubebeno (5,60%).

Estudo realizado por Oliveira et al., (2019) revelou a presença do monoterpeno 3-Careno (10,52%) como composto majoritário no OE de folhas de *P. marginatum* coletadas no município de Itacoatiara-AM. Camargo (2018) em coletas

de folhas de *P. marginatum* no município de Novo Progresso-PA identificou como composto majoritário no OE o Cariofileno (11,81%). No entanto, Bay-Hurtado et al., (2016), em estudo realizado em Rondônia-RO, encontraram componentes majoritários diferentes dos encontrados no município do Amazonas e do Pará, sendo (E) - anetol (10,10%), Bicyclgermacreno (9,40%), Germacreno D (8,83%), Germacreno B (8,07%) e (Z) – anetol (8,01%).

Diante disso, embora os estudos citados se concentrem na mesma região do País, percebeu-se a diversidade da composição química do OE de folhas de *P. marginatum* entre Estados da Região Norte. Desse modo, entende-se que a variação no teor de metabólitos secundários majoritários esteja relacionada a atividade da planta.

A presença do monoterpeneo 3-Careno como constituinte químico majoritário no estudo realizado por Oliveira (2019) revelou atividade tripanocida. Enquanto que para Gonçalves (2013) apresentou capacidade inseticida. Em outras espécies de plantas onde predomina o alto teor de 3-Careno, evidenciou aumento na peroxidação lipídica em células bacterianas (MONTANARI, 2010). Nesse sentido, faz-se necessário investir em mais estudos a fim de identificar as potencialidades da espécie *P. marginatum*.

A toxicidade oral aguda descrita pelo Guideline 423 (OECD 423; 2001) tem como objetivo produzir efeitos adversos em um breve período após a administração oral de uma única dose de uma substância ou após múltiplas doses fornecidas durante 24 horas. Desta forma, pode fornecer subsídios referentes aos riscos à saúde após uma exposição de curta duração. Concomitantemente, recomenda que se inicie o tratamento de três animais com a concentração de 300 mg/kg quando se desconhece os efeitos da droga. No entanto, no caso de espécies da Família Piperaceae há, na base de dados, estudos científicos ressaltando as doses administradas na toxicidade aguda.

É imprescindível ressaltar o estudo científico realizado por Sousa et al (2008) em que realizaram a avaliação toxicológica de uma espécie da Família Piperaceae em camundongos nas concentrações de 1000, 2000, 2350, 2500, 2700 e 3000 mg/kg do óleo essencial (OE).

Os animais do grupo 2000 mg/Kg apresentaram no tempo de 15 minutos pouco movimento na gaiola comparado ao grupo controle. No entanto, ao observar

após o tempo de 15 minutos os animais não apresentaram nenhum sinal e/ou sintoma atípico. Os animais do grupo controle por sua vez não apresentaram neste estudo manifestações comportamentais.

Uma das hipóteses que poderia estar causando esse comportamento seria o estresse devido à contenção do animal. Ao manusear os animais devem ser tomadas todas as precauções possíveis com o intuito de garantir o mínimo de estresse durante a manipulação (ANDERSEN, 2004). Entretanto, os animais do grupo controle também foram contidos para administração do veículo e esse comportamento não foi visualizado.

A segunda hipótese seria o odor particular do óleo essencial do vegetal e por não estarem acostumados com aroma forte ficaram retraídos no canto da gaiola. Uma das características da *Piper* é possuírem um sabor forte e um cheiro aromático (COSTA, 2013). Assim, sendo o olfato o sentido mais desenvolvido dos ratos e camundongos, os odores acabam estressando os animais e alterando seu comportamento (NEVES, 2013).

Embora os animais dos grupos experimentais tenham sido exposto ao veículo e a uma concentração de OE de 2000 mg/Kg, não observou-se óbitos durante os 14 dias. Nesse sentido, pode-se destacar que o óleo essencial de folhas de *P. marginatum* tem sido tolerável até 2000 mg/Kg em modelos experimentais.

O estudo realizado por Sousa et al. (2008) demonstraram uma tolerância com espécies de *Piper aduncum*, em que na concentração de 2000 mg/kg os camundongos apresentaram somente aumento na excreção de fezes e urina e concluíram que a espécie estudada possui uma margem elevada de segurança, com efeitos tóxicos mínimos sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Outrora, destaca-se a importância de realizar o teste de toxicidade aguda nas espécies de *Piper* como forma de identificar sinais tóxicos e que prejudiquem a população. Até porque existem plantas do gênero *Piper* com potenciais tóxicos, segundo Barbosa et al. (2013).

A variável peso dos animais do grupo controle e 2000mg/Kg foi verificada no dia 0, 7 e 14. As alterações no peso corporal têm sido utilizadas como um indicador de efeitos adversos das drogas e produtos químicos em animais testados (DESMARCHELIER et al. 1996).

Diante disso, percebeu-se um aumento na média do peso dos camundongos durante os 14 dias tanto no grupo controle quanto no grupo que recebeu a concentração de 2000 mg/Kg de óleo essencial de folhas de *P. marginatum*. Sendo assim, não houve diferença significativa entre os grupos. O ganho de peso nos animais que receberam o OE torna-se um fator positivo para classificar o vegetal como atóxico.

Inúmeros países, nos últimos anos, reconhecem o DM como um problema de saúde pública, pois além dos diversos danos à saúde dos pacientes, o crescente número de indivíduos acometidos pela doença leva a graves repercussões sócio-econômicas, tais como mortes prematuras, incapacidade para o trabalho, altos custos relacionados ao seu controle e ao tratamento de suas complicações (ARCARO FILHO, 2014).

Nesse sentido, a busca de substâncias bioativas provenientes de plantas ou de substâncias isoladas pode ser considerada uma alternativa para o tratamento de doenças que acomete a população. Assim sendo, é importante a realização de estudos etnofarmacológicos para que o conhecimento tradicional seja devidamente resgatado, preservado e utilizado como subsídio de pesquisa com plantas medicinais (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Na avaliação da glicemia verificou-se no primeiro momento de acompanhamento denominado pré indução do diabetes experimental que todos os animais apresentaram glicemia em jejum inferior a 100 mg/dL, indicando, portanto que não estavam diabéticos.

Após a administração da substância Aloxana os camundongos do GII, GIII, GIV, GV e GVI apresentaram glicemia em jejum superior a 200 mg/Kg, como também, sinais e sintomas como perda de peso corporal, polifagia, polidipsia, característicos de pacientes diabéticos quando comparados ao grupo controle I, os quais não sofreram a indução do diabetes. Esses sinais e sintomas desencadeados pela aloxana são semelhantes aos encontrados na síndrome diabética em humanos (CAVALLI et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007).

Ao mensurar a glicemia em jejum no 3º dia de tratamento, os camundongos dos grupos tratados com o OE de folhas de *P. marginatum* nas concentrações de 100 mg/Kg, 200 mg/Kg e 400 mg/Kg não apresentaram redução significativa da glicemia em relação ao grupo que recebeu a droga padrão, glibenclamida 5 mg/Kg.

Ao mesmo tempo, os animais que receberam o OE quando comparados aos animais diabéticos tratados apenas com veículo apresentaram uma discreta diminuição, mas permanecendo com valores médios glicêmicos acima de 400 mg/dL.

A hiperglicemia dos grupos tratados com o OE de folhas de *P. marginatum* manteve-se durante o 10º e 20º dia de tratamento enquanto que o grupo tratado com a droga padrão permanecia com valores médios abaixo de 200 mg/dL. Em relação ao grupo diabético tratado apenas com veículo observou-se que os camundongos permaneceram diabéticos em todos os dias de tratamento.

As plantas do gênero *Piper* vêm sendo estudadas devido a sua ampla atividade citotóxica, inseticida, antimicrobiana, antioxidante, antineoplásica, e antidiabética. Estudos realizados por Kumar et al. (2013) e Shanmugam et al. (2007) revelaram resultado positivo na redução de níveis glicêmicos em modelos experimentais, utilizando, respectivamente, óleo e extrato etanólico da espécie *Piper longum*.

Além disso, Kumar et al. (2013) apontaram a redução da glicemia nas concentrações de 100 e 200 mg/Kg do óleo de *P. longum* administradas nos animais durante 28 dias. Já o presente experimento com o OE de folhas de *P. marginatum* utilizando das concentrações semelhantes, além da concentração de 400 mg/Kg, não apresentou o mesmo resultado.

Embora algumas espécies de *Piper* apontarem ser promissoras, no que diz respeito à atividade antidiabética, este experimento demonstrou que o OE de folhas de *P. marginatum* não apresentou atividade antidiabética por manter a hiperglicemia nos animais tratados com o vegetal até o final do experimento.

Diante do resultado do peso, evidenciou-se uma diminuição no peso corporal entre os animais submetidos à administração de Aloxana no momento pós-indução em relação aos animais do grupo controle não diabético. Notadamente, explica-se a redução da massa corpórea à diabetes adquirida quimicamente, uma vez em que os animais do grupo controle sem diabetes não apresentaram resultados semelhantes.

Nesse contexto, a American Diabetes Association (2011) reforça que os sintomas característicos da hiperglicemia acentuada incluem além da significativa perda de peso, a poliúria, a polidipsia e polifagia. Contudo, os demais sintomas também foram observados no momento pós-indução por apresentar maravalha úmida, volume de ração e água diminuído nos reservatórios.

A massa corpórea do grupo controle sem diabetes manteve-se dentro dos níveis médios esperados para camundongos saudáveis. A partir do 3º dia de tratamento observou-se um ganho de peso dos animais do grupo tratado com Glibenclamida 5mg/Kg, evidenciado pela linha paralela com o grupo sem diabetes, e manteve-se em crescente até o final do experimento.

Isso demonstra a eficácia da droga padrão, ou seja, uma vez controlado os valores glicêmicos os animais apresentaram aumento de peso. Desse modo, um dos maiores efeitos adversos da glibenclamida é o ganho de peso (PHUNG et al., 2010).

Já o peso dos animais do grupo tratado com o OE de folhas de *P. marginatum* apresentou redução significativa comparado ao grupo que recebeu a glibenclamida e ao grupo sem diabetes. A curva decrescente do peso dos animais mostrou-se no grupo diabético tratado com veículo e tratado com OE. Entretanto o peso dos animais do grupo 200 mg/Kg e 400 mg/Kg apresentou um declínio entre o 12º e 20º de tratamento. Enquanto que o grupo tratado com a concentração de 100 mg/Kg de OE mostrou valores mais próximos ao do grupo diabético tratado com veículo e um declínio progressivo a partir do 12º dia de tratamento.

Diante disso, observou-se que a perda da massa corpórea entre os animais que foram expostos ao OE de *P. marginatum* e ao veículo está associado com os valores glicêmicos elevados.

A ingestão de água entre os animais dos grupos no período pré-indução mostrou-se diretamente proporcional, estabelecendo um consumo diário de 10 mL. Estudos realizados por Neves (2013) para elaboração do Manual de Cuidados e Procedimento com Animais de Laboratório, indicam que a água ingerida por um camundongo adulto varia entre 3 a 7 mL/dia.

Outrora, percebeu-se um aumento da ingestão hídrica, denominado polidipsia, entre os camundongos dos grupos expostos a administração da aloxana em relação ao grupo que não recebeu a substância. Isso significa que a substância utilizada para indução apresentou ação positiva nos modelos experimentais uma vez que ocasionou sintomas característicos de paciente com DM.

O consumo de água dos camundongos diabéticos durante o tratamento comportou-se de maneira semelhante ao período pós-indução, exceto do grupo tratado com a droga padrão. Observou-se no 3º dia de tratamento uma redução acentuada na ingestão hídrica pelos animais tratados com glibenclamida que permaneceu

reduzido no 10° e 20° dia de tratamento em relação aos animais diabéticos tratados com OE de folhas de *P. marginatum* e veículo.

Os animais diabéticos expostos ao óleo vegetal não apresentaram uma redução significativa na avaliação do 3°, 10° e 20° de tratamento, permanecendo próximo ao grupo controle diabético tratado somente com veículo. Dentre as três concentrações do óleo essencial administradas nos animais a de 400 mg/Kg foi a que apresentou uma discreta redução, mas não o suficiente para indicar uma melhora do quadro.

Com a diminuição do volume de água ingerido pelos animais tratados com o fármaco padrão, conseqüentemente, houve redução do débito urinário, com isso as gaiolas apresentaram menos sujidade e odor; e, maravalha mais seca, semelhante as gaiolas do grupo controle sem diabetes. Concomitantemente, o ambiente mais limpo contribuiu para reduzir estresse nos animais. O mesmo resultado não foi observado nas gaiolas dos animais diabéticos tratados com OE de folhas de *P. marginatum* e veículo, pelo contrário, as gaiolas eram sujas e maravalha extremamente úmida e com odor forte.

O presente estudo identificou que antes da hiperglicemia os animais consumiam em média 5 g de ração em 24 h. Mas após a indução com aloxana a ingestão alimentar duplicou, em 3 dias, entre os animais diabéticos em relação aos animais considerados normais. O grupo controle sem diabetes manteve-se com consumo de ração homogêneo do início ao final do experimento.

De acordo com Neves (2013) o consumo de ração pelos animais de laboratório do Biotério, fica em torno de 4 a 5 g/dia. Desse modo, a quantidade de alimento ingerida no experimento pelos camundongos do grupo controle sem diabetes esteve dentro dos parâmetros fisiológicos considerados normais para a espécie.

No 3° dia de tratamento observou-se uma discreta redução na ingestão alimentar pelos animais tratados com glibenclamida que acentuou no 10° e 20° dia de tratamento em relação aos animais diabéticos tratados com OE de folhas de *P. marginatum* e veículo.

Em virtude disso, sugere-se que o consumo de ração pelo Grupo III foi refletido pela redução dos valores glicêmicos dos animais. A melhora do controle glicêmico do DM previne as complicações agudas e crônicas, diminui a morbi-

mortalidade por doenças cardiovasculares e melhora a qualidade de vida do diabético (ARAÚJO, 2000).

Entretanto, evidenciou-se entre os animais diabéticos expostos ao óleo vegetal e ao veículo uma das sintomatologias do DM, a polifagia. Isto contribui para que não houvesse redução significativa da ingesta alimentar durante os 20 dias de tratamento, mantendo-se o consumo em torno de 10 g em 24 h em relação aos animais expostos a droga padrão. Este resultado mostrou-se que OE de folhas de *P. marginatum* não promoveu melhora da sintomatologia do Diabetes nos camundongos.

Diante dos resultados dos parâmetros bioquímicos, pode-se observar que os níveis de marcadores hepáticos (ALT e AST) nos animais diabéticos dos grupos expostos ao OE e controle diabetes estão relativamente aumentados quando comparados aos animais dos grupos sem diabetes e tratados com a glibenclamida.

Entretanto o estudo realizado por De Lima (2018) considerou intervalos de referência hepático a nível de ALT nos camundongos Swiss entre 70 a 140 U/L. Enquanto que o AST entre 73 a 188 U/L. Dessa forma, demonstra que apenas o grupo controle diabetes apresentou alteração nos dois marcadores hepáticos e o grupo do OE a 100 mg/Kg apresentou discreta alteração hepática para AST.

Além disso, destaca-se os valores médios hepáticos de AST dos animais tratados com o OE de folhas de *P. marginatum* que diminuem gradativamente a medida que aumenta a dose em mg/Kg, revelando níveis menores que os animais diabéticos expostos a glibenclamida e os animais sem diabetes. Nesse sentido, sugere-se que o OE apresente propriedade hepatoprotetora, mas para tanto é necessário estudos adicionais como por exemplo atividade antioxidante e exame histopatológico.

Brú e Guzman (2016), ao realizar um levantamento na literatura, identificaram que o uso da planta *P. marginatum* tem sido usado na medicina popular para tratar doenças hepáticas. Em estudo realizado por Bay-Hurtado et al, (2016) apontaram que o OE de raízes de *P. marginatum* possui uma atividade biológica possivelmente anti-inflamatória ou antioxidante. Por isso, a importância de novas pesquisas voltadas aos outros órgãos da planta.

A uréia nos animais diabéticos, exceto os animais do grupo que receberam glibenclamida, apresentaram valores médios aproximados e foi aproximadamente

2,2 vezes maior em relação ao grupo controle não diabético. Enquanto isso, a uréia dos animais do grupo glibenclamida e dos animais sem diabetes apresentaram valores similares.

Os dados corroboram novamente com o estudo realizado por De Lima (2018) quando avalia o perfil bioquímico dos camundongos Swiss do Biotério da Universidade Federal do Ceará. Ao comparar os resultados da pesquisa com os valores de referência percebe-se que a uréia dos camundongos diabéticos estão significativamente aumentados em relação aos camundongos normais.

Nota-se também alteração deste marcador renal ao comparar com a pesquisa realizada por Araújo (2012) em que estabelece valores de referência para parâmetros bioquímicos de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ.

Nesse sentido, sugere-se que o diabetes experimental induzido por aloxana promoveu um aumento dos níveis de glicemia e conseqüentemente uma alteração no parâmetro bioquímico renal, e isso foi evidenciado pelos níveis de uréia dos camundongos diabéticos neste estudo.

Em contrapartida, o perfil bioquímico da creatinina nos camundongos diabéticos e não diabéticos não apresentou diferença significativa, mantendo os valores dentro do padrão da normalidade.

7 CONCLUSÃO

A toxicidade oral aguda é uma prática de suma importância para definir o potencial tóxico da espécie vegetal e a dose mínima a ser utilizada em experimento *in vivo*. A avaliação toxicológica da espécie *P. marginatum*, recebida pelos animais em única concentração de OE de 2000 mg/Kg, revelou ganho de peso corpóreo nos camundongos e ausência de sinais de intoxicação e de óbitos durante os 14 dias. Nesse sentido, pode-se destacar que o OE de folhas de *P. marginatum* demonstra ser atóxico até a concentração de 2000 mg/Kg.

Os constituintes químicos do óleo essencial de *P. marginatum* majoritários foram: 3-Carene (13,28%), seguido pelo Cariofileno (12,57%), Copaeno (9,50%), 3,4-metilenodioxipropiofenona (7,96%), Elixeno (6,02%), β -Cubebeno (5,60%). Dessa forma, estando em consonância com as demais pesquisas relacionadas a essa espécie.

Com base na avaliação da glicemia, o OE da espécie utilizada no estudo não influenciou na diminuição dos níveis glicêmicos dos camundongos, permanecendo valores de glicemia acima de 200 mg/dL.

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos a discreta alteração hepática e renal, no que diz respeito a uréia, ocorre pela exposição o diabetes. O que se destaca no perfil bioquímico são os valores médios hepáticos de AST dos animais expostos ao OE de folhas de *P. marginatum* que diminuem gradativamente a medida que a dose em mg/Kg é aumentada, revelando níveis menores que os animais diabéticos expostos a glibenclamida e os animais sem diabetes.

Para contribuir com as pesquisas realizadas com modelos experimentais, sugere-se a Universidade do Estado do Pará a padronização de valores de referência de parâmetros bioquímico dos camundongos e ratos produzidos no Biotério, uma vez que os kits de reagentes estão padronizados para humanos e os intervalos de referência da linhagem Swiss consultados na literatura diferem entre biotérios.

Contudo, embora o OE de folhas de *P. marginatum* não tenha apresentado um efeito satisfatório na redução da glicemia nos modelos experimentais, acredita-se que os resultados desta pesquisa contribuíram para o conhecimento toxicológico da espécie estudada, por isso faz-se necessário investir em mais estudos

experimentais e com abordagem in vitro a fim de identificar potencial biológico e complementar as informações apresentadas neste estudo.

REFERENCIAS

- ABDEL-HASSAN, I.A; ABDEL-BARRY, J.A; MOHAMMEDA, S.T. **The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits.** Journal of Ethnopharmacology, Lausanne, v.71, 325-330, 2000.
- AHMED, H.H; SALEM, A.M; SABRY, G.M; HUSEIN, A.A e KOTOB, S.E. **Possible therapeutic uses of *Salvia triloba* and *Piper nigrum* in Alzheimer's disease-induced rats.** Journal of Medicinal Food, v.16, 437-446, 2013.
- ALECIO, A.C; DA SILVA, B.V; YOUNG, M.C; KATO, M.J; FURLAN, M. **Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*.** Journal of Natural Products, v.61, 637-639, 1998.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. **Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. v.40, 4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, E.R; GUEDES, M.C; ALBUQUERQUE, J.F.C; XAVIER, H. **Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats.** Fitoterapia, v.77, 276-8, 2006.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** Diabetes Care, v.34, n.1, S62-S69, 2011.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes – 2018.** Diabetes Care. v.41, S13-S27, 2018.
- ANDERSEN, M.L; D'ALMEIDA, V; KO, G.M; KAWAKAMI, R; MARTINS, P.J.F. Procedimentos experimentais. In: ANDERSEN, M.L; D'ALMEIDA, V; KO, G.M; KAWAKAMI, R; MARTINS, P.J.F. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação.** São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo; 45-70, 2004.
- ARAUJO, L.M.B; BRITTO, M.M.S; CRUZ, T.R.P. **Tratamento do Diabetes Mellitus do Tipo 2: novas opções.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. v. 44, n°6, 2000.
- ARAÚJO, Fernanda T.M. **Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório/FIOCRUZ.** Belo Horizonte, 2012.
- ARCARO FILHO, Carlos Alberto. **Atividade antidiabética, em modelo *in vivo*, da curcumina administrada em suspensão de iogurte na ausência e na presença de piperina.** Dissertação de Mestrado. Araraquara, 2014.
- ARDUINO, F.H; SOARES, M.L. **Ação hipoglicemiante do cajueiro em indivíduos normais.** Brasil Médico, v.65, 305-8, 1951.

AUTRAN, E.S; NEVES, I.A; SILVA, C.S.B; SANTOS, G.K.N; NAVARRO, D.M.A.F. **Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae).** Bioresource Technology. v.100, 2284-2288, 2009.

BAGATELA, B.S; LOPES, A.P; FONSECA, F.L; ANDREO, M.A; NANAYAKKARA, D.N; BASTOS, J.K; PERAZZO, F.F. **Evaluation of antimicrobial and antimalarial activities of crude extract, fractions and 4-nerolidylcatechol from the aerial parts of *Piper umbellata* L. (Piperaceae).** Natural Product Research, 2013.

BALUCHNEJADMOJARAD, T., et al. **Beneficial effect of aqueous garlic extract on the vascular reactivity of strep to zotoc in d iabetic rat s.** Journal of Ethnopharmacology, v.85, n.1, 139-44, 2003.

BARBOSA, D.R.; LENARDON, L.; PARTATA, A.K. **Kava-kava (*Piper methysticum*): uma revisão geral.** Revista Científica do ITPAC, Araguaína, v.6, n.3, 3, 2013.

BARROS, S.B.M; TEIXEIRA, D.S; AZNAR, A.E; MOREIRA, J.A; ISHII, I; FREITAS, P.C.D. **Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Pariparoba).** Ciência e cultura, Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, vol. 48(1/2): 114-116, 1996.

BATALHA, M.O., et al. **Plantas medicinais no Estado de São Paulo: situação atual, perspectivas e entraves ao desenvolvimento.** Florestar Estatístico, v.6, n.15, 27- 35, 2003.

BAY-HURTADO, F; LIMA, R.A; TEIXEIRA, L.F; SILVA, I.C.F; BAY, M; AZEVEDO, M.S; FACUNDO, V.A. **Atividade Antioxidante e caracterização do óleo essencial das raízes de *Piper marginatum* Jacq.** Ciência e Natura v.38 n.3, 1504-1511, 2016.

BERG, M. E. VAN DEN. **Plantas Medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático.** 3ª ed., MPEG, Belém, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Fitoterápicos.** Ano de base: 2009. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 11 out. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: diabetes mellitus / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica.** – Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos.** Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados /** Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário Terapêutico Nacional 2010: Rename 2010.** 2. ed. Brasília, 2010.

BRITO, S.C.D. **Os efeitos do marco regulatório sobre a competitividade da cadeia produtiva de medicamentos fitoterápicos no Brasil.** Dissertação (Mestrado em desenvolvimento regional e Agronegócio)-Fundação Universidade Federal de Tocantins, Palmas, 2010.

BRÚ, J; GUZMAN, J.D. **Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.26, 767–779, 2016.

BRUNO, R. M.; GROSS, J. L. **Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study.** Journal of Diabetes and its Complications, [S.l.], v. 14, n. 5, 266–271, 2000.

BURCI, L.M; PEREIRA, I.T; DA SILVA, .LM; RODRIGUES, R.V; FACUNDO, V.A; MILITAO, J.S; SANTOS, A.R; MARQUES, M.C; BAGGIO, C.H; WERNER, M.F. **Antiulcer and gastric anti secretory effects of dichloromethane fraction and piplartine obtained from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. in rats.** Journal of Ethnopharmacology, 148:165-174, 2013.

CAMARGO, R.G. **Variação sazonal e regional dos óleos essenciais de *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae).** Dissertação - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

CANDOLLE, C.D. **Piperaceae.** vol3. Lipsiae, Borntraeger. Jardim Botânico de Genebra, 1902.

CARRARA, V.S; CUNHA-JÚNIOR, E.F; TORRES-SANTOS, E.C; CORRÊA, AG; MONTEIRO, J.L; DEMARCHI, I.G; LONARDONI, M.V.C; CORTEZ, D.A.G. **Antileishmanial activity of amides from *Piper amalago* and synthetic analogs.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2013.

CARRARA, V.S; VIEIRA, S.C; DE PAULA, R.G; RODRIGUES V; MAGALHAES L.G; CORTEZ, D.A; DA SILVA FILHO, A.A. **In vitro schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of *Piper species* and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae).** Journal of Helminthology, 1-6, 2013.

CARVALHO, A.C.B; DINIZ, M.F.F.M; MUKHERJEE, R. **Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil.** Revista Brasileira de Farmácia, v.86, n.1, 11-6, 2005.

CAVALLI, V.L.L.O.; SORDI, C.; TONINI, K.; GRANDO, A.; MUNERON, T.; GUIGI, A.; ROMAN JÚNIOR, W.A. **Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill)**. Revista Brasileira de Farmacognosia. 17(1):64-70, 2007.

CECÍLIO, A.B., et al. **Espécies vegetais indicadas no tratamento do diabetes**. Revista Eletrônica de Farmácia, v.5, n.3, p.23-8, 2008.

COSTA, M.C. **Investigação fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano por bioautografia da *Piper* sp (PIPERACEAE)**. Monografia. Centro de Ciências da Saúde. Santa Catarina, 2013.

D'ANGELO, L.C.A; XAVIER, H.S; TORRES, L.M.B; LAPA, A.J; SOUCCAR, C. **Farmacologia de *Piper marginatum* Jacq. uma planta medicinal folclórica usada como analgésico, antiinflamatório e hemostático**. Phytomedicine, v.4, 33-40, 1997.

DE ALBUQUERQUE, UP; MONTEIRO, JM; RAMOS, MA; DE AMORIM, ELC. **Plantas medicinais e mágicas de um mercado público no nordeste do Brasil**. J Journal of Ethnopharmacology. 110, 76-91, 2007.

DE BFFA; BALBINO, J.M; ZINI, C.A; RIBEIRO, V.L; BORDIGNON, S.A; VON POSER, G. **Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species**. Parasitology Research, 107:243-248, 2010.

DE LIMA, F.E.G. **Perfil bioquímico e hematológico de ratos e camundongos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

DERIVI, S.C.N. **Efeito hipoglicêmico de rações à base de berinjela (*Solanum melongena* L.) em ratos**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.22, n.2, 164-9, 2002.

DESMARCHELIER, C., et al. **Studies on the cytotoxicity, antimicrobial and DNA-binding activities of plants used by the Ese'ejas**. Journal of Ethnopharmacology, v.50, n.2, 91-96, 1996.

DI STASI, L.C; HIRUMA-LIMA, C.A; SOUZA-BRITO, A.R.M; MARIOT, A; SANTOS, C.M. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2a. Ed. São Paulo SP. Editora UNESP. 2002.

DUNCAN, B. B. et al. **Medicina Ambulatorial, Condudas de Atenção Primária Baseadas em Evidências**. 4. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013

EL-SERAG, H.B; EVERHERT, J.E. **Diabetes increases the risk of acute hepatic failure**. Gastroenterology. 122: 1822-8, 2002.

FALCAO, H.S; LIMA, I.O; SANTOS, V.L.D; DANTAS, H.D.F; DINIZ, M.D.F.F.M; BARBOSA-FILHO, J.M; BATISTA, L.M. **Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, 15:381-391, 2005.

FELIPPE, L.G; BALDOQUI, D.C; KATO, M.J; BOLZANI, V.S; GUIMARÃES, E.F; CICARELLI, R.M.B; FURLAN, M. **Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*.** Phytochemistry, 69: 445-450, 2008.

FERREIRA, C.L.R.A; FERREIRA, M.G. **Características epidemiológicas de pacientes diabéticos da rede pública de saúde: análise a partir do sistema HiperDia .** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v.53, n.1, 80-86, 2009.

FRANKLIM, T.N; FREIRE-DE-LIMA, L; DE NAZARETH, S.A; DINIZ, J; PREVIATO, J.O; CASTRO, R.N; MENDONCA-PREVIATO, L; DE LIMA, M.E. **Design, synthesis and trypanocidal evaluation of novel 1,2,4-triazoles-3-thiones derived from natural piperine.** Molecules. 18:6366-6382, 2013.

FUENTES, O., et al. **Hypoglycemic activity of *Bauhinia candicans* in diabetic induced rabbits.** Fitoterapia, v.75, 527-32, 2004.

GBD. **Causas de morte no Brasil 1990-2017.** Disponível em: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>. Acesso em: 03 Abr. 2020.

GHORBANI, A; VAREDI, M; HADJZADEH, S.R; OMRANI, G.H. **Diabetes tipo 1 induz alterações específicas do depósito no diâmetro dos adipócitos e na massa dos tecidos adiposos no rato.** Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, v.118, 442-448, 2010.

GONÇALVES, R.; RIBEIRO, E.M.; AYRES, V.F.S.; NAZARÉ, C.A.N.; GUIMARÃES, A.; LOPES, N.P; BALDIN, E.L.L.; TAKEARA, R. **Constituintes químicos e atividade inseticida do óleo essencial de *Piper marginatum*.** Simpósio de óleos essenciais – UFOPA. Santarém, 2013.

GROVER, J.K; YADAV, S.; VATS, V. **Medicinal plants of India with antidiabetic potential.** Journal of Ethnopharmacology. 81(1):81-100, 2002.

GUIMARÃES, E.F; CARVALHO-SILVA, M; MONTEIRO, D; MEDEIROS, E.S; QUEIROZ, G.A. **Piperaceae Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

GUIMARÃES, E.F; GIORDANO, L.C.S. **Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará.** Rodriguésia, v.55, 21-46, 2004.

GUSSO, G.; LOPES, J.M.C. **Tratado de Medicina de Família e Comunidade.** v. 2. São Paulo: Artmed, 2012.

HUANG, T.H.W; PENG, G.; LI, G.Q; YAMAHARA, J.; ROUFOGALIS, B.D.; LI, Y. ***Salacia oblonga* root improves postprandial hyperlipidemia and hepatic**

steatosis in Zucker diabetic fatty rats: activation of PPAR- α . Toxicology and Applied Pharmacology, San Diego, v.210, 225-235, 2006.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas.** 9th edn. Brussels, Belgium: 2019.

JAFRI, M.A., et al. **Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan: induced diabetic rats.** Journal of Ethnopharmacology, v.70, 309-14, 2000.

JIANG, Z.Y; LIU, W.F; ZHANG, X.M; LUO, J; MA, Y.B; CHEN, J.J. **Anti-HBV active constituents from *Piper longum*.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 23:2123-2127, 2013.

JOHNNY, L.; YUSUF, U.K.; NULIT, R. **Antifungal activity of selected plant leaves crude extracts against a pepper anthracnose fungus, *Colletotrichum capsici* (Sydow) butler and bisby (Ascomycota: Phyllachorales).** African Journal of Biotechnology, v.10, 4157-4165, 2011.

KIM, C; NEWTON, K.M; KNOOP, R.H. **Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes.** Diabetes Care. 25:1862, 2002.

KRAHN, C.L., et al. **Avaliação do efeito da casca desidratada do maracujá (*Passiflora edulis*) e seu extrato aquoso na redução da glicemia em ratos diabéticos induzidos por aloxano.** Revista Brasileira de Farmácia, v.89,32-4, 2008.

KUMAR, S; SHARMA, S; VASUDEVA, N. **Screening of antidiabetic and antihyperlipidemic potential of oil from *Piper longum* and piperine with their possible mechanism.** Expert Opin Pharmacotherapy. 14:1723-1736, 2013.

LANS, C; GEORGES, K. **O conhecimento das mulheres sobre as ervas utilizadas na reprodução em Trinidad e Tobago.** CRC Press, 115–134, 2011.

LEME, J.A.C.A.; CASTELLAR, A.; REMEDIO, R.N.; BARBOSA, R.A.; MOURA, L.P.; DALIA, R.A.; GOMES, R.J.; CAETANO, F.H.; MELLO, M.A.R.; LUCIANO, E. **Efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para indução de diabetes em ratos Wistar.** Revista de Biociências, v.26, n.3, 451-456, 2010.

LERCO, M.M.; SPADELLA, C.T.; MACHADO, J.L.M.; SCHELLINI, S.A.; PADOVANI, C.R. **Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos.** Estudo clínico e laboratorial. Acta Cirurgica Brasileira, São Paulo, v.18, n.2, 132- 142, 2003.

LOPES, J.J; MARX, C; INGRASSIA, R; PICADA, J.N; PEREIRA, P; FERRAZ, A de B. **Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal plants of *Piper* genus.** Experimental and Toxicologic Pathology, 64:9-14, 2012.

LORENZATI, B.; ZUCCO, C.; MIGLIETTA, S.; LAMBERTI, F.; BRUNO, G. **Drogas hipoglicemiantes orais: base fisiopatológica do seu mecanismo de ação.** Farmacêutica, v.3, 3005-3020, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa SP. Instituto Plantarum. 2002.

LUCIO, E.M.R.A.; ROSALEN, P.L.; SHARAPIN, N.; SOUZA, A.R.M.B. **Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epiisopilosina, alcaloide secundário da *Pilocarpus microphyllus* Stapf.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.9, n. 10, 23-25, 2000.

LUZ, Patrícia Bastos. **Fração protéica isolada do látex de *Calotropis procera* (AIT.) R. Br reduz hipernocicepção inflamatória mecânica em camundongos: mecanismos e mediadores envolvidos.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

MACÊDO, C. G.; FONSECA, M. Y. N.; CALDEIRA, A. D.; CASTRO, S. P.; PACIENZA-LIMA, W.; BORSODI, M. P. G.; SARTORATTO, A.; SILVA, M. N. da; SALGADO, C. G.; ROSSI-BERGMAN, B. CASTRO, K. C. F. **Leishmanicidal activity of *Piper marginatum* Jacq. from Santarém-PA against *Leishmania amazonensis*.** Experimental Parasitology, 210, 107847, 2020.

MARLES, R.J.; FARNSWORTH, N.R. **Antidiabetic plants and their active constituents.** Review Phytomedicine, v.2, 137-89, 1995.

MCCULLOCOCH, D.K. **Initial management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus.** Ano: 2011. Disponível em: <<http://www.uptodateonline.com/>>. Acesso em: 21 set. 2018.

MCLELLAN, K.C.P; BARBALHO, S.M; CATTALINI, M.; LERARIO, A.C. **Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida.** Revista de Nutrição, v.20, n.5, 515-524, 2007.

MILECH, A., et al. **Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes 2015-2016: DIRETRIZES SBD | 2015-2016.** 2016 ed. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Nacional, 348, 2016.

MONTANARI, R.M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbanaceae.** Tese – Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2010.

MONTEIRO, D; GUIMARÃES, E.F. **Flora do Parque Nacional do Itatiaia-Brasil: *Manekia* e *Piper* (PIPERACEAE).** Rodriguésia, v.60, 999-1024, 2009.

NASCIMENTO, Carlos. **Medicina Alternativa de A a Z.** Uberlândia – Minas Gerais: Natureza; 2003.

NEGRI, G. **Diabetes mellitus**: plantas hipoglicemiantes com princípio natural ativo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v.41, n. 2, 121-142. São Paulo, 2005.

NEVES, S.M.P. et al. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.

OLIVEIRA, H.P. **Protocolos anestésicos comumente utilizados em animais de pequeno porte**. UFMG-CETEA. Minas Gerais, 2019.

OLIVEIRA, M.R. **Atividade tripanocida, rendimento e composição química do óleo essencial de *Piper marginatum***. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - UFAM. Itacoatiara, 2019.

OLOFSSON, E.M, MARKLUND, S.L; BEHNDIG, A. **Enhanced diabetes-induced cataract in copper-zinc superoxide dismutase-null mice**. Investigative Ophthalmology & Visual Science. v.50(6), 2913-8, 2009.

ORGANISATION 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.

PARMAR, V.S; JAIN, S.C; BISHT, K.S; JAIN, R; TANEJA, P; JHA, A; TYAGI, O.D; PRASAD, A.K; WENGEL, J; OLSEN, C.E; BOLL, P.M. **Phytochemistry of the genus *Piper***. Phytochemistry, 46:597-673, 1997.

PASSOS, V.M.A; BARRETO, S.M; DINIZ, L.M. **Diabetes tipo 2: prevalência e fatores associados em uma comunidade brasileira**. Projeto Bambuí de estudo de saúde e envelhecimento. Revista de Medicina. v.123, n. 2, 66-71. São Paulo, 2005.

PEREIRA, L.A; BARBOZA, G.E; BOVINI, M.G; DE ALMEIDA, M.Z; GUIMARÃES, E.F. **Caracterização e utilização de uma comunidade Quilombola da Amazônia Oriental (Brasil)**. Journal of the Botanical Research. Institute of Texas. v.5, 255-272, 2011.

PHUNG, O.J., et al. **Effect of noninsulin antidiabetic drugs added to metformin therapy on glycemic control, weight gain, and hypoglycemia in type 2 diabetes**. JAMA, [S.I.], v.303, n.14, 1410–1418, 2010.

PINHEIRO, Ana Caroline da Costa Pinto. **Protocolo de cuidado farmacêutico a pacientes com diabetes mellitus na atenção primária a saúde**. Juiz de Fora: 2016.

QUIJANO-ABRIL, M.A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D.R. **Areas of endemismo and distribution patterns for neotropical *Piper* species (Piperaceae)**. Journal of Biogeography, 33:1266-1278, 2006.

RANG, H.P., et al. **Farmacologia**. 5.ed. Tradução de Patricia Lydie Voeux, Antonio Jose Magalhães da Silva Moreira. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. **Uma revisão do status das propriedades medicinais dos óleos essenciais.** Culturas e Produtos Industriais. v.62, 250-264, 2014.

REIGADA, J.B.; TCACENCO, C.M.; ANDRADE, L.H.; KATO, M.J.; PORTO, A.L.M.; LAGO, J.H.G. **Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) antifungal activities and kinetic resolution of (RS) marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435).** Tetrahedron: Asymmetry, v.18, 1054-1058, 2007.

RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, C.A.M.; MELLO, M.A.R. **Exercício e prevenção do diabetes mellitus:** importância do modelo experimental utilizando ratos. Motriz. 13(1):72-7, 2007.

ROCHA, F.D., et al. **Diabetes mellitus e estresse oxidativo:** produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. Revista Brasileira de Farmácia, v.87, 49-54, 2006.

RUPPLET, B.M.; VILLAS-BOAS, G;K.; JUNIOR, O.N.T.; COSTA, R.N.C. Introdução à gestão da inovação em medicamentos da biodiversidade. Ano: 2018. Disponível em: https://mooc.campusvirtual.ffiocruz.br/rea/medicamentos-da-biodiversidade/medicamentos_da_biodiversidade.html. Acesso em: 22 Dez. 2020.

SAMPLE, K.S. **Pollination in Piperaceae.** Annals of the Missouri Botanical Garden, 61: 868-871, 2013.

SANTOS, M.M.; NUNES, M.G.S.; MARTINS, R.D. **Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais. Botucatu, v.14, n.2, 327-334, 2012.

SCHMIDT, M. I. et al. **Doenças Crônicas não transmissíveis no Brasil: mortalidade, morbidade e fatores de risco.** In: BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Saúde Brasil 2009: Uma análise da situação de saúde e da Agenda Nacional e Internacional de Prioridades em Saúde. Brasília, 2010.

SCODRO, R.B.; PIRES, C.T; CARRARA, V.S; LEMOS, C.O; CARDOZO-FILHO, L; SOUZA, V.A; CORREA, A.G; SIQUEIRA, V.L; LONARDONI, M.V; CARDOSO, R.F; CORTEZ, D.A. **Anti-tuberculosis neolignans from *Piper regnellii*.** Phytomedicine, 20:600-604, 2013.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. **Dados epidemiológicos de diabetes no município.** Ano base: 2019. Santarém: SEMSA, 2019.

SHANMUGA, M.; SIMON, S.; KRISHNAMOORTHY, V. e SUBRAMANIAN, B. **Efeitos anti-hiperglicêmicos e antilipidperoxidativos de frutos secos de *Piper longum* (Linn.) em ratos diabéticos induzidos por aloxana.** Revista de Ciências Biológicas, v.7, 161-168, 2007.

SHIRWAIKAR, A., et al. **Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annonas quamos* ain streptozotocin nicotina mide type 2 diabetic rats.** Journal of Ethnopharmacology, v.91, 171-5, 2004.

SILVA, D.M.H.; BASTOS, C.N. **Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthorapalmivorae* *Phytophthoracapsici*.** Fitopatologia Brasileira v.32, 143-145, 2007.

SILVA, M.B.; MENDEZ, M.H.M.; DERIVI, S.C.N. **Efeito hipoglicêmico de alimentos ricos em fibra solúvel: estudo com o jiló (*Solanum gilo* Raddi).** Alimentos e Nutrição, v.9, p.43-64, 1998.

SILVA, E.M.J.; MACHADO, S.R.V.O. **Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae).** Revista Brasileira de Botânica, v.22, 117-124, 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Dados epidemiológicos 2019.** Disponível em: https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/SBD-_Dados_Epidemiologicos_do_Diabetes_-_High_Fidelity.pdf. Acesso em: 03 Abr. 2020.

SOUSA, P.J.C.; BARROS, C.A.L.; ROCHA, J.C.S.; LIRA, D.S.; MONTEIRO, G.M.; MAIA, J.G.S. **Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L.** Revista Brasileira de Farmacognosia. 18(2): 217-221, 2008.

SOUTO, R.N.; HARADA, A.Y.; ANDRADE, E.H.; MAIA, J.G. **Insecticidal Activity of *Piper* Essential Oils from the Amazon Against the Fire Ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae).** Neotropical Entomology, 41:510-517, 2012.

SZKUDELSKI, T. **The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas.** Physiological Research. 50(6):536-46, 2001.

TRINDADE, A.P.; RAIMUNDO, J.M.; VELOZO, L.S.; KAPLAN, M.A.; SUDO, R.T.; ZAPATA-SUDO, G. **The lignaneu desmin extracted from *Piper truncatum* induced vascular relaxation via activation of endothelial histamine H1 receptors.** European Journal of Pharmacology, 606:150-154, 2009.

Um refrão para sua alma. Compositor e cantor: Leandro Borges. Criciúma: Soul Produtora, 2018. 1 DVD (1h 39m 47s).

VASCONCELOS, T.H.C.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M. F. F. M.; SANTOS, H.B.; AGUIAR, F.B.; MOREIRA, P.V.L. **Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae).** Revista Brasileira de Farmacognosia, Curitiba, v.4, 583-591, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.M. **Medicinal plants: safe cure?** Quím Nova. 28(3): 519-28, 2005.

VOLPATO, G.T., et al. **Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.4, n.2, 35-45, 2002.

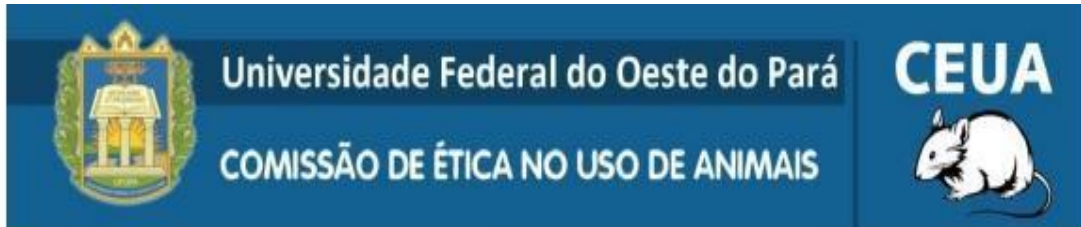
VIEIRA, S.C.H; PAULO, L.F.D; SVIDZINSKI, T.I.E; DIAS FILHO, B.P; NAKAMURA, C.V; SOUZA, A.D; YOUNG, M.C.M; CORTEZ, D.A.G. **Antifungal activity of Piper diospyrifolium Kunth (Piperaceae) essential oil.** Brazilian Journal of Microbiology, 42:1001-1006, 2011.

YUKES, JE, BALICK, MJ. **Plantas Mediciniais Dominicanas:** Um Guia para Profissionais de Saúde, 2a ed. O Jardim Botânico de Nova York, Nova York, 2011.

WHITING, D.R; GUARIGUATA, L; WEIL, C; SHAW, J. **IDF diabetes atlas:** global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. Diabetes Research and Clinical Practice. 94(3):311-21, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1- COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ SOB O NÚMERO 1120180048/2019



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 1120180048, intitulado Avaliação da atividade hipoglicêmica do óleo essencial de *Piper marginatum* Jacq. em camundongos, sob a responsabilidade de Kelly Christina Ferreira Castro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 1120180048, entitled "Avaliação da atividade hipoglicêmica do óleo essencial de *Piper marginatum* Jacq. em camundongos", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém-PA, 08/08/2019

Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana
Presidente

Verificar a autenticidade do certificado em <http://ufopa.edu.br/ceua/validar-certificado>