



Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição
Laboratório de Bioquímica Metabólica



**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE *Baccharis trimera*
(CARQUEJA) SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM MODELO DE DIABETES MELITO TIPO 1 INDUZIDO
POR ALOXANO EM RATAS**

NATÁLIA NOGUEIRA DO NASCIMENTO

Ouro Preto
Fevereiro/2013



Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição
Laboratório de Bioquímica Metabólica



**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE *Baccharis trimera*
(CARQUEJA) SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM MODELO DE DIABETES MELITO TIPO 1 INDUZIDO
POR ALOXANO EM RATAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Ouro Preto
Fevereiro/2013



Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição
Laboratório de Bioquímica Metabólica



**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE *Baccharis trimera* (CARQUEJA)
SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO
DE DIABETES MELITO TIPO 1 INDUZIDO POR ALOXANO EM RATAS**

Natália Nogueira do Nascimento

Orientadora

Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa

Co-orientador

Dr. Joamy Victor Rossoni Júnior

N244a

Nascimento, Natália Nogueira do.

Avaliação dos efeitos do extrato de *Baccharis trimera* (carqueja) sobre parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo em modelo de diabetes melito tipo 1 induzido por aloxano em ratas [manuscrito] / Natália Nogueira do Nascimento. - 2013.

xix, 80 f.: il.: color.; grafs.; tabs.;

Orientadora: Profª Drª Daniela Calderia Costa.

Coorientador: Dr. Joamyr Victor Rossoni Júnior

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição.

Área de concentração: Bioquímica

1. Diabetes - Teses. 2. Stress oxidativo - Teses. 3. Antioxidantes - Teses. 4. Rato - Teses. 5. Baccharis trimera – Teses. I. Costa, Daniela Calderia. II. Rossoni-Júnior, Joamyr Victor. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 577.1:616.379-008.64

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

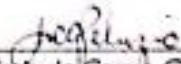
Aos 21 dias do mês de FEVEREIRO DE 2013, às 09h00min, no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a defesa da dissertação de mestrado da aluna Natália Nogueira do Nascimento. A banca examinadora definida anteriormente foi composta pelos professores doutores Renata Nascimento de Freitas (UFOP), Maria do Carmo Gouveia Peluzio (UFV), Daniela Caldeira Costa (UFOP) e Joamyr Victor Rossoni Junior (UFOP). Dando início ao exame a aluna apresentou sua dissertação de mestrado intitulada: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE BACCHARIS TRIMERA (CARQUEIA) SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE DIABETES MELITO TIPO I INDUZIDO POR ALOXANO EM RATAS". Após a apresentação a candidata foi argüida pela banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado ao projeto de dissertação do candidato. Após julgamento os membros da banca decidiram por:

APROVAR

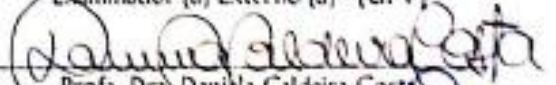
REPROVAR




Prof. Dra. Renata Nascimento de Freitas
Examinador (a) Interno (a) - (UFOP)



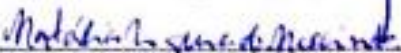
Prof. Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio
Examinador (a) Externo (a) - (UFV)



Prof. Dra. Daniela Caldeira Costa
Orientadora (a) - (UFOP)



Prof. Dr. Joamyr Victor Rossoni Junior
Coorientador (a) - (UFOP)



Natália Nogueira do Nascimento
Mestrando (a) - (UFOP)

*“Não diga que a vitória está perdida.
Tenha fé em Deus, tenha fé na vida.”*

Raul Seixas

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica** e no **Laboratório de Nutrição Experimental** da Universidade Federal de Ouro Preto, com o auxílio financeiro da *CAPES*, *CNPq* e *UFOP*.

*À minha família,
com todo o meu amor!*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Meu agradecimento mais que especial à Prof^a. Daniela Caldeira Costa, por ter acreditado em mim desde o início, quando eu cheguei à Ouro Preto sem nenhuma referência. Obrigada por cada palavra de apoio, pelo incentivo, pelo aprendizado e pela confiança depositada em mim. Você é meu exemplo e minha inspiração!

Muito obrigada ao Dr. Joamyr Victor Rossoni Júnior, meu co-orientador. Você foi fundamental para o bom desenvolvimento deste projeto. Obrigada pela ajuda na bancada e por me ensinar com tanto critério todas as técnicas necessárias. Muito obrigada pela paciência e amizade.

Foi um prazer e uma honra trabalhar com vocês!

AGRADECIMENTOS

Obrigada, primeiramente a Deus e à minha Nossa Senhora da Penha, pelo milagre da vida, e por todas as oportunidades que colocam em meus caminhos.

Obrigada aos professores Marcelo Eustáquio Silva e Maria Lucia Pedrosa, por me abrirem as portas do laboratório. O apoio de vocês foi fundamental para a minha conquista.

Ao professor Jason G. Taylor, do laboratório de produtos naturais, pela disponibilidade e prontidão.

À Glaucy Rodrigues de Araujo, por ter sido mais que uma colega de trabalho, por ter sido uma amiga, uma irmã. Obrigada pelo seu companheirismo, por ter me ensinado as técnicas básicas e mais importantes. Obrigada porque estive ao meu lado sempre que eu precisei, me apoiando e me incentivando. A realização deste trabalho não teria sido possível sem a sua ajuda. Vou sempre ser grata a você!

Aos colegas dos laboratórios de Nutrição Experimental (LABNEX) e de Bioquímica Metabólica (LBM) Adriana, Ana Carla, Ana Carolina, Ana Flávia, Bianca, Danielle, Emerson, Isabel, Janaína, Jéssica, Joyce, Juliana, Kely, Maísa, Nara, Pedro, Poliane, Rayan, Rogério, Sandra, Waleska, e aos técnicos, Jair, Clodoaldo e Renata, obrigada pela ajuda, companhia e disponibilidade.

Obrigada especialmente aos meus amigos-irmãos Aline, Bruno, Carolina, Glaucy, Joamyr, Lorena, Melina e Simone. Vocês foram o melhor presente que Ouro Preto me deu, e fizeram, sem dúvida, os meus dias muito mais felizes! Obrigada não só pelos ensinamentos compartilhados, mas por todas as risadas, pelas piadas sem graça, pelas compras coletivas, pelas viagens planejadas não cumpridas, pelos almoços no RU, pelas saidinhas e festinhas, pelos passeios no centro com direito a sorvetes e florais. Que a nossa amizade vá muito mais além. Vou guardar todos vocês e cada momento com muito carinho. Amo vocês!

Obrigada a toda a turma do mestrado em Saúde e Nutrição, em especial às minhas primeiras amigas Isabela, Isabel, Kely, Lorena, Lunara e Roberta. Obrigada pelo carinho e amizade! Sem a companhia de vocês teria sido muito mais difícil!

Aos amigos Thalisson e Zirlene, sem o apoio de vocês eu sequer teria vindo fazer a prova para ingresso no mestrado. Muito, muito obrigada!

À Vanessa, obrigada pelos bons momentos. Foi bom ter você pra poder contar!

Às minhas amigas do coração, Camila, Dani, Dee Dee, Lílian, Mariana, Raio, Taqui, e Thais. Obrigada por nunca deixarem a distância nos afastar. Mesmo longe, sei que sempre tenho vocês perto de mim.

Ao Leandro, meu amigo, meu amor. Obrigada por sonhar junto comigo, por ser a minha razão quando eu sou só emoção. Foi por você que eu cheguei até aqui. Obrigada por não me deixar desistir. Te amo!

À minha família, me faltam as palavras... Vocês são a minha vida! Obrigada aos meus pais Cláudia e Quintino pelo apoio e incentivo, e aos meus irmãos Thaís e André pela amizade e cumplicidade! Vocês são o meu orgulho, a minha base, meu exemplo de vida. Obrigada por apoiarem os meus planos, as minhas mudanças, por aceitarem a ausência. Obrigada por tanto amor!

AGRADECIMENTOS AOS COLABORADORES

Laboratório de Biologia Molecular e Celular;

Laboratório de Microbiologia;

Laboratório de Imunoparasitologia;

Laboratório de Produtos Naturais;

Laboratório de Bromatologia.

Obrigada pelo suporte necessário à realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Diabetes e saúde pública.....	3
2.2. Espécies reativas, estresse oxidativo e diabetes.....	5
2.3. Defesas antioxidantes.....	8
2.4. O tratamento do diabetes com antioxidantes.....	12
2.5. A <i>Baccharis trimera</i> como possível agente antioxidante	13
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. METODOLOGIA.....	17
4.1. Preparo do extrato hidroetanólico de <i>Baccharis trimera</i>	17
4.1.1. Material botânico	17
4.1.2. Obtenção do extrato hidroetanólico.....	17
4.2. Avaliação da atividade tóxica do extrato hidroetanólico de <i>Baccharis trimera</i> em ensaio com <i>Artemia Salina</i>	18
4.3. Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> contra o radical DPPH•	19
4.4. Animais	21
4.5. Indução do diabetes	22
4.6. Tratamento com o extrato de <i>Baccharis trimera</i>	23
4.7. Teste de tolerância oral a glicose (TTOG)	23
4.8. Eutanásia e coleta do material biológico.....	23
4.9. Análise dos parâmetros bioquímicos do soro e plasma.....	24
4.10. Determinação de insulina sérica	24
4.11. Análise dos marcadores do estresse oxidativo em tecido hepático	25
4.11.1. Proteína Carbonilada	25
4.11.2. Níveis de TBARS	26
4.12. Análise das defesas antioxidantes.....	27
4.12.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	27

4.12.2. Atividade da Catalase	27
4.12.3. Glutaciona total, oxidada e reduzida	28
4.12.4. Atividade da Glutaciona peroxidase (GPx)	29
4.12.5. Atividade da Glutaciona redutase (GR).....	30
4.13. Proteínas totais	31
4.14. Ensaio de RT-PCR Quantitativa em Tempo Real.....	32
4.14.1. Extração do RNA Total.....	32
4.14.2. Síntese do cDNA.....	33
4.14.3. Desenho dos primers	33
4.14.4. RT-PCR Quantitativa em Tempo Real	34
4.15. Análise estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1. Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> sp.....	36
5.2. Análise da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	37
5.3. Avaliação do peso corporal, glicemia e teste de tolerância oral a glicose	38
5.4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos	39
5.5. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo	41
5.6. Avaliação das defesas antioxidantes	42
5.6.1. Avaliação da expressão gênica e atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase	42
5.6.2. Glutacionas	44
5.6.2.1. Glutaciona total, oxidada e reduzida	44
5.6.2.2. Expressão do RNA-m e atividade da enzima Glutaciona peroxidase e atividade da enzima Glutaciona redutase	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO.....	58
8. REFERÊNCIAS	59
9. ANEXO.....	67
ANEXO 1 – PROTOCOLOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS.....	67

LISTA DE SIGLAS

ALT – Alanina Aminotransferase
AST – Aspartato Aminotransferase
ADA – American Diabetes association
AGES – produtos finais de glicação avançada
BHA – butil-hidroxi-anisol
BHT – butil-hidroxi-tolueno
C – grupo controle sem tratamento
C1200 – grupo controle tratado com extrato de carqueja a 1200 mg/kg
C600 – grupo controle tratado com extrato de carqueja a 600 mg/kg
CAT – catalase
cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar
CEUA – comitê de ética em pesquisa no uso de animais
C_T – do inglês, threshold cycle
D – grupo diabéticos tipo 1 sem tratamento
D1200 – diabéticos tipo 1 tratados extrato de carqueja a 1200 mg/kg
D600 – diabéticos tipo 1 tratados extrato de carqueja a 600 mg/kg
DAG – diacilglicerol
DM – Diabetes *mellitus*
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucléico
DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DTNB – 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid
ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
GPx – glutationa peroxidase
GR – Glutationa Redutase
GSH – glutationa reduzida

GSSG – glutathiona oxidada
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
IDF – International Diabetes Federation
RNAm – RNA mensageiro
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NOS – óxido nítrico sintase
OH• – radical hidroxil
pH – potencial hidrogeniônico;
PKC – proteína kinase C
PMSF – phenylmethanesulfonyl fluoride
qRT-PCR – reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa
SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes
SDS – dodecil sulfato de sódio
SOD – superóxido dismutase
STZ – Streptozotocina
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA – Ácido tricloroacético
TEA – tri-etanol amina
TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TTOG – Teste de Tolerância Oral a Glicose

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número e percentual de larvas de <i>Artemia salina</i> mortas, expostas a diferentes concentrações do extrato de <i>Baccharis trimera</i>	36
Tabela 2: Número e percentual de larvas de <i>Artemia salina</i> mortas, expostas a diferentes concentrações do extrato de Lapachol.	36
Tabela 3: Avaliação do peso, glicemia inicial e glicemia final em ratas diabéticas e não diabéticas tratadas com extrato de carqueja durante sete dias.....	38
Tabela 4: Análises bioquímicas em soro de animais diabéticos ou não diabéticos tratados com extrato de carqueja durante sete dias.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécies reativas de oxigênio radicais e não radicais	6
Figura 2: Anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC induzida pela hiperglicemia	8
Figura 3: Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes.	10
Figura 4: Mecanismos enzimáticos de defesas antioxidantes.....	11
Figura 5: Foto do arbusto (A) e flores (B) de <i>Baccharis trimera</i>	14
Figura 6: Representação esquemática da diluição do extrato para a realização do ensaio com <i>Artemia salina</i>	19
Figura 7: Delineamento experimental e número de ratas utilizadas por grupo.....	22
Figura 8: Percentual de atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de <i>Baccharis trimera</i> e do antioxidante de referência BHA em diferentes concentrações avaliadas em 60 minutos.....	37
Figura 9: Avaliação da tolerância oral à glicose em animais diabéticos e não diabéticos tratados com extrato de carqueja durante sete dias.....	39
Figura 10: Avaliação dos níveis de TBARS (A) e Proteína Carbonilada (B) em fígado de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ao tratamento com extrato de <i>B. trimera</i> por 7 dias.....	41
Figura 11: Avaliação e expressão das enzimas SOD e catalase em fígado de ratas diabéticas e não diabéticas submetidas a tratamento com extrato de <i>Baccharis trimera</i> por 7 dias. (A) expressão do RNAm da Mn-SOD; (B) expressão do RNAm da Zn-SOD; (C) atividade total da SOD; (D) e (E) expressão e atividade da enzima catalase respectivamente.....	43

- Figura 12:** Avaliação dos níveis de Glutathione em fígado de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ao tratamento com extrato de *B. trimera* por 7 dias. (A) Glutathione total, (B) Glutathione reduzida e (C) Glutathione oxidada.....44
- Figura 13:** Avaliação da expressão (A) e atividade (B) do RNAm da enzima glutathione peroxidase, e atividade da enzima glutathione redutase (C) em fígado de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao tratamento com extrato de *B. trimera* por 7 dias.....46
- Figura 14:** Mapeamento das defesas antioxidantes no modelo experimental utilizado. 57

RESUMO

O diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença caracterizada pela destruição das células beta pancreáticas com consequente deficiência na secreção da insulina, resultando em hiperglicemia. As complicações do diabetes são onerosas para a saúde pública e de prejuízos irreparáveis para o portador da doença, pois abrange aspectos clínicos e sociais. Uma das causas das complicações do diabetes é o aumento do estresse oxidativo, situação na qual há um desequilíbrio entre as espécies reativas e as defesas antioxidantes. Em busca de terapias alternativas, diversas plantas têm sido popularmente utilizadas no tratamento do diabetes. A planta medicinal *Baccharis trimera*, popularmente conhecida como carqueja, merece destaque dentre essas plantas, pois apresenta promissor potencial antioxidante e hipoglicemiante. Este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do extrato hidroetanólico da *Baccharis trimera* sobre os parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo em modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 induzido por aloxano em ratas. Foi realizado experimento com 48 ratas da linhagem Fischer, divididas em 6 grupos, a saber: C (controle), C600 (controle + 600 mg/kg de extrato), C1200 (controle + 1200 mg/kg de extrato), D (diabéticos), D600 (diabéticos + 600 mg/kg); D1200 (diabéticos + 1200 mg/kg). As ratas tiveram o diabetes induzido por Aloxano, e após a confirmação do diabetes, todos os animais foram tratados por sete dias. Ao término do tratamento, as ratas foram eutanasiadas e tiveram o sangue coletado para realização das dosagens dos marcadores bioquímicos de perfil lipídico, função hepática e renal, e o fígado coletado para dosagem dos marcadores de estresse oxidativo (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e proteína carbonilada), dosagem das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e redutase), e análise da expressão do RNAm das enzimas antioxidantes. Os resultados obtidos mostraram que sete dias de diabetes são suficientes para alterar os marcadores bioquímicos, mas não são suficientes para alterar os marcadores de estresse oxidativo no fígado. As enzimas antioxidantes mostraram que os animais diabéticos apresentam quadro de estresse oxidativo visto que as ratas diabéticas apresentaram uma maior atividade da enzima superóxido dismutase e diminuição da atividade das enzimas catalase e glutatona peroxidase. A carqueja não mostrou efeito

em diminuir a glicemia dos animais diabéticos, tampouco em modular o estresse oxidativo destes animais.

Palavras chave: Diabetes, Estresse oxidativo, *Baccharis trimera*, Antioxidantes, Ratos.

ABSTRACT

The type 1 diabetes is a disease characterized by the destruction of pancreatic beta cells with consequent deficiency in insulin secretion, resulting in hyperglycemia. The complications of diabetes are costly to public health and causes irreparable damage to the carrier of the disease as it covers clinical and social aspects. One of the causes of diabetes complications is increased oxidative stress, a condition in which there is an imbalance between the reactive species and the antioxidants defenses. Aiming to find alternative therapies, many plants are popularly used in the treatment of diabetes. The medicinal plant *Baccharis trimera*, popularly known in Brazil as “carqueja”, noteworthy among these plants, it presents promising potential antioxidant and hypoglycaemic. This study aimed to evaluate the effects of *Baccharis trimera*'s extract on metabolic and oxidative parameters in an experimental model of type 1 diabetes aloxan induced female rats. Experiment was conducted with 48 female Fischer rats, divided into 6 groups, namely: C (control), C600 (control + extract 600 mg/kg), C1200 (control + extract 1200 mg/kg), D (diabetic), D600 (diabetic + 600 mg/kg); D1200 (diabetic + 1200 mg/kg). The rats had diabetes induced by alloxan, and after confirmation of diabetes, all animals were treated for seven days. At the end of treatment, the rats were euthanized and had blood collected to perform the measurements of biochemical markers of lipid, liver and kidney function, and liver collected measure markers of oxidative stress (thiobarbituric acid-reactive substances and carbonyl protein), measurement of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and reductase), and analysis of RNAm expression of antioxidant enzymes. The results showed that seven days of diabetes are sufficient to alter the biochemical markers, but not enough to alter the oxidative stress markers in liver. Antioxidant enzymes showed that diabetic animals present framework of oxidative stress by the high activity of superoxide dismutase enzyme in diabetic rats and low activity of the enzymes catalase and glutathione peroxidase. The “carqueja” showed no effect in lowering blood glucose levels of diabetic animals; either modulates oxidative stress in these animals.

Key words: Diabetes, Oxidative stress, *Baccharis trimera*, Antioxidantes, Ratos.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* é um problema mundial de saúde pública, tendo alcançado incidência e prevalência em proporções epidêmicas (WILD *et al.*, 2004). As estimativas da doença para 2030 são alarmantes. Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2011), o número de diabéticos ao redor do mundo deve chegar a 552 milhões. O tratamento do DM gera custos onerosos para o sistema público de saúde, mas os prejuízos físicos e sociais causados ao indivíduo diabético e sua família não devem ser desconsiderados. As complicações geradas pelo diabetes muitas vezes impossibilitam o trabalho e atividades corriqueiras ao portador desta doença (SBD, 2009).

Uma das causas para o surgimento das doenças secundárias ao diabetes é o estresse oxidativo, condição na qual as defesas antioxidantes não são suficientes para inativar as espécies reativas geradas pelo organismo (RAINS e JAIN, 2011; DALLE-DONE *et al.*, 2006).

A hiperglicemia promove o aumento na produção de espécies reativas por diferentes mecanismos, como por meio do extravasamento de elétrons da cadeia transportadora mitocondrial (VALKO *et al.*, 2007) e da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (BROWNLEE, 2001). A hiperglicemia pode ainda causar auto-oxidação da glicose e promover diminuição das defesas antioxidantes pela via dos polióis (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Com o objetivo de neutralizar as espécies reativas, as células e tecidos contam com mecanismos de defesas antioxidantes, que previnem a produção de espécies reativas e mantêm o balanço redox da célula ou tecido (RAINS e JAIN, 2011). Os antioxidantes de forma geral podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (VINCENT, 2004; SIES, 1993).

Dentre as principais enzimas antioxidantes, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A enzima SOD é capaz de converter o ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 formado pela SOD é rapidamente difundido através da membrana mitocondrial e transformado em água por enzimas antioxidantes como CAT e pela GPx (NAUDI *et al.*, 2011).

Além dos antioxidantes enzimáticos, antioxidantes não enzimáticos têm sido utilizados em busca de complementar as defesas antioxidantes do organismo, como os polifenóis encontrados em frutas e fitoterápicos (PERCIVAL, 1998).

Dentre os fitoterápicos utilizados no Brasil, podemos destacar as plantas do gênero *Baccharis* que são ricas em flavonóides, triterpenos e diterpenos (VERDI *et al.*, 2005). Essas plantas promissoras como antioxidantes, podendo atuar na prevenção de patologias induzidas pelo estresse oxidativo (VIEIRA *et al.*, 2011). Uma espécie muito utilizada no Brasil é a *Baccharis trimera*, conhecida como carqueja. Essas plantas têm sido utilizadas popularmente pelo seu efeito antidiabético (TROJAN-RODRIGUES *et al.*, 2012).

O efeito antioxidante da carqueja já foi comprovado *in vitro* (MORAIS *et al.*, 2009, DIAS *et al.*, 2009, OLIVEIRA *et al.*, 2012) e *in vivo* (DIAS *et al.* 2009; PÁDUA *et al.* 2010). Além disso, a carqueja já teve comprovado o seu potencial antiúlcera (OLIVEIRA *et al.*, 2012), antiinflamatório (PAUL *et al.*, 2009; FIGUEIREDO e PEREIRA, 2009) e antiartrítico (COELHO *et al.*, 2004). OLIVEIRA *et al.* (2005) ao tratar camundongos diabéticos com elevadas doses e diferentes extratos de *Baccharis trimera* observou potencial hipoglicemiante desta espécie de carqueja. Entretanto, ainda não há estudos avaliando o efeito do extrato de carqueja na modulação do estresse oxidativo ocasionado pelo diabetes. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* (carqueja) sobre os parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo em modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 induzido por aloxano em ratas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Diabetes e saúde pública

Diabetes *mellitus* (DM) é um grupo de desordens metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ambos (SBD, 2009).

Segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2010), a classificação atual de DM baseia-se na etiologia, e não no tipo de tratamento, sendo dois os principais tipos de diabetes:

- **Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM tipo 1):** Presente em 5 a 10% dos casos, é resultante da destruição das células beta pancreáticas com consequente deficiência de insulina. O início dos sinais e sintomas é repentino, e muito frequentemente ocorrem ainda na infância ou adolescência. Muitos pacientes apresentam sintomas severos como hiperglicemia intensa e cetoacidose. Na maioria dos casos, a destruição das células beta é mediada por autoimunidade, porém, há ainda as formas idiopáticas de DM tipo 1, onde não são observadas evidências de processo autoimune. A destruição autoimune das células beta pancreáticas está relacionada à predisposição genética e fatores ambientais ainda não definidos (ADA, 2010; SBD, 2009).
- **Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM tipo 2):** Presente em 90 a 95% dos casos, engloba indivíduos que apresentam resistência a insulina e, habitualmente, deficiência de insulina. Normalmente, os pacientes com DM tipo 2 não dependem de insulina exógena para sobreviver, mas podem precisar de tratamento com insulina para o controle metabólico adequado. A etiologia específica para o DM tipo 2 ainda não está bem esclarecida, mas sabe-se que não ocorre processo autoimune. Muitos pacientes com esse tipo de DM são obesos ou possuem excesso de gordura distribuída na região abdominal, fatores que podem causar resistência a insulina (ADA, 2010; SBD, 2009).

Todas as formas de DM são caracterizadas por hiperglicemia crônica havendo, frequentemente, o desenvolvimento de patologias microvasculares específicas do diabetes. Como consequência dessas complicações microvasculares, o diabetes pode ocasionar cegueira, doença renal crônica e diversas neuropatias. Dentre as complicações macrovasculares, o diabetes está associado à aceleração do processo aterosclerótico, afetando importantes artérias. Em função disso, pacientes com diabetes têm maiores riscos de infarto do miocárdio, derrame e amputação de membros (BROWNLEE, 2001).

O diabetes é um problema de importância crescente em saúde pública, pois sua incidência e prevalência estão aumentando e alcançando proporções epidêmicas. Este aumento se deve ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização e à crescente prevalência da obesidade e sedentarismo (WILD *et al.*, 2004).

Em 1985 estimava-se que 30 milhões de adultos estivessem com diabetes no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em 1995, atingindo 173 milhões em 2002 (WILD *et al.*, 2004). Segundo o Atlas de Diabetes da Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2011), em 2011 havia 366 milhões de indivíduos diabéticos no mundo. Neste mesmo ano, o diabetes causou 4,6 milhões de mortes, tendo causado mais mortes do que doenças como AIDS, malária e tuberculose juntas. Estima-se que em 2030 o número de diabéticos ao redor do mundo alcance uma marca de 552 milhões de casos. Esses números significam aproximadamente três novos casos de diabetes a cada 10 segundos, ou 10 milhões de novos casos por ano. Além disso, 78 mil crianças desenvolvem diabetes tipo 1 todos os anos, e o número de pessoas com DM tipo 2 tem crescido em todos os países (IDF, 2011).

O Brasil é o quinto país com maior número de diabéticos no mundo. Em 2011 eram 12,4 milhões. Estima-se que em 2030 o Brasil atinja a quarta posição com uma marca de 19,6 milhões de diabéticos. Em 2011, o gasto mundial na saúde para o diabetes foi em média de 465 bilhões de dólares, representando 11% do total do gasto com a saúde de adultos. O Brasil gastou em média 1038 dólares por indivíduo diabético, levando a um gasto anual de mais de dez milhões de dólares para cuidados

de saúde destes indivíduos, sem considerar os custos indiretos como perda de produtividade e afastamento do trabalho (IDF, 2011).

Os custos diretos com o tratamento do DM são onerosos para o sistema público de saúde. Entretanto, os prejuízos físicos e sociais causados ao indivíduo diabético e sua família são imensuráveis. Muitos indivíduos são impossibilitados de trabalhar devido às complicações relacionadas à doença, ou permanecem no trabalho com diminuição do desempenho profissional (SBD, 2009).

2.2. Espécies reativas, estresse oxidativo e diabetes

Radical livre é qualquer espécie que contenha um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita externa. A presença de elétrons desemparelhados, na maioria das vezes, faz com que essas espécies sejam muito instáveis e altamente reativas, podendo atacar alvos celulares como proteínas, fosfolípidos de membrana e ácidos nucleicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; SLATER, 1984). Há uma ampla variedade de radicais livres existentes nos seres vivos, porém, muitas moléculas são não-radicais. Desta forma, tem sido usada a denominação espécies reativas de oxigênio (EROs) como um termo coletivo que inclui não apenas radicais de oxigênio mas também algumas espécies não radicais derivadas do oxigênio, como peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e ozônio (**figura 1**) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo é considerado um importante fator de risco para o desenvolvimento e progressão do diabetes (RAINS e JAIN, 2011). Entende-se por estresse oxidativo a condição na qual as defesas celulares antioxidantes não são suficientes para inativar completamente as espécies reativas. Este desequilíbrio é gerado devido a produção excessiva de EROs, pela perda de defesas antioxidantes, ou ambos, e pode causar danos à lipídios, proteínas e ao DNA (DALLE-DONE *et al.*, 2006). Entretanto, os mecanismos do estresse oxidativo não se limitam apenas aos danos macromoleculares causados por radicais livres, havendo também efeitos sobre a sinalização redox. Desta forma, o estresse oxidativo pode ser contemporaneamente

definido como uma disfunção da sinalização redox e dos mecanismos de controle (JONES, 2006).

Espécies reativas são fundamentais para sinalização de moléculas, reações de biossíntese, defesas químicas e reações de desintoxicação (JONES, 2006). Quando produzidas em condições fisiológicas desempenham importantes papéis em várias funções regulatórias e em processos celulares, como na defesa contra agentes infecciosos. Entretanto, há evidências de que, quando produzidas em excesso, contribuem para a progressão de doenças, como o DM, sugerindo um delicado balanço entre os efeitos benéficos e deletérios das espécies reativas (TIGANIS, 2011).

RADICAIS	NÃO RADICAIS
Superóxido, $O_2^{\bullet -}$	Peróxido de hidrogênio, H_2O_2
Radical hidroxil, $HO\bullet$	Peroxinitrito, $ONOO\bullet$ *
Radical peroxil, $ROO\bullet$	Ácido peroxinitroso, $ONOOH^*$
Radical alcoxil, $RO\bullet$	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Carbonato, $CO_3^{\bullet -}$	Ozônio, O_3
Óxido nítrico, $NO\bullet$	Oxigênio singleto, 1O_2

*Também podem ser chamadas de espécies reativas de nitrogênio. Fonte: HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007

Figura 1: Espécies reativas de oxigênio radicais e não radicais

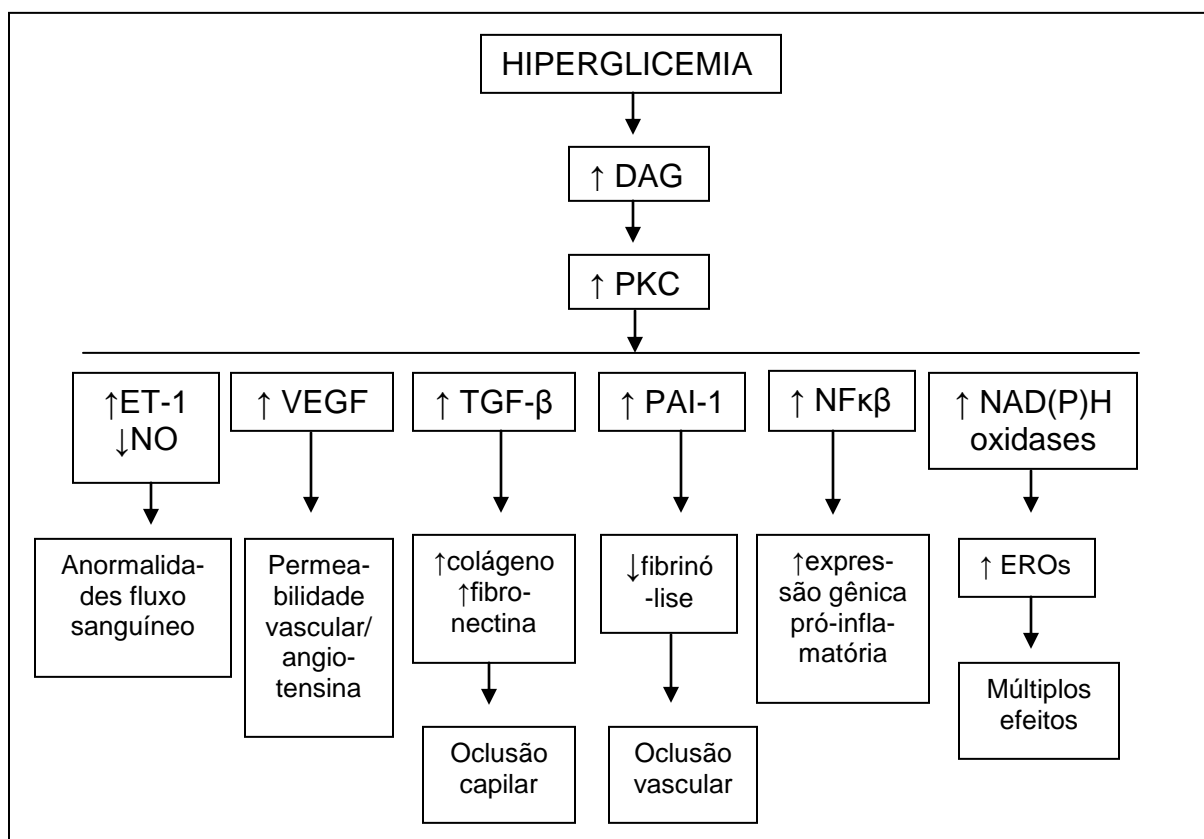
A hiperglicemia, marcador através do qual se diagnostica tanto DM tipo 1 quanto DM tipo 2, promove o aumento na produção de EROs por diversas rotas (NISHIKAWA *et al.*, 2000, BAYNES, 1991). A elevada concentração de glicose na corrente sanguínea pode levar diretamente a formação de EROs, pois acentua o extravasamento de elétrons da cadeia transportadora mitocondrial. Os elétrons que escapam da cadeia podem levar a geração de ânion superóxido (VALKO *et al.*, 2007).

Além disso, a glicose pode reagir de forma não enzimática com grupamentos amino livres de proteínas e iniciar a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que danificam as células e podem se ligar a receptores, levando a produção de EROs. Os AGEs também provocam disfunções nas sinalizações celulares,

desencadeando mecanismos que se relacionam com a patogenia das complicações do diabetes (BROWNLEE, 2001).

Outra consequência da hiperglicemia seria a auto-oxidação da glicose, através da enolização, gerando um radical enediol. Este radical enediol transfere seu elétron não pareado a uma molécula de O₂, gerando um ânion superóxido e uma dicarbonila. A dicarbonila liga duas cadeias protéicas formando uma ligação cruzada entre elas e inativando-as (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A hiperglicemia promove ainda a diminuição das defesas antioxidantes devido ao aumento da atividade da aldose redutase pela via dos polióis. A aldose redutase determina maior conversão de glicose a sorbitol, reduzindo os níveis de NADPH e glutatona. O sorbitol é convertido à frutose aumentando a síntese “de novo” de diacilglicerol (DAG), principal ativador fisiológico da proteína kinase C (PKC). A ativação da PKC está relacionada à patogênese de diversas complicações do diabetes (**Figura 2**) (BROWNLEE, 2001).



ET-1 = endotelina 1; NO = óxido nítrico; VEGF = fator de crescimento celular derivado do endotélio; TGF- β = fator transformador do crescimento beta; PAI-1 = inibidor do ativador plasminogênio 1; NF κ β = fator nuclear κ - β ; NAD(P)H = forma reduzida de NADP +; EROs = espécies reativas de oxigênio.

Figura 2: Anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC induzida pela hiper-glicemia. (Adaptado de Brownlee, 2001)

2.3. Defesas antioxidantes

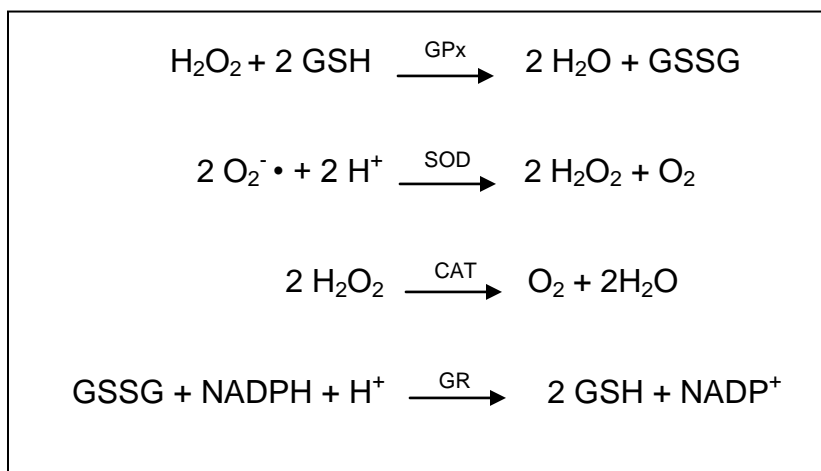
Células e tecidos contêm mecanismos de defesas antioxidantes que previnem a produção de espécies reativas e mantêm o balanço redox da célula ou tecido (RAINS e JAIN, 2011). Antioxidantes são definidos como componentes que podem doar pelo menos um átomo de hidrogênio a um radical livre, agindo de forma preventiva contra a formação de espécies reativas, ou interceptando as reações através da inativação das espécies reativas que estejam em atividade. Os antioxidantes de forma geral podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (VINCENT, 2004; SIES, 1993).

De acordo com o mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em duas categorias: sistema primário e secundário. O sistema primário são os inibidores preventivos, ou seja, retardam a fase de iniciação impedindo a geração de espécies reativas ou sequestram essas espécies, impedindo sua interação com os alvos celulares. Os inibidores preventivos podem induzir a decomposição de hidroperóxidos para produtos inativos, como por exemplo os tióis, sulfetos, catalase e as glutathionas peroxidase e S-transferase. O β -caroteno e a vitamina E também são considerados preventivos. O sistema secundário consiste nos bloqueadores da propagação da cadeia radicalar (*chain breaking*) que, efetivamente, removem radicais intermediários, como o radical alcóxila ou peróxila. Esses antioxidantes interrompem a sequência de auto-oxidação em cadeia, reagindo com os radicais livres para produzirem produtos estáveis. Uma terceira classe de antioxidantes pode ainda ser considerada, que seriam os sistemas de reparo do DNA, as proteases e as fosfolipases que removem as lesões oxidativas do DNA, proteínas e lipídeos respectivamente (JORDÃO *et al.*, 1998; SIES, 1993).

Dentre as principais enzimas antioxidantes, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (**Figura 3**). A enzima SOD é capaz de converter o ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nos sistemas eucariontes existem três formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco (Cu/Zn-SOD) está presente principalmente no citoplasma e nos fluidos extracelulares, a SOD-mangânês (Mn-SOD) está localizada principalmente nas mitocôndrias, enquanto que a SOD extracelular é exclusiva dos fluidos extracelulares. Esta enzima tem papel fundamental na defesa do organismo contra o ataque de EROs, pois atua através da dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (MARKLUND *et al.*, 1982).

O H_2O_2 formado pela SOD é rapidamente difundido através da membrana mitocondrial e transformado em água por enzimas antioxidantes como CAT e pela GPx (NAUDI *et al.*, 2011) (**Figura 4**). A catalase é uma hemoproteína que se localiza nos peroxissomos e catalisa a detoxificação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (AEBI, 1984). A GPx é uma enzima dependente de selênio que ao catalisar o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos converte a glutathiona reduzida para o seu estado

oxidado. Por isso outra enzima fundamental é a glutathiona redutase (GR), que regenera a glutathiona usada como doadora de hidrogênio pela GPx durante a eliminação do H_2O_2 (JOHANSEN *et al.*, 2005).



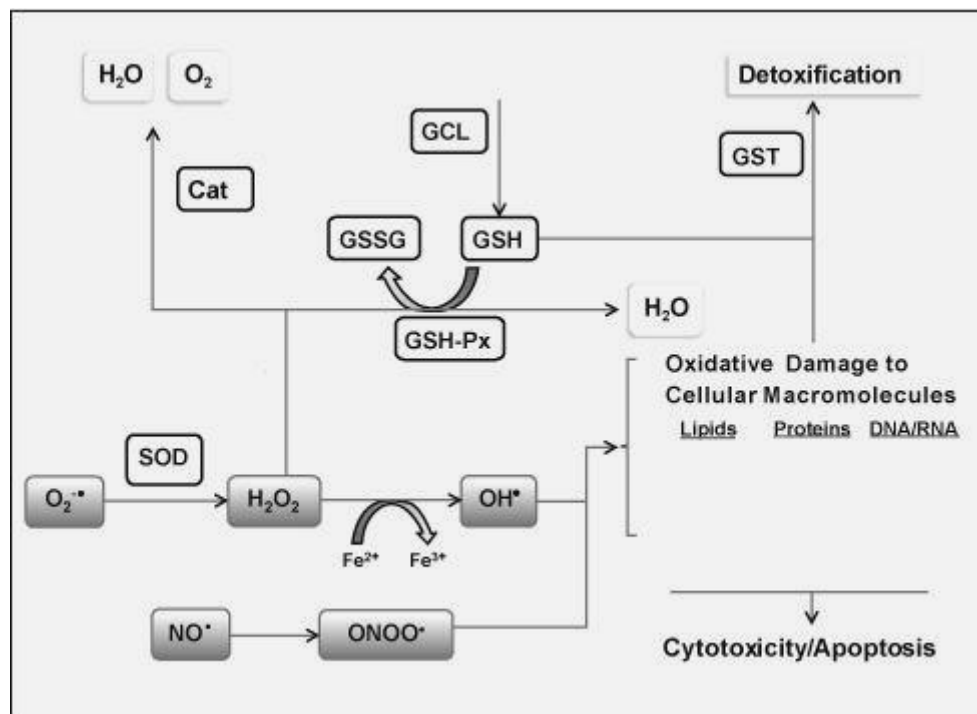
(GPx – glutathiona peroxidase; SOD – superóxido dismutase; CAT – catalase; GR – glutathiona redutase; GSH e GSSG – formas reduzida e oxidada da glutathiona, NADPH e NADP+ - formas reduzida e oxidada da nicotinamida adenina-dinucleotídeo fosfato)

Figura 3: Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes.

As enzimas glutathiona peroxidases, constituem uma importante família de selenoproteínas que catalizam a inativação do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos de lipídios, através da formação de uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de glutathiona reduzida, formando a glutathiona oxidada (HUBER *et al.*, 2008). As isoenzimas GPx são tecido-específicas, codificadas por diferentes genes e apresentam especificidade para substratos distintos e incluem a GPx-1 ou clássica, GPx-2 específica do trato gastrointestinal, GPx-3 plasmática e GPx-4 também chamada de fosfolípido hidroperóxido glutathiona peroxidase (HADDAD e HARB 2005). A GPx clássica é uma das selenoproteínas mais abundantes e têm sido demonstrado que o estresse oxidativo está relacionado a redução em sua expressão (CHENG *et al.* 1999).

Considerando a importância da enzima glutathiona peroxidase, vale resaltar que a glutathiona (GSH, L-γ-glutamil-L-cistenilglicina) é um tripeptídeo contendo cisteína, e é o tiol não proteico mais abundante nas células dos mamíferos. O núcleo de resíduo

cistenilglicina da GSH está envolvido na sua função como antioxidante, atuando como um redutor intracelular, capaz de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical GS• que produz por dimerização a glutatona oxidada (GSSG). A glutatona reduzida (GSH) atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo, podendo ser destacadas três das suas principais funções: *i)* é usada como substrato pela glutatona peroxidase na eliminação de hidroperóxidos; *ii)* A GSH pode otimizar a capacidade antioxidante da vitamina E, mantendo-a na sua forma reduzida e funcional; *iii)* a GSH através da glutatona S-transferase é capaz de detoxificar aldeídos reativos gerados durante a peroxidação lipídica (JORDÃO *et al.*, 1998).



O₂•⁻ radical superóxido, H₂O₂ peróxido de hidrogênio, OH• - radical hidroxil, NO• óxido nítrico, ONOO• peroxinitrito, SOD superóxido dismutase, Cat catalase, GSH glutatona reduzida, GSH-Px glutatona peroxidase, GSSG glutatona oxidada, GCL gama-glutamilcisteína sintase, GST glutatona s-transferase. Fonte: Adaptado de TANG e WANG (2012).

Figura 4: Mecanismos enzimáticos de defesas antioxidantes.

A maioria dos antioxidantes enzimáticos, como SOD, GPx e catalase, estão abundantemente expressos no fígado, sendo este o principal órgão envolvido em processos oxidativos e de detoxificação (STADLER *et al.* 2003).

Além dos antioxidantes enzimáticos, diversos antioxidantes não enzimáticos têm alcançado papel relevante no tratamento e prevenção de doenças. Muitos deles estão presentes em frutas e fitoterápicos, de forma que uma dieta rica em micronutrientes e com grande variedade de frutas e hortaliças garante uma boa ingestão de antioxidantes (PERCIVAL, 1998).

Os polifenóis presentes em plantas são uma importante classe de defesas antioxidantes. Esses compostos ocorrem geralmente em elevadas concentrações e são amplamente encontrados nas plantas medicinais ou utilizados na alimentação. Os polifenóis mais encontrados são os fenóis, ácidos fenólicos, taninos e flavonóides (PIETTA, 2000).

De acordo com HALLIWELL e GUTTERIDGE (2007), os flavonóides parecem agir como bons antioxidantes, pois são capazes de inibir a formação de EROs, eliminar as espécies reativas excedentes, e aumentar ou proteger as fontes de defesas antioxidantes. Muitos flavonóides podem ainda agir eficientemente quelando elementos traço, os quais podem atuar de forma importante no metabolismo do oxigênio. Ferro e cobre livres podem aumentar a formação de EROs como por exemplo, através da redução do peróxido de hidrogênio gerando o agressivo radical hidroxila, ou pela oxidação do LDL mediada por cobre (PIETTA, 2000).

2.4. O tratamento do diabetes com antioxidantes

Diversos estudos têm buscado identificar compostos antioxidantes naturais como os presentes em alimentos e plantas medicinais. Segundo o formulário de fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2011), plantas medicinais são espécies vegetais utilizadas com finalidade terapêutica. O Brasil é um dos países pioneiros no estudo e aplicação da medicina não convencional, aliando conhecimento popular a estudos científicos. O consumo de plantas medicinais pela população mundial tem sido

significativo. Dados mostram que cerca de 80% da população mundial já fizeram uso de algum tipo de erva na busca de alívio para sintomatologia dolorosa ou desagradável (MANGIATERRA, 2005). Com isso, estudos estão sendo constantemente realizados com o objetivo de validar conhecimentos populares, especialmente para o tratamento de diabetes.

Estudo realizado com um extrato aquoso de seis plantas medicinais, incluindo chicória e feno-grego concluiu que o tratamento *in vivo* por 6 semanas é benéfico para reduzir a glicemia de ratos diabéticos e melhorar o status antioxidante (WABEL *et al.*, 2008). Outro experimento demonstrou que tratamento com extrato aquoso de melão de são-caetano e feno-grego por 30 dias em ratos diabéticos induzidos por aloxano foi capaz de diminuir a glicemia de jejum e apresentou efeito antioxidante benéfico (TRIPATHI e CHANDRA, 2010). ROSSONI-JUNIOR *et al.* (2012) observaram que o tratamento de trinta dias com extrato de urucum, rico em carotenóides, é capaz de modular o balanço entre espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em animais diabéticos. O tratamento com açaí por um mês em ratos diabéticos também é capaz de modular a produção de espécies reativas por neutrófilos e tem efeito favorável nas defesas antioxidantes no fígado (GUERRA *et al.*, 2011).

2.5. A *Baccharis trimera* como possível agente antioxidante

Dentre as plantas medicinais utilizadas no Brasil, destacam-se as do gênero *Baccharis* que são ricas em flavonóides, triterpenos e diterpenos (VERDI *et al.*, 2005). Segundo VIEIRA *et al.* (2011), as plantas do gênero *Baccharis*, são fontes de promissor potencial antioxidante. Essas plantas têm a combinação de requisitos para serem considerados bons antioxidantes como a facilidade de doar elétrons e a capacidade de proteger membranas lipídicas. Essas propriedades são possivelmente responsáveis por parte dos benefícios que essas plantas acrescentam à medicina popular. Este autor sugere ainda que as propriedades antioxidantes das plantas deste gênero possam atuar na prevenção de patologias induzidas pelos mecanismos que levam a alterações do estresse oxidativo (VIEIRA *et al.*, 2011).

A espécie *Baccharis trimera*, do gênero *Baccharis* e família *Asteraceae*, é popularmente conhecida no Brasil como Carqueja (**Figura 5**). Apresenta-se como um subarbusto ereto, ramoso e glabro, com até 80 cm de altura. Originária da América do Sul é cultivada principalmente no Brasil, Chile, Argentina, Paraguai e Uruguai (RUIZ *et al.*, 2008). Tem sido utilizada no tratamento de doenças hepáticas, reumatismo, diabetes, e desordens digestivas (ABAD e BERMEJO, 2007).

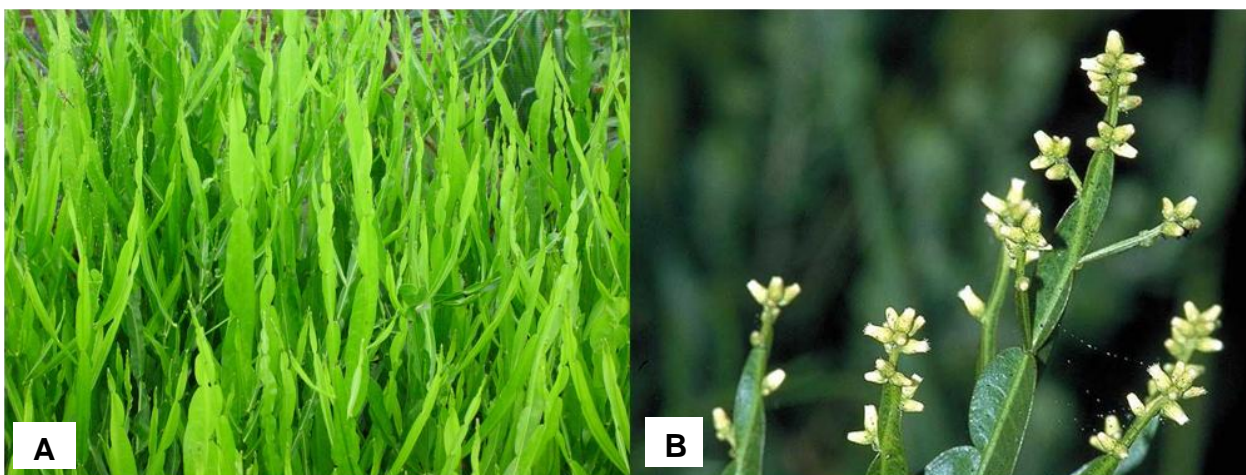


Figura 5: Foto do arbusto (A) e flores (B) de *Baccharis trimera*.

A atividade antioxidante *in vitro* da *Baccharis trimera* já foi comprovada através da capacidade em sequestrar radicais livres DPPH• (MORAIS *et al.*, 2009, DIAS *et al.*, 2009, OLIVEIRA *et al.* 2012), e estudos também já comprovaram a atividade antimicrobiana, microbiostática e microbicida da *Baccharis trimera* (AVANCINI *et al.*, 2000). Outro ensaio *in vitro* comprovou ainda potencial antisalmonela da *B. trimera* (WIEST *et al.*, 2009).

Ensaio *in vivo* têm demonstrado importantes efeitos da carqueja, como no trabalho de DIAS *et al.* (2009) que verificou atividade antiúlcera após tratamento com extrato liofilizado de *B. trimera* em camundongos. A atividade antiinflamatória foi comprovada por OLIVEIRA *et al.*, (2012) após tratamento com extrato fenólico em ratas, e por PAUL *et al.* (2009) após tratamento com extrato aquoso. PÁDUA *et al.* (2010) verificou atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de *B. trimera* em estudo *in vitro* e *in vivo* em um modelo de inflamação hepática induzida por paracetamol em ratos.

SOUZA *et al.* (2011) encontrou ainda que o extrato metanólico de *B. trimera* tem elevada ação na inibição da lipase pancreática, podendo ser promissora no tratamento da obesidade. Em estudos com humanos submetidos a tratamento de 30 dias com cápsulas de carqueja desidratada, FIGUEIREDO e PEREIRA (2009) encontraram ação do tratamento na redução de peso, na motilidade intestinal e na redução do apetite. COELHO *et al.* (2004) encontrou efeito terapêutico anti-artrítico e, em animais saudáveis, diminuição dos níveis séricos de glicose e triacilgliceróis.

A *B. trimera* também é mencionada por TROJAN-RODRIGUES *et al.* (2012) e FEIJÓ *et al.* (2012) em estudo sobre as plantas medicinais utilizadas como hipoglicemiantes para o tratamento de diabetes no Rio Grande do Sul e, segundo CECÍLIO *et al.* (2008) e BORGES *et al.* (2008), esta espécie é uma das mais citadas na literatura pela sua utilização popular para o tratamento desta doença em todo o Brasil. OLIVEIRA *et al.* (2005) comprovaram o efeito hipoglicemiante após verificar que o tratamento de sete dias com diferentes doses e extratos de *B. trimera* diminuiu a glicemia em camundongos diabéticos.

Um estudo com outra espécie de carqueja, a *B. articulata*, comprovou seu potencial anti-hiperglicêmico em ratos com hiperglicemia induzida. Esta espécie tem potencial antioxidante e elevado teor de flavonoides. O extrato n-butanólico de *B. articulata* mostrou aumentar a secreção de insulina (KAPPEL *et al.*, 2012).

Estudos com a *B. trimera* têm buscado verificar o seu potencial antioxidante e hipoglicemiante. Entretanto, ainda não há na literatura estudos que buscam verificar o efeito da *B. trimera* sobre a modulação do estresse oxidativo induzido pelo diabetes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* (carqueja) sobre os parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo em modelo experimental de diabetes *mellitus* tipo 1 induzido por aloxano em ratas.

3.2. Objetivos específicos

- Análises *in vitro*:
 1. Avaliação da atividade tóxica do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* em ensaio com *Artemia salina*.
 2. Avaliação do potencial antioxidante do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* por meio da capacidade do extrato em seqüestrar o radical DPPH.

- Análises *in vivo*: em ratos não diabéticos e diabéticos submetidos ou não ao tratamento com extrato de carqueja.
 1. Avaliar peso, glicemia, teste de tolerância oral a glicose e insulina;
 2. Avaliar os parâmetros bioquímicos no soro (perfil lipídico, função renal e hepática);
 3. Avaliar os marcadores de estresse oxidativo (TBARS e proteína carbonilada) no fígado;
 4. Avaliar em tecido hepático a expressão do RNAm das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutaciona peroxidase.
 5. Avaliar em tecido hepático a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase, glutaciona peroxidase e glutaciona redutase.
 6. Avaliar em tecido hepático a concentração de glutaciona total bem como a relação GSH/GSSG.

4. METODOLOGIA

4.1. Preparo do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera*

4.1.1. Material botânico

Exemplares de *Baccharis trimera* foram coletadas em agosto de 2011 no município de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. A espécie já havia sido identificada pela Doutora Viviane R. Scalon, e teve sua exsicata (identificação OUPR 22127) depositada no herbário José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), em Minas Gerais.

As partes aéreas da planta foram secas em estufa ventilada e em seguida pulverizadas em triturador forrageiro no laboratório de nutrição experimental da UFOP.

4.1.2. Obtenção do extrato hidroetanólico

Na obtenção do extrato hidroetanólico, a planta triturada foi submetida à extração com água destilada e álcool etílico a 70% na proporção de 1:1 durante 24 horas. Em seguida foi realizada a filtração a vácuo e o extrato obtido teve a água e o solvente evaporados em rotavapor. O preparo do extrato foi baseado no método descrito por GRANCE *et al.* (2008).

O extrato concentrado obtido, de coloração verde escura e cheiro adocicado, foi diluído em água para utilização no ensaio *in vivo*. A concentração de extrato por mL foi definida de acordo com o peso médio dos animais, tendo sido administradas as doses de 600 mg/kg (PÁDUA *et al.*, 2010) e 1200 mg/kg de peso corpóreo por dia.

4.2. Avaliação da atividade tóxica do extrato hidroetanólico de *Baccharis trimera* em ensaio com *Artemia salina*.

Para avaliação da atividade tóxica do extrato foi realizado ensaio com *Artemia salina*, segundo o método descrito por MEYER (1982). O ensaio de toxicidade com *Artemia salina* é um método simples, rápido e de baixo custo, utilizado para determinar a toxicidade de um extrato em diferentes concentrações. Este método se baseia na letalidade das larvas de *A. salina*, que se alimentam do extrato preparado em diferentes concentrações.

Na obtenção da *Artemia salina*, 200 g de ovos deste microcrustáceo foram colocados para eclodir por 48 horas em aquário com solução salina (sal marinho artificial Red Sea[®]) a 38% (38g de sal marinho:1000 mL de água), sob oxigenação e radiação luminosa.

O extrato bruto da carqueja foi diluído em álcool etílico, sendo utilizado 40 mg de extrato:4 mL de álcool. Desta diluição foram retiradas alíquotas de 5, 50, 250 e 500 µL, e colocadas em diferentes tubos de ensaio. Cada alíquota foi retirada em triplicata. Após evaporação total do solvente contido na diluição foram acrescentados 5mL da solução salina em cada tubo, resultando em concentrações de 10, 100, 500 e 1000 µg/mL. Em cada tubo, juntamente com a solução salina, foram adicionadas 10 larvas da *A. salina*. Após 24 horas de contato das larvas com o extrato, as larvas sobreviventes foram contadas. Como controle foi utilizado o substrato Lapachol nas mesmas concentrações. Os procedimentos com o controle foram idênticos aos realizados com o extrato.

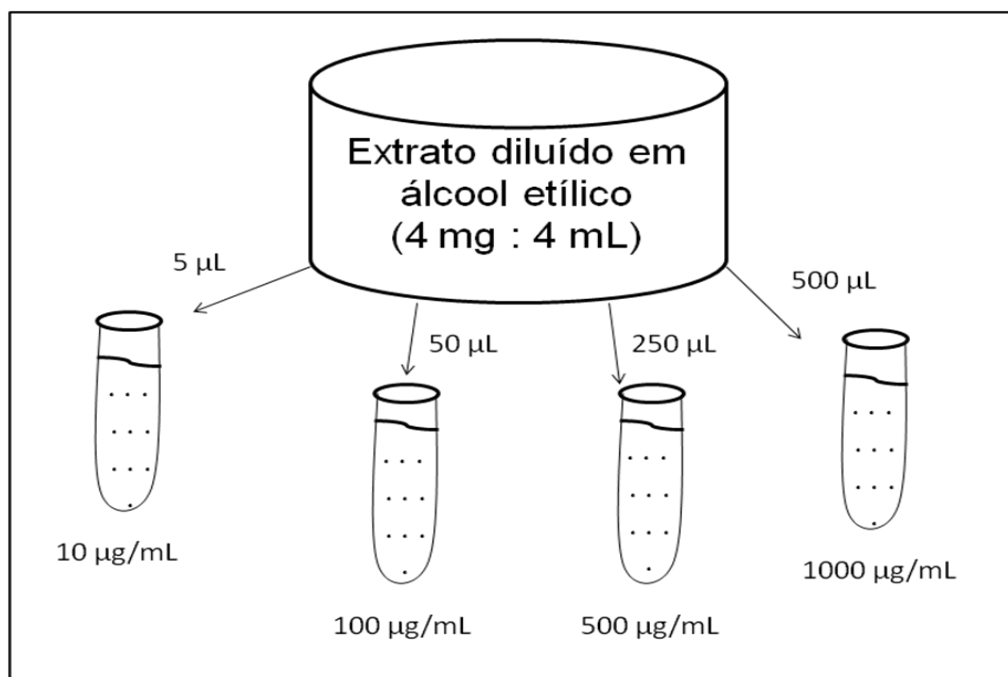


Figura 6: Representação esquemática da diluição do extrato para a realização do ensaio com *Artemia salina*.

A partir da contagem dos indivíduos mortos, pôde-se calcular o percentual de mortes por cada concentração. Os dados obtidos permitem ainda calcular a dose letal média (DL50) através de análise de regressão linear simples pelo método Probitos. A DL50 foi calculada utilizando o software MINITAB 14, com intervalo de confiança de 95%.

4.3. Capacidade antioxidante *in vitro* contra o radical DPPH•

Um dos métodos mais utilizados para determinar a atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Este método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical DPPH• em solução de metanol. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

A atividade do extrato hidroalcoólico de *Baccharis trimera* em seqüestrar o radical DPPH foi medida de acordo com o procedimento descrito por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) e SOUSA *et al.* (2007), com as devidas adequações. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Curva de calibração:

Primeiramente foi preparada uma solução estoque de DPPH em metanol, na concentração de 40 µg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Em seguida, foram realizadas diluições desta solução estoque a 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL. A construção da curva de calibração ocorreu a partir da leitura das absorvâncias nas diferentes concentrações (de 1 a 40 µg/mL) em espectrofotômetro a 516 nm, calibrado com metanol (“branco”).

Diluição e leitura das absorvâncias das amostras:

O extrato hidroalcoólico de *Baccharis trimera* foi diluído em metanol nas concentrações de 480, 240, 180, 120, 60 e 30 µg/mL. No momento da leitura foi acrescentado 2,7 mL da solução estoque de DPPH (40 µg/mL) a 0,3 mL de cada concentração das soluções do extrato. A leitura das absorvâncias foi realizada a 516 nm no primeiro minuto e a cada 10 minutos, até que se completassem 60 minutos. Foi preparada uma solução de calibração (“branco”) para cada concentração, com 0,3 mL das soluções do extrato (nas diferentes concentrações) e 2,7 mL de metanol.

A curva padrão foi realizada com o BHA (butil-hidroxi-anisol) como antioxidante de referência. Para isso, o antioxidante foi diluído em metanol nas mesmas concentrações do extrato. Da mesma forma, 0,3 mL de cada solução (nas diferentes concentrações) reagiu com 2,7 mL da solução estoque de DPPH (40 µg/mL). O branco foi feito com 0,3 mL de cada concentração acrescentados a 2,7 mL de metanol. A leitura foi realizada a 516 nm nos mesmos tempos até que se completasse 60 minutos.

A atividade de seqüestro do radical foi avaliada pela diminuição da absorvância do DPPH e a porcentagem de inibição foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Atividade Antioxidante} = \left[\frac{A \text{ controle (516nm)} - A \text{ amostra (516nm)}}{A \text{ Controle (516nm)}} \right] \times 100$$

Onde *A controle (516nm)* é a absorbância inicial da solução e *A amostra (516 nm)* é a absorbância final da mistura reacional com a amostra ou antioxidante de referência.

4.4. Animais

Para a realização do experimento foram utilizadas ratas albinas fêmeas da linhagem Fischer, com idade aproximada de 120 dias e peso médio de 181 g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da UFOP. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura, luminosidade e umidade controladas, e receberam dieta comercial para ratos e água *ad libitum*. Os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob número de protocolo 2011/15.

Os animais utilizados foram divididos em 6 grupos experimentais, sendo eles:

1. C - controle,
2. C600 - controle tratado com extrato de carqueja a 600 mg/kg,
3. C1200 - controle tratado com extrato de carqueja a 1200 mg/kg,
4. D - diabético sem tratamento,
5. D600 - diabético tratado com 600 mg/kg,
6. D1200 - diabético tratado com 1200 mg/kg.

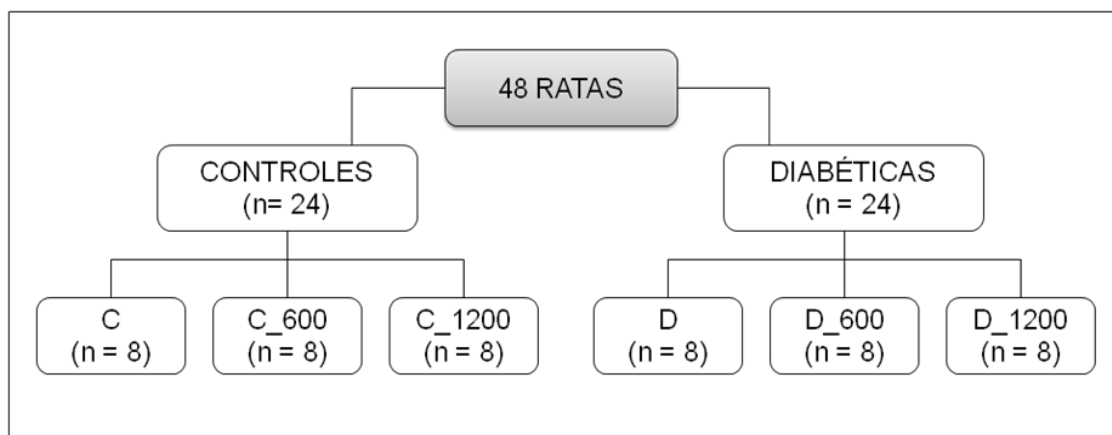


Figura 7: Delineamento experimental e número de ratas utilizadas por grupo.

Para garantir sua reprodutibilidade, o experimento foi realizado de forma pareada, ou seja, foi realizado em quatro etapas consecutivas, havendo pelo menos dois animais de cada grupo por etapa, resultando em 8 animais por grupo.

4.5. Indução do diabetes

Os animais dos grupos D, D600 e D1200 tiveram o DM induzido através de injeção intraperitoneal de uma dose única de Alozano (Alloxan Monohydrate Sigma[®]) a 135 mg/Kg de peso, diluído em solução de NaCl a 0,9%. Nos grupos de ratas não diabéticas foi administrada injeção intraperitoneal contendo o mesmo volume de NaCl.

Posteriormente à aplicação da droga, foi fornecido aos animais uma solução de glicose 10%, como única fonte hídrica por 10 horas para evitar uma hipoglicemia fatal, devido à liberação maciça de insulina que ocorre após a destruição das células beta do pâncreas (MAZZANTI *et al.*, 2003).

Para confirmação do diabetes, três dias após a indução com alozano os animais foram submetidos a avaliação da glicemia após 8 horas de jejum. A determinação dos níveis de glicose foi feita retirando-se sangue da veia caudal e utilizando o glicosímetro Accu - Chek[®] Active da Roche (Boehringer Mannheim, IN, USA). Os animais com glicemia de jejum superior a 300 mg/dL foram considerados diabéticos e selecionados para o experimento.

4.6. Tratamento com o extrato de *Baccharis trimera*

Os animais foram tratados por sete dias consecutivos, duas vezes ao dia, às 8h e às 18h (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Os animais dos grupos C600 e D600 receberam por gavagem duas doses (1 ml/dose) diárias do extrato de carqueja na concentração de 300 mg/kg de peso corpóreo, resultando em 600 mg/kg por dia. Os animais dos grupos C1200 e D1200 receberam por gavagem duas doses (1 ml/dose) diárias de extrato de carqueja na concentração de 600 mg/kg de peso corpóreo, resultando em 1200 mg/kg por dia. A concentração de extrato na dose desejada era preparada de acordo com o peso médio dos animais do mesmo grupo, e sofria ajuste a cada dois dias devido a perda de peso dos animais diabéticos. Os animais não tratados com extrato de carqueja (grupos C e D) receberam, também por gavagem, 1 ml de água nos mesmos horários dos grupos tratados.

4.7. Teste de tolerância oral a glicose (TTOG)

O teste de tolerância oral a glicose foi realizado três dias antes da eutanásia dos animais. Para isso, os animais ficaram em jejum por 8 horas e, em seguida, foi administrada via oral (por gavagem) uma solução de 2,5 g de glicose por kg de peso corpóreo diluída em água. Foram coletadas amostras de sangue da veia caudal nos momentos 0, 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de glicose. Os níveis de glicose foram determinados usando o aparelho Accu- Chek® Active da Roche.

4.8. Eutanásia e coleta do material biológico

Ao final dos sete dias de tratamento, os animais ficaram em jejum por 10 horas, e após este período foram anestesiados por inalação de isoflurano e eutanasiados por exsanguinação a partir da secção do plexo braquial. O sangue foi coletado em tubos de polipropileno com e sem 15µL de anticoagulante Glistab® (Labtest cat. 29) para

obtenção do plasma ou soro, respectivamente. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 10000g por 15 minutos e o plasma ou soro retirados foram armazenados a -80°C para realização das dosagens bioquímicas.

O fígado dos animais foi extraído para análise das defesas antioxidantes, dos marcadores do estresse oxidativo e da expressão gênica. Estes órgãos foram imediatamente armazenados a -80°C para realização das análises posteriores.

4.9. Análise dos parâmetros bioquímicos do soro e plasma

O plasma ou soro obtidos dos animais foram utilizados para dosagem de glicose, colesterol total, colesterol HDL, triacilgliceróis, enzimas hepáticas (ALT e AST), uréia e creatinina. As dosagens foram realizadas a partir de kits comerciais do laboratório LABTEST® (Lagoa Santa, MG, Brasil). Os protocolos são descritos no ANEXO 1.

4.10. Determinação de insulina sérica

Para determinação da concentração de insulina sérica foi utilizado o kit comercial “*Ultra-Sensitive Rat Insulin Elisa Kit*” (Crystal Chem, Downers Grove, IL, USA). Este kit é sensível para determinação de insulina de ratos, e utiliza-se o método de “ELISA sanduiche”. Nesta técnica, o anticorpo (anti-insulina) é imobilizado na microplaca. A amostra de soro contendo a insulina é adicionada e reage com o anti-insulina imobilizado. Após a lavagem dos poços, um segundo anti-anticorpo insulina ligado à uma peroxidase é adicionado, permitindo a reação com o complexo anticorpo/insulina presente na microplaca. Após o segundo anticorpo livre ser removido por lavagem, o substrato 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado, e o produto da reação colorido medido no leitor de microplaca a 450 e 630nm.

A concentração de insulina é determinada pela interpolação usando a curva padrão gerada pela plotagem da absorbância *versus* a concentração correspondente do padrão de insulina de rato.

4.11. Análise dos marcadores do estresse oxidativo em tecido hepático

4.11.1. Proteína Carbonilada

Proteína carbonilada é um marcador da oxidação de proteína por EROs. Derivados carbonílicos podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Neste método, o DNPH reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente (LEVINE *et al.*, 1994).

Para realização da dosagem, amostra de 400 mg de tecido hepático foi homogeneizada em 2 mL de tampão fosfato 50 mM, (pH 6,7) e em seguida o homogenato foi centrifugado a 10000g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado no procedimento experimental. 500 µL do sobrenadante do homogenato foram transferidos para dois tubos de polipropileno denominados, Amostra (A) e Controle (C). A cada tubo foi adicionado igual volume de ácido tricloroacético (TCA) 10% e após centrifugação a 5000g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados ao tubo A 500 µL de DNPH 10 mM em 2 M de ácido clorídrico (HCl), e ao tubo C 500 µL de HCl 2 M. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos sofrendo agitação a cada 15 minutos. No passo seguinte foram adicionados 500 µL de TCA 10% em cada tubo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5.000 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram novamente descartados. Os precipitados em ambos os tubos foram lavados com 1 mL da mistura etanol/acetato de etila, na proporção de 1:1, misturados no vórtex e novamente centrifugados conforme descrito na etapa anterior, o sobrenadante foi descartado. Este último passo foi repetido duas vezes. Ao final do processo de lavagem, foram adicionados em ambos os tubos 1 mL de SDS 6%, misturados no vórtex e centrifugados à 10.000 g por 10 minutos à 4°C. Finalmente as absorbâncias dos sobrenadantes foram determinadas a 370 nm. Os resultados são expressos em nmol de proteína carbonilada por mg de proteína.

O conteúdo de DNPH incorporado foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar do DNPH ($22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) segundo a lei de Lambert Beer

$$A=C.b.\epsilon$$

Onde A é a subtração da absorbância do tubo A (amostra) pela absorbância do tubo C (controle), C é a concentração, b é o caminho óptico e ϵ é o coeficiente de extinção molar.

4.11.2. Níveis de TBARS

A peroxidação lipídica foi determinada por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico utilizando o método de BUEGE e AUST (1978). A determinação da concentração de TBARS se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados.

Para realizar a dosagem, 100 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 1 mL de tampão Tris HCl 20 mM (pH 7,4) e em seguida o homogenato foi centrifugado a 10.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica.

Em um tubo criogênico, foi adicionado 500 μ L de homogenato, 250 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 28% dissolvido em HCl a 0,25N, 250 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 1% dissolvido em ácido acético 1:1, e 125 μ L de butil-hidroxi-tolueno (BHT) 5mM dissolvido em etanol. Este tubo foi agitado no vórtex e colocado em um banho maria a 95°C por 15 minutos. Após este tempo, os tubos foram imediatamente colocados em um banho de gelo, em seguida agitados e levados a centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 4°C. A absorbância do sobrenadante obtido foi determinada a 535 nm em espectrofotômetro zerado com água destilada (branco).

A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, segundo a lei de Lambert Beer. Usualmente essa concentração é representada em nmol/mL.

4.12. Análise das defesas antioxidantes

4.12.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase total foi determinada utilizando o “*Superoxide Dismutase assay Kit*” (Chemical Cayman, MI, EUA). Resumidamente, 100 mg de tecido hepático foram homogeneizados em 1 ml de tampão HEPES 20 mM, gelado, pH 7,2, contendo 1mM de EGTA, 210 mM de sacarose e 70 mM de manitol. O homogenato foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos em centrifuga refrigerada a 4°C, e o sobrenadante foi retirado para ser utilizado como amostra biológica.

Para a realização do ensaio foi utilizado 10 µL de sobrenadante. A reação iniciou-se pela adição da xantina oxidase. A placa foi incubada em um agitador a temperatura ambiente por 20 minutos e a absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808).

4.12.2. Atividade da Catalase

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por AEBI (1984).

Resumidamente, um fragmento de 100 mg de tecido hepático foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato 100mM, (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 10.000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno foram adicionados 50 µL de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e 40 µL de água destilada e 10 µL da amostra. A reação é iniciada pela adição de 900 µL de H_2O_2 (5 mM). As absorbâncias foram determinadas a cada minuto, durante três minutos, a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

Uma unidade (U) de catalase é equivalente a hidrólise de 1mol de H_2O_2 ($\epsilon = 39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (AEBI, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em µmol/mL de amostra. A atividade da catalase foi calculada segundo a

lei de Lambert Beer. A absorvância utilizada para o cálculo é o delta obtido das três absorvâncias lidas (absorvância final – absorvância inicial).

4.12.3. Glutationa total, oxidada e reduzida

A glutathione está presente nas células, principalmente, na sua forma reduzida (GSH) representando em torno de 90%, o restante aparece na forma de glutathione oxidada (GSSG). Esta dosagem foi adaptada do kit comercial Sigma #CS0260, e utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutathione total (GSH+GSSG) em amostras biológicas, através da redução do DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) à TNB.

Para realizar a dosagem, amostra de 100mg de tecido hepático foi homogeneizada com 1mL de ácido de sulfosalicílico 5% (SSA), e em seguida centrifugado a 10.000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

A dosagem foi realizada em microplaca de 96 poços. Inicialmente são adicionados aos poços 150 µl da mistura de trabalho que contém glutathione redutase, DTNB, e 100 mM tampão fosfato de potássio. Em seguida, adicionou-se 10 µl de amostra para os testes e 10 µl de 100 mM tampão fosfato de potássio para o branco. As amostras foram incubadas por 5 minutos e a reação foi iniciada com a adição de 50µl de solução de NADPH. Com o início da reação, a absorvância foi imediatamente medida a 405 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas 6 leituras com intervalo de 1 minuto entre cada leitura.

Para mensurar os níveis de glutathione oxidada, o procedimento é o mesmo, porém a amostra biológica passa por um processo de derivatização antes do início da dosagem. Para isso deve ser feito uma alíquota de 100 µl de amostra e acrescentar à esta 2 µl de vinilpiridina e 3 µl de TEA. Esta nova amostra deve ter o pH entre 6 e 7 e fica incubada por uma hora. Após este período, utilizou-se 10 µl desta nova amostra para reagir com a mistura de trabalho, como anteriormente descrito.

As concentrações de glutathiona total e oxidada são obtidas por meio de uma curva padrão realizada para cada uma das dosagens. A subtração da concentração de glutathiona oxidada do valor da concentração da glutathiona total fornece o valor da concentração da glutathiona reduzida.

4.12.4. Atividade da Glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da enzima glutathiona peroxidase foi mensurada utilizando o “*Glutathione Peroxidase Activity Kit*” (Assay Designs Inc., catalog #900-158, Michigan, EUA) adaptado. O ensaio é baseado na oxidação da glutathiona reduzida a oxidada catalisada pela enzima glutathiona peroxidase. A glutathiona oxidada por sua vez é reciclada e convertida de volta a glutathiona reduzida pela enzima glutathiona redutase utilizando NADPH. O decréscimo na absorvância medida a 340nm durante a oxidação do NADPH a NADP^+ é indicativo da atividade de glutathiona peroxidase.

Para realizar a dosagem, uma amostra de 40mg de tecido hepático foi homogeneizado em 200 μl de tampão de ensaio proveniente do kit contendo 0,4 mM do inibidor de protease PMSF e 1% de Triton x-100. O homogenato foi centrifugado a 1.000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para ser utilizado como amostra.

A dosagem foi realizada em microplaca de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 200 μl do tampão de ensaio contido no kit com pH 7,0, 20 μl do mix de reação (contendo glutathiona reduzida, NADPH, glutathiona redutase e azida sódica), e 20 μl de amostra para os testes, padrão de glutathiona peroxidase para o controle positivo, e tampão de ensaio para o branco. A reação foi iniciada ao serem adicionados 20 μl de H_2O_2 a todos os poços. A absorvância foi imediatamente medida a 340 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas 6 leituras com intervalo de 10 segundos entre cada leitura.

Para cálculo da atividade de glutathiona peroxidase foi considerada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade em mmol/min/ml ou U/ml} = \frac{\Delta A_{340} \times DF}{6,22 \times V}$$

Onde:

Abs 340nm/minuto = Abs inicial – Abs final

$\Delta A_{340} = \Delta A_{340}/\text{min}_{(\text{branco})} - \Delta A_{340}/\text{min}_{(\text{teste})}$

6,22 = ϵ^{mM} do NADPH

DF = fator de diluição da amostra antes de adicionar à reação

V = volume da amostra em ml

4.12.5. Atividade da Glutathiona redutase (GR)

A atividade da enzima glutathiona redutase foi determinada utilizando o “*Glutathione Reductase Assay kit*” (Sigma, Missouri, EUA). O ensaio é baseado na redução da glutathiona pelo NADPH em presença de glutathiona redutase.

Uma amostra de 50mg de tecido hepático foi homogeneizada com 500 μl de tampão proveniente do kit (10 mM fosfato de potássio pH 7,5, 1 mM EDTA e 1mg/ml de albumina bovina sérica). O homogenato foi centrifugado a 10.000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para ser utilizado como amostra.

O ensaio colorimétrico foi adaptado para ser realizado em microplaca de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 125 μl de 2 mM glutathiona oxidada, 40 μl de tampão de ensaio proveniente do kit, 10 μl de amostra para os testes, padrão de glutathiona redutase para o controle positivo, e tampão de ensaio para o branco. Em seguida foram adicionados 62,5 μl de 3 mM DTNB e a reação foi iniciada ao adicionar 12,5 μl de 2 mM NADPH em todos os poços. A absorbância foi imediatamente medida a 412 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas 11 leituras com intervalo de 10 segundos entre cada leitura.

Para o cálculo da atividade de glutathiona redutase na amostra foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade da GR em Unidades/ml} = \frac{(\Delta A_{\text{amostra}} - \Delta A_{\text{branco}}) \times (\text{fator de diluição})}{\epsilon^{\text{mm}} \times \text{volume da amostra em ml}}$$

Onde, ϵ^{mm} do DTNB = $14,15\text{mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$

4.13. Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de LOWRY *et al.* (1951). O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin Ciocalteau, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azul.

Inicialmente são preparadas as soluções de trabalho conforme descrito abaixo:

- Reagente A: dissolve-se 0,25g de sulfato de cobre e 0,5 de citrato de sódio em 100 mL de água destilada. A solução deve ser armazenada, no escuro, em temperatura ambiente.

- Reagente B: dissolve-se 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250mL de água destilada. Deve ser armazenada a temperatura ambiente.

- Reagente C: adiciona-se 1 mL do reagente A em 50mL do reagente B. Deve ser preparado na hora do teste.

- Reagente D: dissolve-se 1 mL de Folin-Ciocateau em 1mL de água destilada. Deve ser preparado na hora do teste.

Serão realizados quatro pontos para a construção da curva padrão para proteínas totais, pelo seguinte procedimento:

P1- 25 μ L de uma solução estoque de proteínas a 0,2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto é de 0,05mg/mL.

P2- 7,5 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto é de 0,15mg/mL.

P3- 15µL de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto é de 0,30mg/mL.

P4- 25µL de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto é de 0,5mg/mL.

Para a realização da dosagem, são adicionados 10 µL de amostra ou padrão em tubos de polipropileno, e completados para 100 µL com água destilada. O branco, usado para zerar o espectrofotômetro, é feito apenas com 100 µL de água destilada. Posteriormente adiciona-se 1 mL do reagente C em todos os tubos (incluindo branco e padrões). A mistura foi agitada no vórtex e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foi adicionado em cada tubo 100 µL do reagente D. O volume foi misturado e incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Em seguida, realiza-se a leitura em espectrofotômetro a 660nm.

Após as leituras, foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) *versus* absorvância do padrão (Eixo X). A equação da reta gerada foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais nos homogenatos de tecidos. Todas as concentrações foram obtidas em mg/mL.

4.14. Ensaio de RT-PCR Quantitativa em Tempo Real

4.14.1. Extração do RNA Total

O RNA total do tecido hepático das ratas foi isolado utilizando o sistema RNAgents Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 50 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 292 µL de tampão de lise. Do homogenato obtido coletou-se 175 µL que foram adicionados a 350 µL do “RNA dilution buffer”. Essa solução foi incubada a 70°C por exatamente 3 minutos. Após este período, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo

autoclavado onde adicionou-se 200 µL de etanol 95%. Essa mistura foi transferida para o “Spin Basket Assembly”, centrifugada por 1 minuto a 12.000 rpm, e após a centrifugação, descartou-se o eluente. Adicionou-se 600 µL de “RNA Wash solution” (RWA) e os tubos foram centrifugados novamente por 1 minuto a 12.000 rpm. O eluente foi novamente descartado. Adicionou-se 50 µL de mix de incubação de DNase nas membranas dos tubos que foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 µL de “DNase Stop Solution” e os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 12.000 rpm. Em seguida foram realizados dois ciclos de lavagem com RWA seguidos de centrifugação. Após estas etapas, o “spin basket” foi transferido para um tubo comum. Adicionou-se 100 µL de “Nuclease Free Water” na membrana, e o tubo foi centrifugado duas vezes por 1 minuto a 12.000 rpm. A concentração e pureza do RNA total contido no eluente obtido foi verificada a 260 e 280 nm no espectrofotômetro Nano Vue da GE Healthcare (Reino Unido).

4.14.2. Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de 1µg de RNA total utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O meio de reação continha 2 µL de tampão 10x (500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, 25 mM de MgCl₂, pH 8,3), 0,8 µL da mistura de desoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) 100 mM, 1 µL de primers randômicos, 1 µL da enzima transcriptase reversa MultiScribe (50 U/µL). A reação foi realizada nas seguintes condições: 10 minutos a 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C em termociclador Biocycler modelo MJ96+.

4.14.3. Desenho dos primers

Os primers utilizados para a amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados de acordo com sequências de nucleotídeos publicadas por Xiong *et al.* (2010) para Catalase, Glutathione Peroxidase, Zn-SOD e Mn-SOD e 18S.

4.14.4. RT-PCR Quantitativa em Tempo Real

Para a análise da expressão dos genes em estudo foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (qPCR). A quantificação dos produtos formados durante os ciclos de amplificação foi realizada com o reagente *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, sendo adicionados em cada poço 2 µL de cDNA (100 ng), 0,48 µL de cada primer (forward e reverse, 10 µM), 6 µL *Power de SYBR® Green Master Mix* e volume final de água livre de DNase para 12 µL. As reações foram realizadas nas seguintes condições, 50°C por 2min, 95° C por 10 min e então 40 ciclos de 95°C por 15s (desnaturação) e 60°C por 1min (anelamento dos iniciadores e extensão dos produtos) no termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems, CA, USA). O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems). Todas as análises foram realizadas em triplicata técnica. A especificidade dos produtos obtidos foi confirmada pela análise das curvas de dissociação do produto amplificado ao final de cada reação.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica (C_T comparativo ou $\Delta\Delta C_T$), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as diferentes amostras. A expressão dos genes alvo foi determinada em função da expressão do gene de referência endógena 18S e uma amostra normalizadora (grupo C) foi utilizada como base para os resultados de expressão comparativa. De posse dos valores de C_T , que corresponde ao número de ciclos na fase exponencial da PCR em que a fluorescência ultrapassa o valor basal, foi calculado o ΔC_T de cada amostra, na qual o valor do C_T do gene de referência endógena (18S) foi subtraído do C_T do gene alvo.

$$\Delta C_T = C_T \text{ do gene alvo} - C_T \text{ do gene de referência endógena}$$

Em seguida foram calculados os valores de $\Delta\Delta C_T$, na qual o valor do ΔC_T da amostra normalizadora (grupo C) foi subtraído do ΔC_T das amostras teste (demais grupos experimentais).

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ da amostra teste} - \Delta C_T \text{ da amostra normalizadora}$$

Os valores do $\Delta\Delta C_T$ obtidos foram utilizados em uma fórmula aritmética para o cálculo final da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, dada por $2^{\Delta\Delta C_T}$.

4.15. Análise estatística

Os dados foram submetidos a testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Após verificar se amostra passou ou não no teste de normalidade, os dados normais foram analisados por teste t de Student's, e dados não paramétricos analisados pelo teste de Mann-Withney. Para a análise do peso, glicemia e TTOG foi utilizado o teste ANOVA one-way com pós teste de Tukey, e no caso de dados não paramétricos, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis com pós teste de Duun. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, de mediana/intervalo interquartil para os dados não paramétricos. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Todas as análises foram realizada no software GraphPad Prism 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. Ensaio de toxicidade com *Artemia salina* sp

O número e percentual de larvas de *Artemia salina* mortas por concentração do extrato de *Baccharis trimera* são apresentados na **tabela 1**, e os dados das larvas expostas ao substrato padrão (Lapachol) são apresentados na **tabela 2**.

Tabela 1: Número e percentual de larvas de *Artemia salina* mortas, expostas a diferentes concentrações do extrato de *Baccharis trimera*.

Concentração do extrato de <i>B. trimera</i>	Número de organismos expostos	Número de organismos mortos	Percentual de organismos mortos
10µg/mL	30	0	0%
100µg/mL	30	0	0%
500µg/mL	30	0	0%
1000 µg/mL	30	13	43,3%

Tabela 2: Número e percentual de larvas de *Artemia salina* mortas, expostas a diferentes concentrações do extrato de Lapachol.

Concentração do Lapachol	Número de organismos expostos	Número de organismos mortos	Percentual de organismos mortos
10µg/mL	30	0	0%
100µg/mL	30	5	16%
500µg/mL	30	26	86,6%
1000 µg/mL	30	30	100%

Os dados obtidos foram analisados por regressão linear simples a partir do método Probitos, por meio do qual é possível calcular a dose letal média (DL50). Pela análise dos dados, foi possível constatar que a DL50 do extrato hidroetanólico da

Baccharis trimera é igual a **924,60 µg/mL**, e a DL50 do substrato Lapachol foi de **186,20 µg/mL**.

5.2. Análise da capacidade antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante do extrato hidroetanólico de *B. trimera* e do antioxidante de referência BHA foi determinada em seis diferentes concentrações e expressa em percentual de atividade antioxidante (% AA). O % AA corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. A avaliação quantitativa da atividade antioxidante (%AA) do extrato hidroetanólico de *B. trimera* e do controle BHA, nas concentrações de 30, 60, 120, 180, 240 e 480 µg/mL, determinada pelo ensaio do DPPH, estão apresentados na **figura 8**. Podemos observar através da figura que o extrato de *B. trimera* apresenta atividade antioxidante especialmente em elevadas concentrações, mas esta atividade é menor se comparada ao antioxidante de referência BHA.

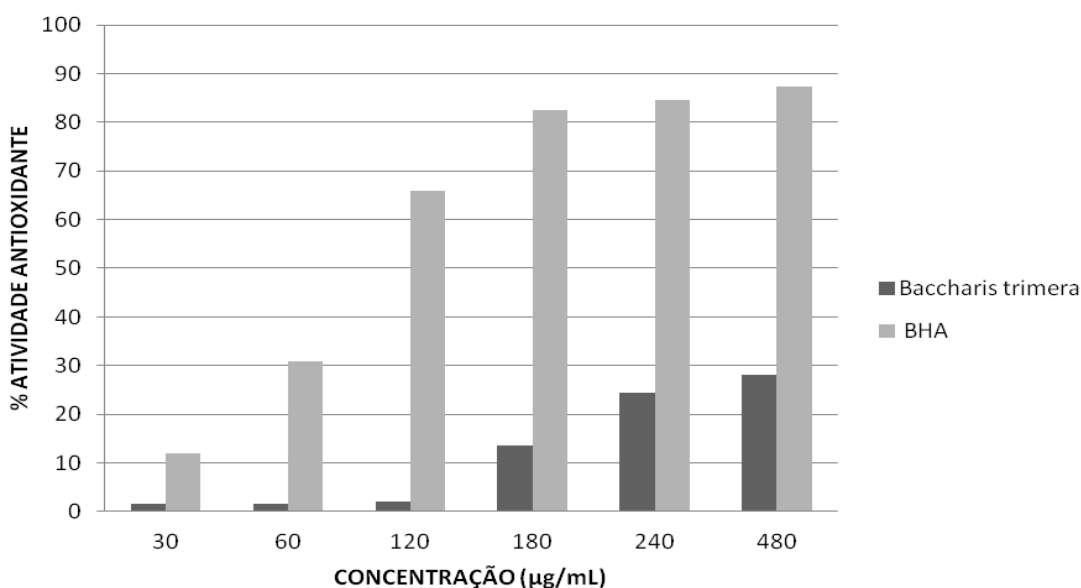


Figura 8: Percentual de atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *Baccharis trimera* e do antioxidante de referência BHA em diferentes concentrações avaliadas em 60 minutos.

5.3. Avaliação do peso corporal, glicemia e teste de tolerância oral a glicose

Para caracterização do modelo de DM tipo 1, foi analisado o peso inicial e final dos animais, glicemia de jejum inicial e final, e insulina sérica. A glicemia de jejum no início do tratamento foi mensurada pelo glicosímetro, conforme descrito anteriormente, e a glicemia avaliada no final do tratamento foi mensurada a partir do plasma. Ambos os resultados estão expressos em mg/dL.

A **tabela 3** mostra que não houve diferença estatisticamente significativa no peso inicial entre os diferentes grupos. O mesmo resultado foi observado para o peso final. Em relação a glicemia inicial e final, os animais dos grupos diabéticos apresentaram maior nível de glicose quando comparados aos animais não diabéticos. Com relação à insulina, apenas o grupo de animais diabéticos sem tratamento (D) apresentou diminuição significativa na concentração de insulina quando comparado ao grupo controle (C).

Tabela 3: Avaliação do peso, glicemia inicial e glicemia final em ratas diabéticas e não diabéticas tratadas com extrato de carqueja durante sete dias.

	GRUPOS EXPERIMENTAIS					
	C	C600	C1200	D	D600	D1200
Peso inicial (g)^A	177,6±6,6	177,1±6,5	178,2±6,1	185,4±4,7	184,8±4,1	183,8±5,6
Peso final (g)^A	170,8±11,3	169,7±6,3	168,1±7,01	160,6±10,4	162,7±16,1	156,5±13,1
Glicemia inicial (mmol/L)^A	5,27±0,43 ^(a)	4,7±0,46 ^(a)	5,17±0,44 ^(a)	26,24±4,63 ^(b)	27,66±6,21 ^(b)	22,28±5,74 ^(b)
Glicemia final (mmol/L)^B	5,7/3,4-7,5 ^(a)	5,4/4,6-6,7 ^(a)	5,2/4,8-5,9 ^(a)	22,26/18,4-28,2 ^(b)	22,6/15,7-26,3 ^(b)	22,3/17,5-24,6 ^(b)
Insulina (pmol/L)^B	0,8/0,7-0,84 ^(a)	0,84/0,8-0,9 ^(a,b)	0,87/0,8-0,96 ^(a,b)	0,65/0,5-0,7 ^(b)	0,72/0,6-0,9 ^(a,b)	0,84/0,6-0,94 ^(a,b)

^A Valores expressos em média ± desvio padrão. Dados analisados com o teste ANOVA one-way.

^B Dados não paramétricos submetidos ao teste Kruskal-Wallis. Valores expressos em mediana/intervalo interquartil.

Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os grupos (p<0,05) pelo teste ANOVA oneway.

O teste de tolerância à glicose foi realizado três dias antes da eutanásia dos animais. Após a administração da solução de glicose, a glicemia dos animais foi dosada nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos.

Na **figura 9** observa-se um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na glicemia dos animais diabéticos (D, D600 e D1200) quando comparados aos animais do grupo controle (C, C600 e C1200) em todos os tempos avaliados (T0, T30, T60, T120). Entretanto, a carqueja não foi capaz de melhorar a resposta glicêmica dos animais diabéticos em nenhum dos tempos avaliados e nas concentrações testadas.

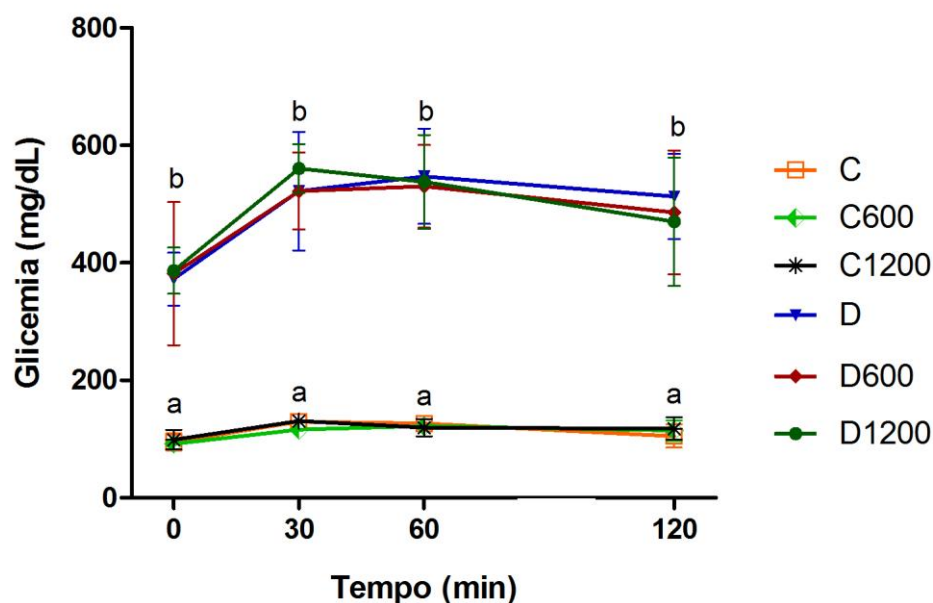


Figura 9: Avaliação da tolerância oral à glicose em animais diabéticos e não diabéticos tratados com extrato de carqueja durante sete dias. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$ pelo teste ANOVA one-way).

5.4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos

Para avaliação do perfil lipídico, função renal e hepática dos animais foram realizadas análises bioquímicas no soro. Com o intuito de avaliarmos o perfil lipídico dos animais dosamos os níveis de colesterol total, colesterol HDL e triacilglicerol. Dentre esses parâmetros, apenas a análise de triacilgliceróis apresentou diferença

estatisticamente significativa, onde o grupo de animais diabéticos (D) apresentou maior nível de triacilglicerol com relação ao grupo controle (C). Para avaliar a função renal, foram dosados os níveis de uréia e creatinina. Para ambas as dosagens, o grupo D apresentou um aumento significativo destes parâmetros quando comparado ao grupo C. Vale ressaltar que ao analisar a creatinina, os animais do grupo D600 tiveram um nível sérico de creatinina maior quando comparado ao grupo diabético sem tratamento (D). Para avaliação do perfil hepático foram dosadas as enzimas hepáticas aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT). Em ambas as dosagens, os animais do grupo diabético (D) apresentaram um aumento significativo destas enzimas quando comparado aos animais do grupo C.

Tabela 4: Análises bioquímicas em soro de animais diabéticos ou não diabéticos tratados com extrato de carqueja durante sete dias.

	GRUPOS EXPERIMENTAIS					
	C	C600	C1200	D	D600	D1200
Colesterol total (mmol/L)^B	1,5/1,46-1,86	1,92/1,54-2,56	1,8/1,48-2,17	1,76/1,29-2,23	1,94/1,4-2,2	1,68/1,42-1,72
HDL (mmol/L)^A	1,1±0,3	1,1±0,3	1,05±0,3	0,9±0,2	0,9±0,3	0,8±0,3
Triacilgliceróis (mmol/L)^A	0,6±0,14	0,5±0,09	0,5±0,08	1,03±0,4 ^(*)	1,04±0,4	1,2±0,5
Uréia (mmol/L)^B	9,32/7,3-9,96	10,13/8,9-10,5	8,28/7,3-9,3	28,4/25,4-34,6 ^(*)	29,18/23,5-33,9	24,86/20,9-30,3
Creatinina (mmol/L)^A	60,3±7,7	62,3±5,6	63,4±11,8	72,5±4,9 ^(*)	88,7±12,6 ^(#)	73,9±17,1
AST (U/mL)^A	107,1±11	116,2±16,4	113,2±11,9	130,6±18,4 ^(*)	121,7±32,8	122,4±26,9
ALT (U/mL)^A	46,7±6,4	48,6±7,5	50,2±9,7	93,9±19,9 ^(*)	86,2±28,1	91,8±26,2

^A Valores expressos em média ± desvio padrão. Dados analisados com o teste t.

^B Dados não paramétricos analisados pelo teste Mann Whitney. Valores expressos em mediana/intervalo interquartil.

(*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao grupo controle. (#) indica diferença significativa em relação ao grupo diabético sem tratamento. C: controle; C600: controle + tratamento extrato de carqueja 600 mg/kg; C1200: controle + tratamento extrato de carqueja 1200 mg/kg; D: diabéticos sem tratamento; D600: diabéticos + tratamento extrato de carqueja 600 mg/kg; D1200: diabéticos + tratamento extrato de carqueja 1200 mg/kg

5.5. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo

Como biomarcadores indiretos do estresse oxidativo, utilizou-se a dosagem de TBARS para avaliar a peroxidação lipídica, e a dosagem de proteína carbonilada para avaliar a oxidação proteica (figura 10).

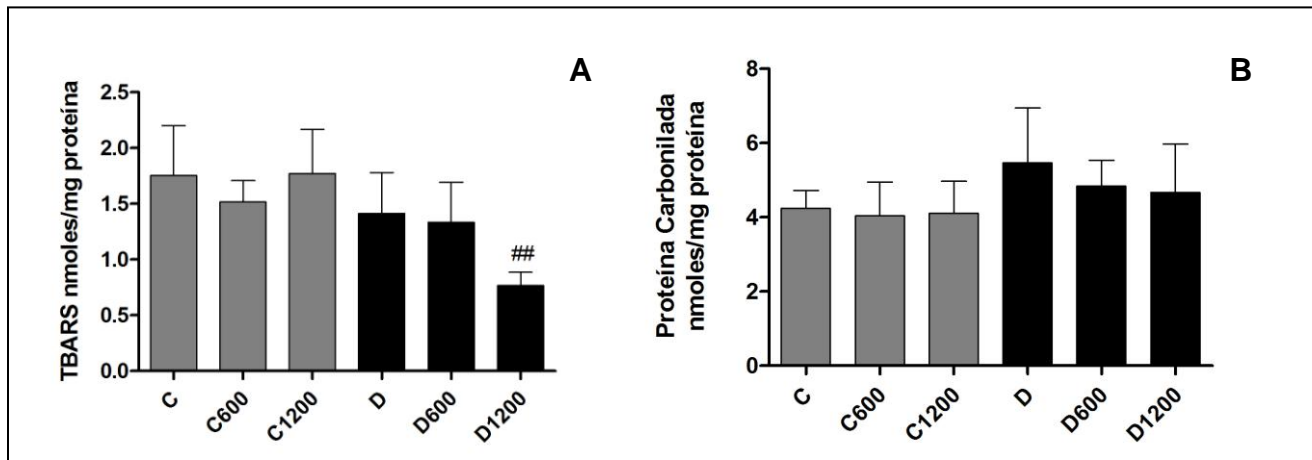


Figura 10: Avaliação dos níveis de TBARS (A) e Proteína Carbonilada (B) em fígado de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ao tratamento com extrato de *B. trimera* por 7 dias. (##) $p < 0,05$ comparado ao grupo D.

A dosagem de TBARS realizada em tecido hepático mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais do grupo diabético sem tratamento (D) e controle (C). Entretanto, observou-se que os animais diabéticos tratados com a dose de 1200 mg/kg apresentou uma diminuição significativa nos níveis de TBARS comparados aos animais diabéticos sem tratamento (D). Já na análise de proteína carbonilada não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos avaliados.

5.6. Avaliação das defesas antioxidantes

5.6.1. Avaliação da expressão gênica e atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase

A **figura 11** mostra a expressão do mRNA das frações de Mn-SOD e Zn-SOD (painéis A e B), e atividade total da enzima antioxidante SOD (painel C). Na mesma figura mostramos ainda a expressão do mRNA da enzima catalase e sua atividade (painéis D e E).

Nossos resultados mostram um aumento significativo na atividade de SOD nos animais diabéticos (D) quando comparado aos animais do grupo controle (C). Esta elevada atividade se deve, provavelmente, à fração Mn-SOD, que apresenta maior expressão nos animais do grupo diabético (D) quando comparados aos animais do grupo controle (C). Já a expressão da Zn-SOD apresentou menor expressão nos animais diabéticos sem tratamento quando comparados ao grupo controle.

Já a enzima catalase apresentou menor atividade nos animais do grupo D comparados ao grupo C, e inversamente a este resultado, apresentou maior expressão nos animais do grupo D quando comparados aos animais do grupo C.

Com relação ao tratamento realizado com o extrato hidroetanólico de *B. trimera*, os animais do grupo C600 e D1200 apresentaram diminuição na expressão de Mn-SOD comparados aos seus controles (C e D respectivamente). Na expressão da enzima catalase, ambos os grupos tratados com a dose de 600 mg/kg apresentaram diminuição na expressão da enzima comparado aos seus controles (C x C600 e D x D600).

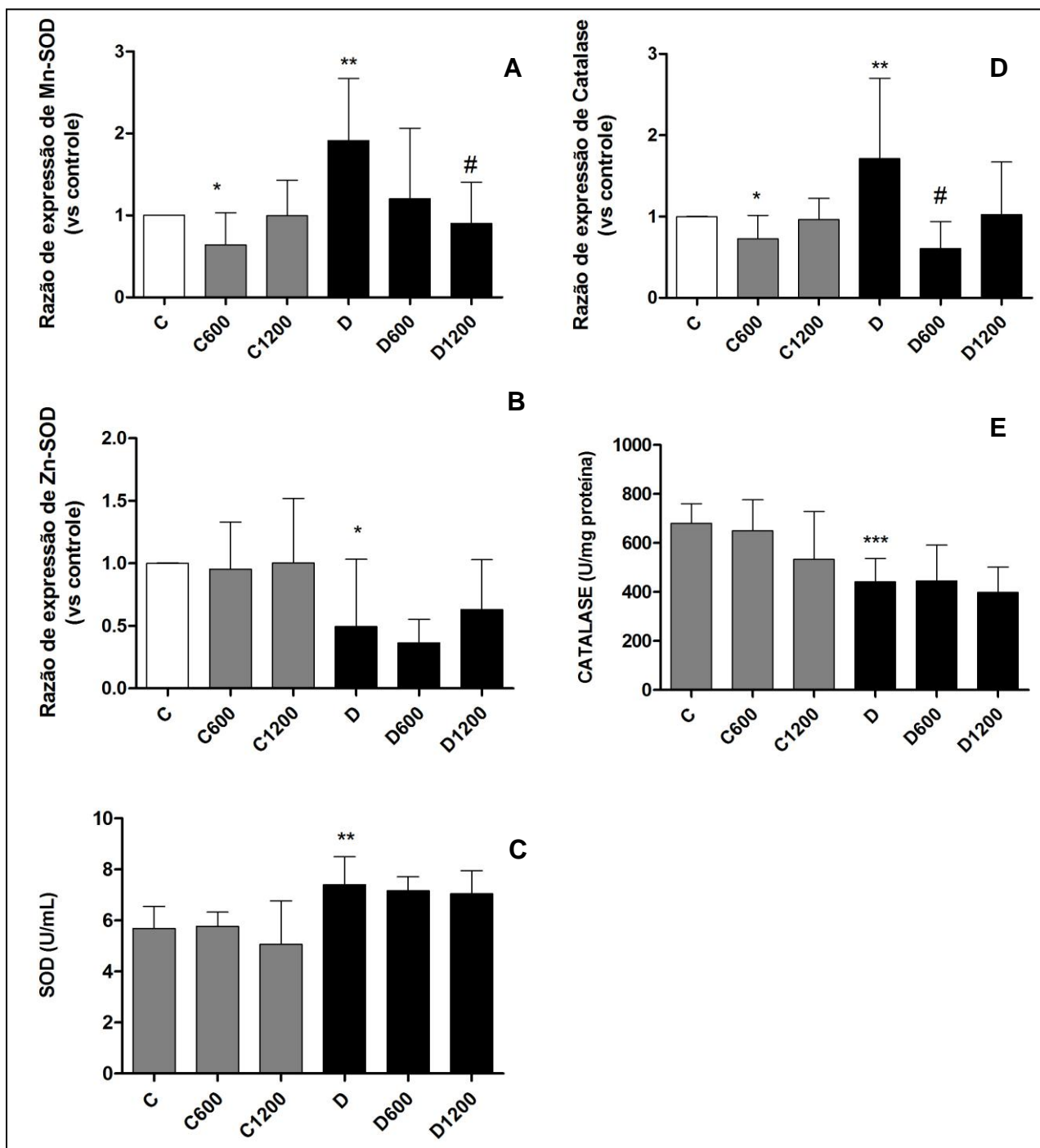


Figura 11: Avaliação e expressão das enzimas SOD e catalase em fígado de ratas diabéticas e não diabéticas submetidas a tratamento com extrato de *Baccharis trimera* por 7 dias. (A) expressão do RNAm da Mn-SOD; (B) expressão do RNAm da Zn-SOD; (C) atividade total da SOD; (D) e (E) expressão e atividade da enzima catalase respectivamente. (*) $p < 0,05$ comparado ao C, (**) $p < 0,005$ comparado ao C; (***) $p < 0,001$ comparado ao C; (#) $p < 0,05$ comparado ao D.

5.6.2. Glutationas

5.6.2.1. Glutationa total, oxidada e reduzida

A **figura 12** apresenta o resultado dos níveis de glutaciona total, glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona oxidada (GSSG) no fígado das ratas diabéticas e não diabéticas tratadas ou não com extrato de carqueja por 7 dias.

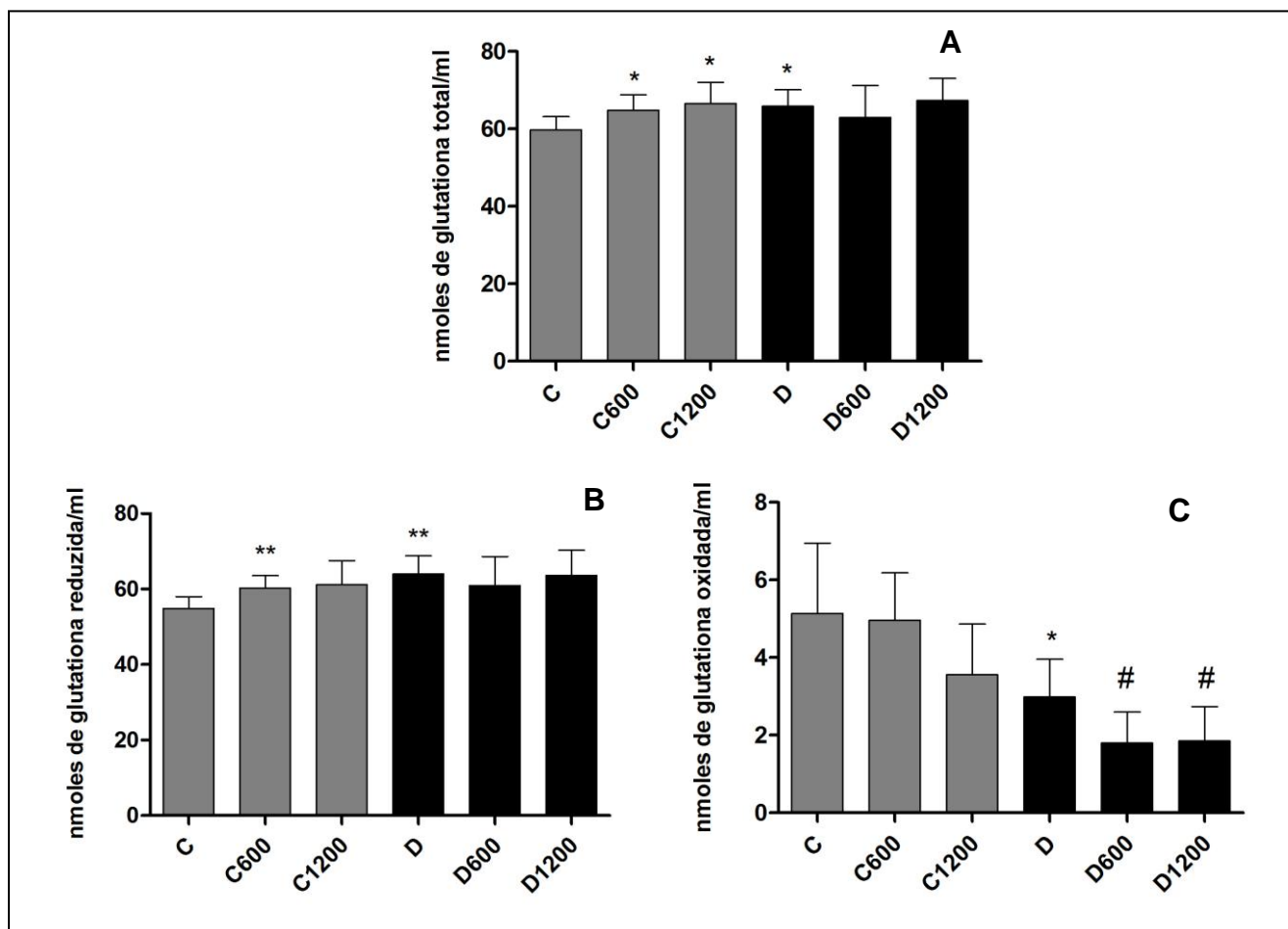


Figura 12: Avaliação dos níveis de Glutaciona em fígado de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ao tratamento com extrato de *B. trimera* por 7 dias. (A) Glutaciona total, (B) Glutaciona reduzida e (C) Glutaciona oxidada. (*) $p < 0,05$ comparado ao C, (**) $p < 0,005$ comparado ao C, (#) $p < 0,05$ comparado ao D.

Os resultados nos mostram que os animais do grupo diabético (D) apresentaram aumento significativo nos níveis de glutathione total quando comparados aos animais do grupo controle (C). Com relação ao tratamento com a carqueja, apenas os animais do grupo C600 e C1200 apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo C.

Com relação à glutathione reduzida, os animais do grupo D apresentaram aumento significativo dos níveis desta quando comparados aos animais do grupo controle. Com relação ao tratamento com carqueja, os animais do grupo C600 apresentaram também um aumento significativo dos níveis de glutathione reduzida quando comparados ao grupo C. Já a análise da glutathione oxidada mostra que os animais do grupo diabético sem tratamento (D) apresentaram uma diminuição do nível de glutathione oxidada, sendo esta diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo controle (C). Com relação ao tratamento com o extrato hidroetanólico de *B. trimera*, os animais do grupo diabético tratados com ambas as doses (D600 e D1200) apresentaram uma diminuição significativa na concentração de glutathione oxidada quando comparados aos animais do grupo diabético sem tratamento (D).

5.6.2.2. Expressão do RNA-m e atividade da enzima Glutathione peroxidase e atividade da enzima Glutathione redutase

A fim de avaliar a conversão da glutathione reduzida para seu estado oxidado e a “reciclagem” da glutathione oxidada para o seu estado reduzido, foram avaliadas a atividade e expressão do RNAm da enzima glutathione peroxidase e atividade da enzima glutathione redutase. Na **figura 13** observa-se que os animais do grupo diabético (D) apresentaram menor atividade da glutathione peroxidase com relação ao grupo controle, resultado este que foi confirmado pela expressão do RNAm desta enzima. Já a atividade da glutathione redutase, apresentada na **figura 13 (painel C)**, foi maior no grupo diabético (D) quando comparada a atividade do grupo controle (C). Com relação ao tratamento com o extrato de *B trimera*, a glutathione redutase apresentou alteração,

sendo que os animais do grupo C1200 apresentaram maior atividade desta enzima quando comparada a atividade dos animais do grupo C.

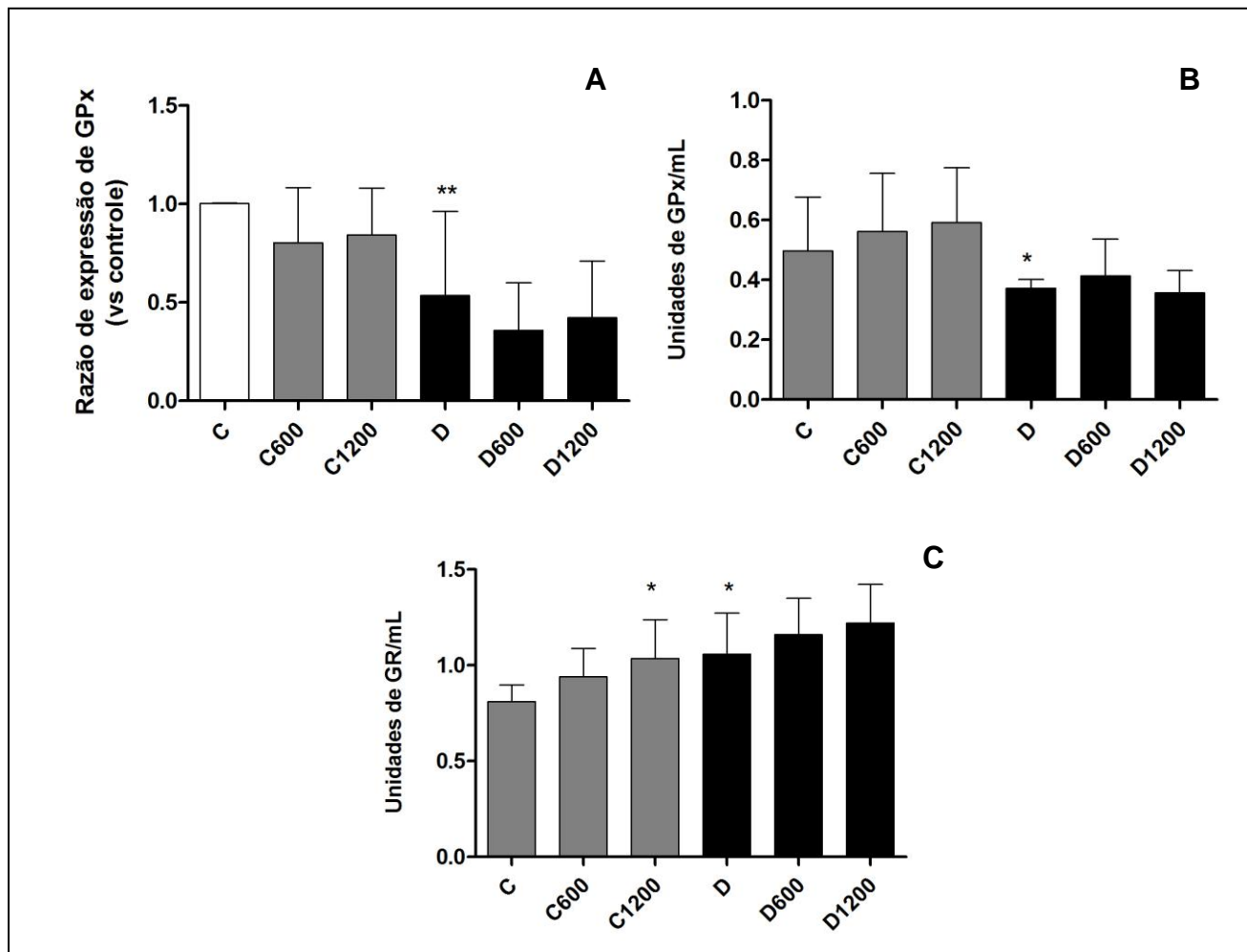


Figura 13: Avaliação da expressão (A) e atividade (B) do RNAm da enzima glutathiona peroxidase, e atividade da enzima glutathiona redutase (C) em fígado de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao tratamento com extrato de *B. trimera* por 7 dias.

6. DISCUSSÃO

O tratamento com antioxidantes tem sido uma forma relevante de prevenir ou tratar as complicações geradas pelo diabetes. Dentre os antioxidantes amplamente utilizados, destacam-se os flavonoides, pois são capazes de inibir a formação de EROs, eliminar as espécies reativas excedentes, e aumentar ou proteger as fontes de defesas antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Além disso, o efeito hipoglicemiante causado por algumas plantas medicinais pode ser por si só, capaz de melhorar o perfil antioxidante ou diminuir a produção de espécies reativas (TRIPATHI e CHANDRA, 2010).

As espécies do gênero *Baccharis* são popularmente utilizadas no Brasil, em especial a espécie *B. trimera*, considerada antioxidante por apresentar elevados teores de flavonóides, triterpenos e diterpenos. (VERDI *et al.*, 2005, VIEIRA *et al.*, 2011). Trabalhos realizados com a *B. trimera* relatam que esta espécie apresenta importantes propriedades biológicas, como antioxidante e antiinflamatória (RODRIGUES *et al.*, 2009, GENÉ *et al.*, 1996).

Com isso, o primeiro passo do nosso estudo foi verificar o potencial antioxidante do extrato de *B. trimera*, a partir de ensaio *in vitro* capaz de avaliar a capacidade do extrato em neutralizar o radical DPPH•.

A análise de DPPH realizada (**figura 8**) mostrou que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* apresentou potencial antioxidante, porém não tão potente quanto o percentual de atividade antioxidante do BHA que foi utilizado como antioxidante de referência. Nossos resultados corroboram com outros estudos, como o de MENDES *et al.* (2007) que encontraram atividade antioxidante em extrato hidroetanólico de *B. trimera*. DIAS *et al.* (2009) também verificaram o efeito antioxidante do extrato hidroetanólico da carqueja, e este foi semelhante ao do antioxidante de referência utilizado, a vitamina E, com percentual de inibição do DPPH próximo a 70%. OLIVEIRA, *et al.* (2012) testaram vários tipos de extrato de *B. trimera* e encontraram maior atividade antioxidante no extrato fenólico, sendo esta atividade maior do que a do antioxidante de referência utilizado (ácido ascórbico).

Embora o seu efeito antioxidante tenha sido comprovado, o uso da carqueja não deve ser indiscriminado. Apesar de não haver comprovação de toxicidade aguda, seu uso deve ser proibido para gestantes e no tratamento de hipertensão (RUIZ *et al.*, 2008). DIAS *et al.* (2009) testaram a toxicidade aguda do extrato bruto liofilizado de *B. trimera* diretamente em camundongos, e não encontrou mortes mesmo em dose elevada, 5 g/kg peso corpóreo. Entretanto, outra espécie do gênero *Baccharis*, a *B. pteronioides* tem sido associada a envenenamento de alguns animais. STELGEMEIER *et al.* (2009) verificaram toxicidade em tratamento de 200 mg desta espécie por 10 dias em hamsters, sendo que estes animais apresentaram anorexia, diarreia, infartos hemorrágicos e necrose em tecido hepático e renal. PÁDUA (2010) verificou que o tratamento com a dose de 600 mg/kg de extrato hidroetanólico de *B. trimera* contribuiu para dano hepático por aumentar a atividade da enzima hepática AST.

O nosso extrato passou por avaliação da toxicidade em ensaio com *A. salina*, no qual é possível avaliar a DL50, dose letal capaz de matar 50% da população. Existe uma relação entre o grau de toxicidade e a DL50, considerando-se que quando são verificados valores de DL50 acima 1000 µg/mL para substâncias naturais, estas são consideradas atóxicas, e valores abaixo de 130 µg/mL consideram a substância muito tóxica e letal (MEYER, *et al.*, 1982). Através da análise dos dados, foi possível constatar que a DL50 do extrato hidroetanólico da *Baccharis trimera* é igual a 924,60 µg/mL, ou seja, é considerada pouco tóxica por ser próximo do valor que determina substâncias naturais atóxicas. Já o substrato Lapachol que foi utilizado como padrão é considerado tóxico, tendo apresentado valor da DL50 igual a 186,20 µg/mL.

Tendo verificado o potencial antioxidante *in vitro* do extrato de *B. trimera*, e que o mesmo extrato não apresenta risco de toxicidade aguda, nosso próximo passo foi realizar o experimento *in vivo*, a fim de verificar se ratas diabéticas submetidas ao tratamento por sete dias com o extrato hidroetanólico da *B. trimera* apresentariam alterações no peso, na glicose e/ou insulina.

A indução do diabetes foi feita com aloxano, uma das principais drogas utilizadas para indução de diabetes experimental e um dos métodos mais reprodutíveis. (ETUK, 2010) O aloxano é um composto bastante instável rapidamente reduzido ao seu produto tóxico, o ácido dialúrico. Este subproduto estabelece um ciclo redox com

formação de radicais superóxido, que são dismutados a peróxido de hidrogênio e posteriormente são formadas espécies altamente reativas pela reação de fenton, os radicais hidroxila. A ação das espécies reativas de oxigênio com um aumento significativo na concentração de cálcio citosólico causa rápida destruição das células beta pancreáticas (SZKULDELSKI, 2001). Evidências sugerem que a lesão celular oxidativa causada pelos radicais livres contribuem para o desenvolvimento das complicações no DM tipo 1 e a diminuição das defesas antioxidantes (enzimáticas e não-enzimáticas) parecem estar correlacionadas com a gravidade das alterações encontradas em decorrência da doença (NOGUEIRA-MACHADO *et al.*, 2008).

Conforme apresentado na **tabela 3**, as ratas apresentavam peso corporal semelhante no início do experimento, e ao final do mesmo, o peso dos animais não apresentou diferença estatística entre os grupos controles e diabéticos. A perda de peso no animal diabético é uma característica associada à condição patológica, devido a um aumento do catabolismo muscular (RAVI *et al.*, 2004), entretanto, sete dias de experimento pode não ter sido tempo suficiente para causar alteração no peso entre os grupos.

Com relação à glicemia, os animais dos grupos diabéticos apresentaram uma glicemia elevada quando comparados aos animais dos grupos controles, como já era esperado. Entretanto, o tratamento com a carqueja não foi eficaz em diminuir a glicemia dos animais em nenhuma das doses. OLIVEIRA *et al.* (2005) ao avaliar o efeito hipoglicemiante do extrato de *B. trimera*, encontrou que o tratamento de 7 dias com duas doses diárias de 2000 mg/kg de extrato aquoso em camundongos diabéticos induzidos por streptozotocina (STZ) foi capaz de diminuir a glicemia desses animais, em comparação ao grupo de animais diabéticos sem tratamento. Este estudo, entretanto, não levou em consideração os possíveis efeitos hepatotóxicos da elevada concentração desta dose (3,3 vezes maior do que a maior dose utilizada no nosso experimento). OLIVEIRA *et al.* (2005) testou ainda outras duas diferentes frações do extrato de *B. trimera*: etanólica e butanólica, e estas não foram efetivas na redução da glicemia dos camundongos diabéticos.

Um estudo com outra espécie de carqueja, a *B. articulata*, mostrou que esta possui potencial anti-hiperglicêmico. Esta espécie tem potencial antioxidante e elevado

teor de flavonoides. O extrato n-butanólico de *B. articulata* mostrou aumentar a secreção de insulina (KAPPEL *et al.*, 2012).

Os nossos resultados da insulina mostraram que os animais do grupo diabético sem tratamento (D) apresentaram menor nível de insulina do que dos animais do grupo controle (C), conforme esperado. O tratamento com o extrato de carqueja não foi capaz de modular a secreção de insulina, visto que o nível de insulina dos animais diabéticos tratados foi semelhante ao do grupo de animais diabéticos sem tratamento.

Com o objetivo de avaliar as complicações causadas pelo diabetes, foram avaliados os marcadores bioquímicos de função lipídica, renal e hepática (**tabela 4**). Dentre estes parâmetros, apenas as concentrações de colesterol total e HDL não sofreram alterações nos animais diabéticos, levando a considerarmos que sete dias de diabetes são suficientes para alterar o metabolismo renal, hepático e de triacilgliceróis. Alterações nesses mesmos parâmetros foram observadas em outros experimentos com ratos diabéticos (ASHISH E SWAPNIL, 2011, RAHIMI *et al.*, 2011, SHAJEELA *et al.*, 2012, WABEL *et al.*, 2008).

É comum a evolução do diabetes não tratado o desenvolvimento de dislipidemias e doenças renais (SBD, 2009). O aumento da atividade das enzimas hepáticas ALT e AST nos animais diabéticos pode ser devido à uma resposta ao aloxano, onde há liberação das enzimas pelo fígado com consequente migração para a corrente sanguínea (STANLEY *et al.*, 2000).

O tratamento com a carqueja, de forma geral, não foi capaz de alterar os parâmetros séricos avaliados, exceto pela dosagem da creatinina, onde ratas diabéticas tratadas com a dose de 600 mg/kg apresentaram aumento significativo da concentração desta, em comparação às ratas diabéticas sem tratamento. Este mesmo resultado foi encontrado por PÁDUA (2010) que também observou aumento na concentração plasmática de creatinina em ratos tratados com dose de 600 mg/kg de extrato de *B. trimera*. A creatinina sérica é um excelente parâmetro para avaliar a função renal, pois qualquer condição que reduza a velocidade de filtração glomerular promove uma menor excreção urinária de creatinina, com consequente aumento na concentração plasmática (MOTTA, 2003).

Enquanto a insulina exógena e outros medicamentos podem controlar alguns aspectos do diabetes, complicações afetando o sistema vascular, rins e nervos periféricos são comuns e extremamente danosos em termo de longevidade e qualidade de vida. O fígado é o órgão chave na manutenção da homeostase sistêmica da glicose em mamíferos (ROLO e PALMEIRA, 2006). Este é o principal órgão envolvido em processos oxidativos e de detoxificação, em muitas doenças biomarcadores do estresse oxidativo estão elevados no fígado em estágios iniciais (STADLER *et al.* 2003).

Neste sentido, o nosso próximo passo foi avaliar os marcadores de estresse oxidativo, pela avaliação da peroxidação lipídica (dosagem de TBARS), e pela dosagem de proteína carbonilada no fígado. Com isso, buscamos verificar se ratas diabéticas por sete dias apresentavam quadro de estresse oxidativo evidenciado por esses marcadores, e se o tratamento com a carqueja seria capaz de exercer efeito sobre os possíveis danos gerados pelo estresse oxidativo.

A dosagem de TBARS é uma das mais utilizadas para detectar peroxidação lipídica (DALLE-DONE *et al.*, 2006). Sabe-se que o estado diabético faz com que haja uma maior peroxidação lipídica, ocasionada pela hiperglicemia e estresse oxidativo consequentes dessa condição patológica, entretanto, os nossos resultados não mostraram alteração deste biomarcador nos animais diabéticos sem tratamento quando comparados aos animais do grupo controle, permitindo-nos inferir que sete dias de tratamento pode não ter sido tempo suficiente para ser instalado o dano oxidativo. O tratamento com a carqueja minimizou os níveis de TBARS nos animais tratados com a dose de 1200 mg/kg.

Um estudo avaliando animais diabéticos por diferentes períodos de tempo observou que há aumento nos níveis de TBARS no fígado e pâncreas de animais diabéticos, de acordo com a progressão da doença, de forma que, com uma semana de diabetes é possível observar aumento da peroxidação lipídica, porém em menor intensidade (KAKKAR *et al.*, 1998). Segundo BUKAN *et al.* (2003), a severidade dos danos oxidativos causados pelo diabetes pode ter relação com o tempo de duração da doença. Um estudo avaliando o nível sérico de TBARS em humanos concluiu que indivíduos diabéticos apresentam maior nível de TBARS do que indivíduos saudáveis,

mas que nos pacientes diabéticos do tipo 1, essa diferença é menos significativa (GRIESMACHER *et al.*, 1994).

O método utilizado para avaliar a peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS inclui uma reação do ácido tiobarbitúrico com malondialdeído (MDA). Esta reação gera um produto cromatográfico estável que pode ser quantificado espectrofotometricamente ou por HPLC. Apesar de ser uma técnica simples, a quantificação de TBARS para avaliar o estresse oxidativo é pouco sensível, principalmente quando quantificado espectrofotometricamente. Apesar de ser bem aceito como método para avaliar estresse oxidativo, este método quantifica substâncias semelhantes ao MDA, mas não mede especificamente MDA ou peroxidação lipídica (DALLE-DONE *et al.*, 2006).

Desta forma, o fato de o grupo de animais diabéticos não apresentar diferença estatística com relação ao grupo controle se justifica por três hipóteses: o tempo do tratamento pode ter sido insuficiente, o diabetes tipo 1 pode normalmente apresentar menor peroxidação lipídica, ou a técnica utilizada pode não ter sido suficientemente sensível.

Além dos níveis de TBARS, os níveis de proteína carbonilada também são utilizados como marcadores bioquímicos para detectar a modificação oxidativa de resíduos de aminoácidos presentes em proteínas (BEAL, 2002). Cátions como Fe^{2+} e Cu^{2+} podem se ligar a locais de ligação de cátions nas proteínas, e assim permitir o ataque dessas proteínas por espécies reativas, como H_2O_2 ou O_2^- . Essas espécies transformam a cadeia de aminoácidos em carbonilas (LEVINE *et al.*, 1994). Mudanças oxidativas em proteínas essenciais podem resultar em perda de função. Os nossos resultados não apresentaram alterações nos níveis de proteínas carboniladas, nem provocadas pelo diabetes, e nem pelo tratamento com o extrato de *B. trimera*.

Como biomarcador de estresse oxidativo, a concentração de proteína carbonilada é significativamente maior em indivíduos diabéticos (DALLE-DONE, 2006). Entretanto, PORTERO-OTÍN *et al.* (1999) encontraram ratos diabéticos produzindo menos proteína carbonilada do que controles, e sugeriu que a diminuição ou não alteração de proteínas carboniladas em diabéticos pode refletir um aumento na atividade proteolítica em proteínas modificadas oxidativamente.

A associação entre estresse oxidativo e diabetes se dá por duas hipóteses: mostrando que as espécies reativas de oxigênio causam danos moleculares nos indivíduos diabéticos, ou que estes têm alteração nas defesas antioxidantes em relação aos indivíduos não diabéticos (WEST, 2000). Visto que não encontramos alterações nos marcadores de dano oxidativo (TBARS e proteína carbonilada), nosso próximo passo foi avaliar a atividade e expressão do RNAm das enzimas antioxidantes (SOD, catalase, GPx e GR), a fim de verificar se estas configuravam o quadro de estresse oxidativo.

A principal função da SOD é catalisar a conversão do $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 para reduzir seus efeitos tóxicos. Esta enzima pode ser classificada de acordo com a sua localização celular, como a Cu/Zn-SOD que está localizada no citoplasma e a Mn-SOD localizada na mitocôndria (FRIDOVICH, 1997). O H_2O_2 gerado pela SOD é neutralizado por enzimas como a catalase e GPx, evitando que seja formado o radical hidroxila.

A observação de que pacientes diabéticos apresentam menores níveis de defesas antioxidantes (enzimáticas ou não) é bem aceito como aumento de estresse oxidativo. O quadro de hiperglicemia pode fazer com que haja degradação das defesas antioxidantes enzimáticas, permitindo que as espécies reativas danifiquem outras enzimas ou estruturas celulares (WEST, 2000).

Alterações no balanço oxidante/antioxidante hepático podem afetar a translocação de fatores de transcrição sensíveis ao estado redox para o núcleo. Portanto a redução nos níveis de RNAm de enzimas antioxidantes no diabetes pode ser devido à oxidação de fatores de transcrição responsáveis pelo início do processo de transcrição das enzimas antioxidantes (SADI *et al.* 2008).

Nossos resultados, entretanto, mostraram que os animais do grupo diabético apresentaram maior atividade de SOD do que os animais do grupo controle, levando a considerarmos que está havendo uma elevada produção de H_2O_2 . WOHAIEB e GODIN (1987) encontraram maior atividade da enzima SOD em pâncreas de ratos diabéticos, e sugeriu ser uma resposta adaptativa do tecido em questão. A expressão do RNAm das frações desta enzima mostrou que a elevada atividade da SOD se deve à porção mitocondrial da mesma, devido à maior expressão de Mn-SOD nos animais diabéticos sem tratamento comparados aos animais controle. O tratamento com a carqueja

diminuiu a atividade de Mn-SOD nos grupos C600 e D1200. Já a Zn-SOD teve sua expressão diminuída no grupo diabético sem tratamento quando comparada ao grupo controle. GUERRA *et al.* (2011) em experimento com ratos diabéticos induzidos por STZ, verificaram diminuição na expressão de Zn-SOD e a expressão de Mn-SOD se manteve inalterada. Estes resultados também foram verificados por SADI e GURAY (2009), sugerindo que a Zn-SOD é mais sensível ao estresse oxidativo causado pelo diabetes.

Discrepâncias entre os biomarcadores de estresse oxidativo tem sido frequentemente relatadas, especialmente para a atividade de SOD, catalase e GPx em diferentes modelos experimentais de diabetes. O efeito do diabetes na atividade de SOD pode variar de acordo com o sexo, a espécie de animal, o tempo de diabetes ou o tecido estudado. As atividades das enzimas antioxidantes pode ser elevada, diminuída ou inalterada, dependendo do tipo de tecido ou células avaliados (MARITIM *et al.*, 2003).

A catalase, outra enzima antioxidante avaliada, exerce duas funções: uma delas é a decomposição do H_2O_2 para gerar água e oxigênio molecular e, a segunda, é a oxidação dos doadores de hidrogênio, como metanol, etanol, fenóis, a custa de um mol de peróxido (AEBI, 1984)

Os nossos resultados mostraram diminuição na atividade da catalase nos animais do grupo diabético sem tratamento comparado aos animais do grupo controle, assim como nos relatos de SHIM *et al.* (2008), MATSUNAMI *et al.* (2010) e TRIPATHI e CHANDRA (2010). A expressão do RNAm da catalase no entanto mostrou resultado oposto, ao se apresentar maior no grupo de animais diabéticos do que no controle. Os mesmos resultados foram observados por LIMAYE *et al.* (2003), que observaram um aumento na expressão gênica do RNAm para catalase no córtex renal de ratos diabéticos (induzido por STZ) em contraste com uma redução na atividade da enzima, sugerindo uma regulação pós-transcricional da expressão da catalase. O tratamento com o extrato de *B. trimera* na dose de 600 mg/kg mostrou diminuir a expressão do RNAm da catalase.

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) que exerce papel central na defesa antioxidante, destacando-se sua função como cofator da família

de enzimas glutathione peroxidases (GPx), em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a glutathione disulfeto (GSSG). A síntese “de novo” da glutathione ocorre principalmente no fígado (JEFFERIES *et al.*, 2003)

A enzima glutathione peroxidase catalisa a inativação do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos de lipídios, através da formação de uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de glutathione reduzida, formando a glutathione oxidada (HUBER *et al.*, 2008).

O nosso estudo mostrou diminuição na expressão e atividade da enzima GPx. Esses resultados corroboram com outros encontrados na literatura, como no estudo de GUERRA *et al.* (2011) em que ambos, expressão e atividade, estavam diminuídos em ratos diabéticos por 30 dias. SHIM *et al.* (2008) também encontraram menor atividade de GPx em fígado de ratos diabéticos, e SHAJEELA *et al.* (2012) encontraram menor atividade em eritrócitos de ratos diabéticos.

Os resultados das enzimas antioxidantes, se analisados concomitantemente, nos permite inferir que os animais diabéticos sem tratamento apresentaram elevada concentração de H₂O₂ hepático, visto que a elevada atividade da SOD faz com que haja grande produção desta ERO, e a baixa atividade da catalase e GPx faz com que essas defesas antioxidantes enzimáticas sejam insuficientes para neutralizar o H₂O₂ gerado.

Os níveis de glutathione reduzida e oxidada são mantidos pelas atividades das enzimas glutathione redutase que converte a glutathione oxidada a reduzida em presença de NADH, e glutathione peroxidase, enquanto atua como antioxidante. Quando em excesso, a glutathione oxidada é transportada para fora da célula para que seja mantida a homeostase, entretanto, quando acumulada no interior da célula, a glutathione oxidada gera estresse oxidativo e vários componentes celulares se tornam vulneráveis a dano pelas espécies reativas, especialmente membranas lipídicas, proteínas e DNA (SHAJEELA *et al.*, 2012, HUBER *et al.*, 2008).

Os resultados do nosso experimento mostraram aumento na concentração de glutathione reduzida, e diminuição na concentração de glutathione oxidada pelos animais diabéticos. Entretanto, verificamos ainda um aumento na atividade da glutathione redutase nos animais diabéticos, sendo esta enzima a possível responsável pelo baixo nível de glutathione oxidada nos animais diabéticos. WOHAIEB e GODIN (1987) também encontraram maior atividade de glutathione redutase em fígado de ratos diabéticos, e

BOHR et al. (2004) não encontraram alteração na atividade de GR entre animais controles e diabéticos.

Neste contexto, podemos sugerir que a glutathiona peroxidase, que está sendo expressa em pequena quantidade, não está neutralizando os hidroperóxidos gerados pela SOD, e nem convertendo grandes quantidades de glutathiona reduzida à oxidada. A glutathiona redutase por sua vez, está em elevada atividade na tentativa de manter a homeostase do organismo, evitando o acúmulo de glutathiona oxidada.

PÁDUA et al. (2010) verificou excelente efeito antioxidante do extrato hidroetanólico de *B. trimera* com tratamento *in vivo*, na dose de 600 mg/kg, no modelo experimental de inflamação induzida por paracetamol. Entretanto, o tratamento por sete dias com este mesmo extrato na mesma dose (600 mg/kg) ou ainda com uma dose superior (1200 mg/kg) não apresentou efeito na modulação do estresse oxidativo induzido pelo diabetes em ratas Fischer.

Embora o tratamento por sete dias com o extrato hidroetanólico de *B. trimera* não tenha sido eficaz nas doses testadas para o modelo experimental utilizado, o estudo nos permitiu sugerir um mapeamento das defesas antioxidantes para o modelo experimental de diabetes induzido por aloxano, visto que o nosso grupo de pesquisa ainda não havia realizado todas estas dosagens de enzimas antioxidantes na linhagem Fisher (**Figura 14**).

É importante ressaltarmos a relevância deste estudo no que se refere ao uso da carqueja como possível coadjuvante no tratamento do diabetes, visto que esta é popularmente utilizada para este fim, conforme descrito por TROJAN-RODRIGUES et al. (2012) e Feijó et al. (2012). No entanto, este é o primeiro estudo que realiza um mapeamento detalhado do efeito do extrato de *B. trimera* sobre os parâmetros bioquímicos e oxidativos no modelo experimental de diabetes tipo 1.

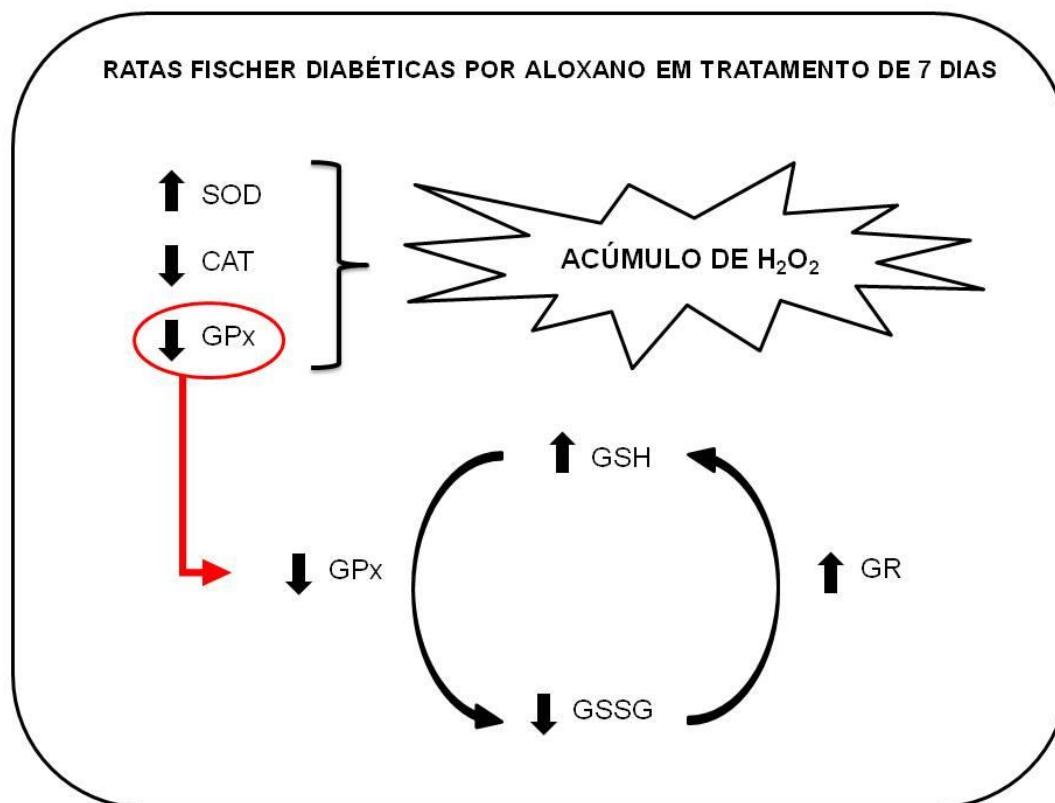


Figura 14: Mapeamento das defesas antioxidantes no modelo experimental utilizado.

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo comprovaram o potencial antioxidante *in vitro* do extrato hidroetanólico da *Baccharis trimera*, e confirmaram que este não apresenta evidência de toxicidade. No entanto, no modelo experimental utilizado, não foi verificado o potencial hipoglicemiante e nem antioxidante *in vivo* com as doses utilizadas.

Os animais diabéticos não apresentaram alterações nos biomarcadores de dano oxidativo hepático, mas as alterações das enzimas antioxidantes nos permitiu verificar o quadro de estresse oxidativo. Entretanto, o tratamento por sete dias em ratas Fischer diabéticas com as doses de 600 ou 1200 mg/kg do extrato obtido não foi eficaz para modular o estresse oxidativo nesses animais.

O estudo nos permitiu sugerir um mapeamento do status antioxidante no modelo experimental avaliado, no qual observa-se o aumento da atividade da enzima SOD, e diminuição da atividade das enzimas catalase e GPx. Mais estudos devem ser realizados para confirmar este perfil antioxidante enzimático em ratas diabéticas.

Por ser o primeiro estudo avaliando o uso da *Baccharis trimera* como coadjuvante no tratamento do diabetes, deve-se recomendar cautela no uso desta planta em função dos resultados obtidos.

8. REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc* (vii): 76-96. 2007.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology*. 105: 121-106.1984.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 33(1): s62-s69. 2010.
- ASHISH, B.; SWAPNIL, G. Hypoglycemic Effect of Polyherbal Formulation in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Pharmacologyonline*. 3: 764-773. 2011
- AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 52(3). 2000.
- BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 40: 405-412, 1991.
- BEAL, M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med*. 32: 797-803. 2002.
- BHOR, V. M.; RAGHURAM, N.; SIVAKAMI, S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36: 89–97, 2004.
- BORGES, K. B.; BAUTISTA, H. B.; GUILERA, S. Diabetes – Utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. *Revista Eletrônica de Farmácia*. V(2): 12 - 20, 2008.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 28 (1): 25-30. 1995.
- BRASIL. *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira*. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), 2011. 126p.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414: 813-820. 2001.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 52: 302-310. 1978.

- BUKAN, N.; SANACK, B.; YAVUZ, O.; KOCA, C.; TUTKUN, F.; ÖZÇELİKAY, A. T.; ALTAN, N. Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 40: 447-450, 2003.
- CECÍLIO A. B.; RESENDE, L. B.; COSTA, A. C.; COTTA, M. M.; GIACOMINI, L. F.; GOMES, L. C.; SILVA, L. A.; VAZ, C. P. O.; OLIVEIRA, F. Q. Espécies vegetais indicadas no tratamento de diabetes. *Revista Eletrônica de Farmácia*. V(3): 23-27, 2008.
- CHENG W.; Fu Y. X.; PORRES J. M.; ROSS D. A.; LEI X. G. Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein. *FASEB J*. 13: 1467-75, 1999.
- COELHO, M. G. P.; REIS, P. A.; GAVA, V. B.; MARQUES, P. R.; GAYER, C. R.; LARANJA, G. A. T.; FELZENSWALB, I.; SABINO, K. C. C. Anti-arthritis effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. *Toxicology Letters*. 154: 69–80, 2004.
- DALLE-DONE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D. MILZANI, A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry*. 52(4): 601-623. 2006
- DIAS, L. F. T. *et al.* Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19(1B): 309-314. 2009.
- ETUK, E. U. Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric. Biol. J. N. Am.* 1(2): 130-134, 2010.
- FEIJÓ, A.M.; BUENO, M.E.N.; CEOLIN, T.; LINCK, C.L.; SCHWARTZ, E.; LANGE, C.; MEINCKE, S.M.K.; HECK, R.M.; BARBIERI, R.L.; HEIDEN, G. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de *Diabetes mellitus* no tratamento dos sintomas da doença. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 14(1): 50-56, 2012.
- FIGUEIREDO, A. P.; PEREIRA, R. S. Estudo dos efeitos de cápsulas de carqueja (*Baccharis trimera* (less) d.c.), sobre o metabolismo lipídico de pacientes em processo de emagrecimento. *Revista Online Conexão Ciência*. 4(1), 2009.
- FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 18515- 18517, 1997.
- GENÉ, R. M.; CARTANA, C.; RARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. *Planta Medica*. 62: 232-235, 1996.
- GRANCE, S. R. M.; TEIXEIRA, M. A.; LEITE, R. S.; GUIMARÃES, E. B; SIQUEIRA, J. M.; FILIU, W. F. O.; VASCONCELOS, S. B. S.; VIEIRA, M. C. *Baccharis trimera*: Effect

on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 117: 28-33, 2008.

GRIESMACHER, A.; KINDHAUSER, M.; ANDERT, S. E.; SCHREINER, W.; TOMA, C.; KNOEBL, P.; PIETSCHMANN, P.; PRAGER, R.; SCHNACK, C.; SCHEMTHANER, G.; MUELLER, M. M. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine*. 98(5):469-475, 1994.

GUERRA, J. F. C., MAGALHÃES, C. L.B., COSTA, D. C., SILVA, M. E., PEDROSA, M. L. Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. *J Clin Biochem Nutr*. 49(3): 188-194, 2011.

HADDAD J. J.; HARB H. L. L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Mol.Immunol*. 42: 987-1014, 2005.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Reactive species and disease: fact, fiction or filibuster? In: _____ *Free radicals in biology and medicine*. 4. ed. New York: Oxford, 2007. Capítulo 9. p. 508-514.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P; FATIMA, A. GLutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quimica Nova*. 31(5): 1170-1179, 2008.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). Diabetes Atlas 5th edition. 2011. Disponível em: <<http://www.idf.org/media-events/press-releases/2011/diabetes-atlas-5th-edition>>. Acesso em: 15 de novembro de 2011.

JEFFERIES H., COSTER J., KHALIL A., BOT J., MCCAULEY R. D.; HALL J. C. Glutathione. *ANZ.J.Surg*. 73: 517-22, 2003

JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. K.; RYCHLY, D.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*. 4(5): 1-11. 2005.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8(9/10): 1865-1879. 2006

JORDÃO Jr., A. A., CHIARELLO, P. G., BERNARDES, M. S. M., VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto*, 31, 434-449, 1998.

KAKKAR, R.; MANTHA, S. V.; RADHI, J.; PRASAD, K.; KARLA, J. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clinical Science*. 94: 623-632, 1998.

- KAPPEL, V. D.; PEREIRA, D. F.; CAZAROLLI, L. H.; GUESSER, S. M.; SILVA, C. H. B.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; SILVA, F. R. M. B. Short and Long-Term Effects of *Baccharis articulata* on Glucose Homeostasis. *Molecules*.17: 6754-6768, 2012.
- LEVINE; R. L., WILLIAMS; J. A., STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 233: 346-357. 1994.
- LIMAYE P. V., RAGHURAM N.; SIVAKAMI S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol.Cell Biochem*. 243: 147-52, 2003.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275. 1951.
- MANGIATERRA, P. A.; Evaluación de parâmetros botânicos y fitoquímicos para El control de calidad de carqueja. Buenos Aires, Argentina: Universidade de Belgrano. 43p. 2005.
- MARITIM, A.C., SANDERS, R.A., WATKINS III, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*, 17, 24–38, 2003.
- MARKLUND, S. L., HOLME, E., HELLNER, L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clim Chim Acta*, 126, 41-51, 1982.
- MATSUNAMI, T., SATO, Y., SATO, T., ARIGA, S., SHIMOMURA, T., YUKAWA, M. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int J Clin Exp Pathol*, 3, 177-188, 2010.
- MAZZANTI, C. M., SCHOSSLER, D. R., FILAPPI, A., PRESTES, D., BALZ, D., MIRON, V., MORSCH, A., SCHETINGER, M. R. C., MORSCH, V. M., CECIM, M. Extrato da casca de *Syzyium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. *Cienc Rural*, 33, 6, 1061-1065, 2003.
- MENDES, F. R.; TABACH, R.; CARLINI, E. A. Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activity. *Phytotherapy Research*. 21(6): 517–522, 2007.
- MEYER, B. N. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*. 45: 31-34. 1982.
- MORAIS, S. M. *et al.* Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19(1B): 315-320. 2009.

- MOTTA, V. T. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. Caxias do Sul: Editora Médica Missau. p. 419. 2003.
- NAUDI, A. *et al.* Cellular Dysfunction in Diabetes as Maladaptive Response to Mitochondrial Oxidative Stress. *Experimental Diabetes Research*. 2012: 1-14. 2011.
- NISHIKAWA, Y., EDELSTEIN, D., DU, X. L., YAMAGISHI, S., MATSUMURAI, T., KANEDA, Y., YOREK, M. A., BEEBE, D., OATES, P. J., HAMMES, H. P., GIARDINO, I., BROWNLEE, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404, 787-790, 2000.
- NOGUEIRA-MACHADO, J. A., PURISH, S., MATTOS, R. T., VELOSO, C. A., REIS, J. S. Estresse oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 52, 1096-1105, 2008.
- OLIVEIRA, A. C. P.; ENDRINGER, D. C.; AMORIM, L. A. S.; BRANDÃO, M. G. L. COELHO, M. M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 102: 465-469. 2005.
- OLIVEIRA, C. B.; COMUNELLO, L. N.; LUNARDELLI, A.; AMARAL, R. H.; PIRES, M. G.; SILVA, G. L.; MANFREDINI, G.; VARGAS, C. R.; GNOATTO, S. C. B.; OLIVEIRA, J. R.; GOSMANN, G. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. *Molecules*. 17: 1113-1123. 2012
- PÁDUA, B. C.; SILVA, L. D.; ROSSONI-JUNIOR J. V.; HUMBERTO, J. L.; CHAVES, M. M.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; COSTA, D. C. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 129: 381-386. 2010.
- PÁDUA, B. C. Efeito antioxidante do extrato hidroalcoólico de *Baccharis trimera*: uma avaliação *in vitro* e *in vivo*. Ouro Preto: 2010. Disponível em: <http://www.tede.ufop.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=484> . Acesso em 24 de janeiro de 2013.
- PAUL, E. L.; LUNARDELLI, A.; CABERLON, E.; OLIVEIRA, C. B.; SANTOS, R. C. V.; BIOLCHI, V.; BASTOS, C. M. A.; MOREIRA, K. B.; NUNES, F. B.; GOSMANN, G.; OLIVEIRA, J. R. Anti-inflammatory and Immunomodulatory Effects of *Baccharis trimera* Aqueous Extract on Induced Pleurisy in Rats and Lymphoproliferation In Vitro. *Inflammation*. 32(6): 419-425. 2009.
- PERCIVAL, M. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*. 10, 1998.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63(7): 1035-1042. 2000.

- PORTERO-OTÍN, M.; PAMPLONA, R.; RUIZ, M. C.; CABISCOL, E.; PRAT, J.; BELLMUNT, M. J. Diabetes Induces an Impairment in the Proteolytic Activity Against Oxidized Proteins and a Heterogeneous Effect in Nonenzymatic Protein Modifications in the Cytosol of Rat Liver and Kidney. *Diabetes*, 48: 2215–2220, 1999
- RAHIMI, P; KABIRI, N.; ASGARY, S.; SETORKI, M. Anti-diabetic effects of walnut oil on alloxan-induced diabetic rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 5(24): 2655-2661, 2011.
- RAINS, J. L.; JAIN, S. K.; Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*. 50: 567-575. 2011.
- RAVI, K., RAMACHANDRAN, B., SUBRAMANIAN, S. Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences*, 75, 2717-31, 2004.
- RODRIGUES, C. R. F.; DIAS, J. H.; MELLO, R. N.; RICHTER, M. F.; PICADA, J. N.; FERRAS, A. B. F.; Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 125(1): 97-101, 2009.
- ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 212: 167-178, 2006.
- ROSSONI-JUNIOR, J. V.; ARAÚJO, G. R.; PÁDUA, B. C.; CHAVES, M. M.; PEDROSA, M. L.; SILVA, M. E.; COSTA, D. C. Annato extract and β -carotene modulate the production of reactive oxygen species/nitric oxide in neutrophils from diabetic rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 50(3):177-183, 2012.
- RUIZ, A. L. T. G.; TAFFARELLO, D.; SOUZA, V. H. S.; CARVALHO, J. E. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(2): 295-300, 2008.
- SADI G., YILMAZ O.; GURAY T. Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. *Mol.Cell Biochem*. 309: 109-16, 2008.
- SADI G.; GURAY T. Gene expressions of Mn-SOD and GPx-1 in streptozotocin-induced diabetes: effect of antioxidants. *Mol.Cell Biochem*. 327: 127-34, 2009.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009. São Paulo: 2009
- SHAJEELA, P. S.; KALPANADEV, V.; MOHAN, V. R. Potential antidiabetic, hypolipidaemic and antioxidant effects of *Nymphaea pubescens* extract in alloxan induced diabetic rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2(02): 83-88, 2012.

- SHIM, J.; KIM, Y. J.; LEE, H. Effects of soybean isoflavone extract on the plasma lipid profiles and antioxidant enzyme activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition Research and Practice*. 2(4): 218-226, 2008.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. 215(2): 213-219. 1993
- SLATER, T. F. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J*. 222: 1-15, 1984.
- SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-Jr, V. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. 30(2): 351-355. 2007.
- SOUZA, S. P., PEREIRA, L. L. S.; SOUZA, A. A.; SANTOS, C. D. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera*: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 21(3): 450-455. 2011.
- STADLER K., JENEI V., VON B. G., SOMOGYI A.; JAKUS J. Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes. *Free Radic.Biol.Med*. 35: 1240-51, 2003.
- STANLEY, P.; PRINCE, M.; MENON, V. P. Hypoglycaemic and other related actions of *Tinospora cordifolia* roots in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 70(1): 9-15, 2000.
- STEGELMEIER, B. L.; SANI, Y.; PFISTER, J. A. *Baccharis Pteronioides* Toxicity in Livestock and Hamsters. *J Vet Diagn Invest*. 21:208–213, 2009.
- SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in β -Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res*. 50: 536-546, 2001.
- TANG, V.; WANG, J. Oxidative Stress in Bipolar Disorder. *Biochemistry e Analytical biochemistry*. doi:10.4172/2161-1009.S2-002, 2012.
- TIGANIS, T. Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad and the ugly. *Trends in Pharmacological Sciences*. 32(2): 82-89. 2011
- TRIPATHI, U. N.; CHANDRA, D. Anti-hyperglycemic and anti-oxidative effect of aqueous extract of *Momordica charantia* pulp and *Trigonella foenum graecum* seed in alloxan-induced diabetic rats. *Indian Journal of Biochemistry e Biophysics*. 47: 227-233, 2010.
- TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T. L. S.; SOARES, G. L. G. RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 139: 155-163. 2012.

- VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry e cell biology*. 39: 44-84. 2007.
- VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*. 28(1): 85-94. 2005.
- VIEIRA, T. O. *et al.* Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 21(4): 601-607. 2011.
- VINCENT, A. M. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*. 25(4):612–628. 2004.
- WABEL, N. A.; MOUSA, H. M.; OMER, O. H.; ABDEL-SALAM, A. M. Biological evaluation of aqueous herbal extracts and stirred yoghurt filtrate mixture against alloxan-induced oxidative stress and diabetes in rats. *International Journal of Pharmacology*. 4(2): 135-139, 2008.
- WEST, I. C. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine*. 17: 171-180, 2000.
- WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C.; AVANCINI, C. A. M.; GONÇALVES, A. R. Inibição e inativação *in vitro* de *Salmonella* spp. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 61(1): 119-127, 2009.
- WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A., SICREE, R., KING, H. Global prevalence of diabetes. Estimates for theyear 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27 5, 1047-53, 2004.
- WOHAIEB, S. A.; GODIN, D. V. Alterations in Free Radical Tissue-Defense Mechanisms in Streptozocin-Induced Diabetes in Rat: Effects of Insulin Treatment. *Diabetes*. 36:1014-18, 1987.
- XIONG, Q, XIE, P., LI, H., HAO, L., LI, G., QIU, T., LIU, Y. Acute effects of microcystins exposure on the transcription of antioxidant enzyme genes in three organs (liver, kidney, and testis) of male Wistar rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 24, 361–367, 2010.

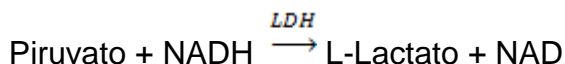
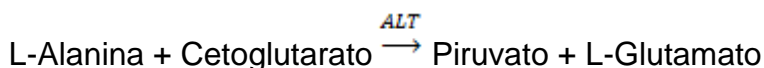
9. ANEXO

ANEXO 1 – PROTOCOLOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS

- **Alanina Aminotransferase**

Princípio

A ALT catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A consequente redução da absorvância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8 °C e por 2 semanas a 10 °C negativos.

Produto Utilizado

ALT/GPT Liquiform, Catálogo 74-4/30 - ANVISA - 10009010029

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente de Trabalho: O conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 - 25 °C e 14 dias entre 2 – 8°C. Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Alanina 500 mmol/L, 2-cetoglutarato 15 mmol/L, NADH 180

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostatizada a 37 °C capaz de medir a absorvância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostatizada a 37°C com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do Reagente de Trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostatizada a 37 °C.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

Cálculos

Calcular a média das diferenças de absorvância por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$) e utilizar para calcular o resultado.

ALT/GPT (U/L) 340 nm = $\Delta A/\text{minuto} \times 1746$

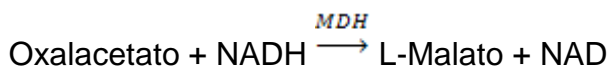
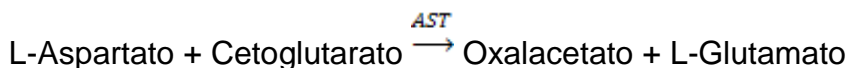
Conversão: Unidades Convencionais (U/L) $\times 16,7$ = Unidades SI (nkat/L).

- **Aspartato Aminotransferase**

Princípio

A AST catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetogluturato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD.

A conseqüente redução da absorbância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8°C e por 2 semanas a 10°C negativos.

Produto Utilizado

AST/GOT Liquiform, Catálogo 75-4/30 - ANVISA - 10009010018

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente de Trabalho: o conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 – 25°C e por 14 dias entre 2 – 8°C; Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Aspartato 240 mmol/L, 2-cetogluturato 12 mmol/L, NADH 180 µmol/L, LDH ≥900 U/L, MDH ≥600 U/L e azida sódica 14,6 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostaticada a 37 °C capaz de medir a absorbância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostaticada a 37°C com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do reagente de trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostaticada a 37 °C.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

Cálculos

Calcular a média das diferenças de absorvância por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$) e utilizar para calcular o resultado.

AST/GOT (U/L) 340 nm = $\Delta A/\text{minuto} \times 1746$

Conversão: Unidades Convencionais (U/L) $\times 16,7$ = Unidades SI (nkat/L).

- **Colesterol HDL**

Princípio

As lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é determinado no sobrenadante.

Amostra

O jejum não é imprescindível para a dosagem de colesterol HDL. Usar soro. O analito é estável por 3 dias entre 2 – 8°C.

Produto Utilizado

Colesterol HDL, Catálogo 13 - ANVISA – 10009010026

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Precipitante: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L.

Padrão - 20 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8°C. Armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Equipamentos

1. Centrífuga para tubos.
2. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm).
3. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
4. Pipetas para medir amostras e reagentes.
5. Cronômetro.

Procedimento

Precipitação das VLDL e LDL

Em um tubo 12 x 75 colocar 0,25mL de soro e 0,25mL de precipitante. Agitar vigorosamente durante 30 segundos. A agitação sugerida é fundamental para obtenção de resultados consistentes. Centrifugar a 3.500 rpm por pelo menos 15 minutos para obter um sobrenadante límpido. Pipetar o sobrenadante límpido imediatamente após a centrifugação, tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado, a fim de evitar resultados falsamente elevados.

Utilizar com o Reagente 1 - Colesterol Liquiform Labtest Cat. 76. Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Sobrenadante	-----	0,1 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,1 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar no banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 540 nm) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

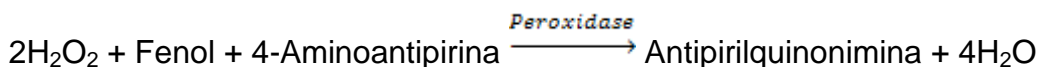
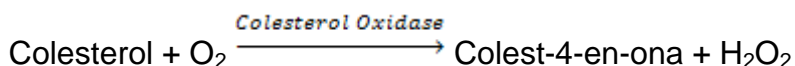
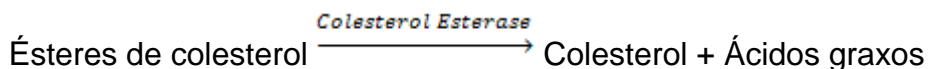
$$\text{HDL mg/dL} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 40$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026

- **Colesterol Total**

Princípio

O colesterol total é determinado de acordo com as seguintes reações:



A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra.

Amostra

O jejum não é imprescindível para a dosagem de colesterol total. Usar soro. Anticoagulantes como citrato, oxalato ou EDTA produzem resultados falsamente diminuídos. O analito é estável por 7 dias entre 2 – 8 °C e vários meses a 10 °C negativos.

Produto Utilizado

Colesterol Liquiform, Catálogo 76-2/100 - ANVISA - 10009010068

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém tampão 50 mmol, pH 7,0, fenol 24,0 mmol/L, colato de sódio 500 µmol/L, azida sódica 15 mmol/L, 4 aminoantipirina 500 µmol/L, colesterol esterase ≥250 U/L, colesterol oxidase ≥250 U/L e peroxidase ≥1000 U/L.

Padrão 200 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8°C. Após o manuseio armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém azida sódica 15 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar em banho-maria 37 °C 10 minutos. O nível de água no banho deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

$$\text{Colesterol mg/dL} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 200$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026

- **Creatinina**

Princípio

O método se baseia na observação de que a reação da creatinina com o picrato alcalino é muito rápida, enquanto a reação do picrato com os cromogênios é mais lenta. A medida da reação nos primeiros minutos permite a determinação da creatinina verdadeira.

A creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente.

Creatinina + Ácido Pícrico → Picrato de Creatinina

Amostra

Para creatinina sérica recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Soro ou plasma (heparina, EDTA, fluoreto, oxalato, citrato). O anticoagulante Glistab (Labtest Cat. 29) permite a colheita de uma só amostra para as dosagens de creatinina, glicose e uréia. O analito é estável por 7 dias entre 2 – 8°C.

Produto Utilizado

Creatinina K, Catálogo 96 - ANVISA - 10009010143

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

NaOH: Armazenar entre 15 – 30°C. Contém hidróxido de sódio 200 mmol/L.

Ácido Pícrico: Armazenar entre 15 – 30°C. Contém ácido pícrico 22,2 mmol/L.

Padrão - 4,0 mg/dL: Armazenar entre 2 – 30°C. Após o manuseio, sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Ferricianeto: Armazenar entre 15 – 30 °C. Contém ferricianeto de potássio 11 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostatizada capaz de medir com exatidão a absorvância em 510 nm.
2. Pipetas para medir amostras e reagente.
3. Cronômetro.

Procedimento

Preparo do picrato alcalino: Misturar 4 volumes de NaOH (nº 1) com 1 volume de Ácido Pírico (nº 2). Estável 15 dias entre 2 - 8 °C. O CO₂ atmosférico altera significativamente a estabilidade do NaOH (No. 1) e do Picrato Alcalino, quando os reagentes são mantidos em recipientes abertos. A modificação da estabilidade é influenciada pelo tempo de exposição e condições ambientais. Sugerimos manter na bandeja do analisador somente o volume suficiente para a realização de uma corrida analítica ou usar as informações do controle da qualidade como indicador da necessidade de realizar nova calibração.

Procedimento: Ajustar o fotômetro a zero em 510 nm com água destilada. Adicionar 0,1 mL de padrão, soro, plasma ou urina diluída a 1,0 mL do Picrato Alcalino. Misturar e aspirar imediatamente para a cubeta. Disparar um cronômetro e medir as absorvâncias aos 30 e 90 segundos.

Cálculos

ΔA do Teste ou Padrão = Abs 90 segundos – Abs 30 segundos

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = \frac{\Delta \text{ Absorbância do Teste}}{\Delta \text{ Absorbância do padrão}} \times 4$$

- **Glicose**

Princípio

A glicose oxidase catalisa a oxidação da Glicose a Ácido Glucônico e Peróxido de Hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar plasma ou soro. Realizar a colheita do sangue utilizando um anticoagulante contendo um inibidor da glicólise. O uso do

anticoagulante Glistab (Labtest cat. 29) permite a colheita de uma só amostra para as dosagens de creatinina, glicose e uréia. As amostras de sangue não contendo antiglicolítico devem ser centrifugadas imediatamente após a colheita e o plasma ou soro separados das células ou coágulo.

O analito é estável por 8 horas em amostras colhidas com antiglicolítico. No plasma, soro e outros líquidos separados das células, a glicose permanece estável por 3 dias entre 2 – 8°C, quando não ocorre contaminação bacteriana.

Produto Utilizado

Glicose PAP Liquiform, Catálogo 84-2/250, 84-2/500 -ANVISA - 10009010003

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém tampão 50 mmol/L; pH 7,5; glicose oxidase ≥ 11.000 U/L; peroxidase ≥ 700 U/L; 4-aminoantipirina ≥ 290 μ mol/L; fenol ≥ 1 mmol/L e azida sódica 7,5 mmol/L.

Padrão - 100 mg/dL: Armazenar entre 2 – 30°C. Após o manuseio, sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém glicose 100 mg/dL e biocida não tóxico. O estabilizador do padrão pode precipitar-se em baixas temperaturas, fato que não interfere na sua qualidade.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância em 505 nm ou filtro verde (490 a 540 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.
- 5.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar vigorosamente e colocar em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 540 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

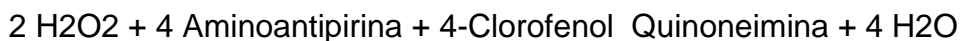
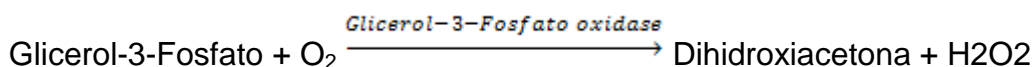
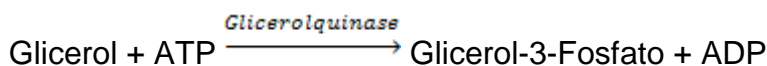
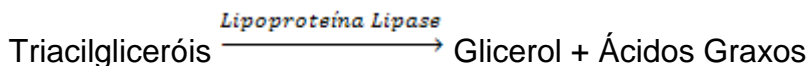
$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$$

Conversão de mg/dL para unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,0556

- **Tricilgliceróis**

Princípio

Os triacilglicerós são determinados de acordo com as seguintes reações:



A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de triacilgliceróis na amostra.

Amostra

Jejum de 12 a 14 horas. Usar soro ou plasma com EDTA. O analito é estável por dois dias entre 2 – 8°C. Armazenamento prolongado da amostra não é recomendado, porque várias substâncias podem ser hidrolizadas liberando glicerol, levando à obtenção de resultados falsamente elevados. A heparina promove a ativação in vivo ou

in vitro da lipase da lipoproteína, fazendo com que a concentração dos triacilgliceróis se reduza gradativamente em amostras contendo heparina.

Produto Utilizado

Triacilgliceróis Liquiform, Catálogo 87 - ANVISA - 10009010070

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C. Contem tampão 50 mmol/L, pH 6,9; acetato de magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 5 mmol/L; 4-aminoantipirina 300 µmol/L ATP 1,0 mmol/L; lipase da lipoproteína ≥ 1400 U/L; glicerolquinase ≥ 1000 U/L e azida sódica 7 mmol/L.

Padrão - 200 mg/dL - Armazenar entre 2 - 30 °C. Contém triacilgliceróis 200 mg/dL e azida sódica 7 mmol/L. Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado, para evitar evaporação.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância em 505 nm ou filtro verde (490 a 520nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37°C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1 (nº 1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar no banho-maria 37 °C por 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 520 nm) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

$$\text{Triacilgliceróis (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,0113

- **Uréia**

Princípio

A uréia é hidrolisada pela urease a íons amônia e CO₂. Os íons amônia reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol. A formação de cor é proporcional à quantidade de uréia na amostra.

Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (fluoreto, heparina, EDTA) e urina. Não usar anticoagulantes contendo amônia. A concentração de fluoreto na amostra não deve ser maior que 3 mg/mL, pois o fluoreto em altas doses é inibidor da urease. O uso do anticoagulante Glistab (Labtest Cat. 29) permite a colheita de uma só amostra para as dosagens de uréia, glicose e creatinina. O analito é estável no soro ou plasma por 12 horas entre 15 – 25°C, por 3 dias entre 2 – 8°C e 3 meses a 20°C negativos.

Produto Utilizado

Uréia CE, Catálogo 27 - ANVISA - 10009010011

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Urease: Armazenar entre 2- 8°C. Contém tampão fosfato 10 mmol/L, EDTA 6 mmol/L e urease 268 KU/L.

Tampão (Estoque): Armazenar entre 2- 8°C. Contém tampão fosfato 100 mmol/L pH 6,9, salicilato de sódio 312 mmol/L, nitroprussiato de sódio 16,8 mmol/L.

Oxidante (Estoque): Armazenar entre 2- 8°C. Contém hidróxido de sódio 2,8 mol/L e hipoclorito de sódio 121 mmol/L.

Padrão - 70 mg/dl: Armazenar entre 2- 8°C bem vedado para evitar evaporação. Contém azida sódica 7,7 mmol/L.

Preparo do Tampão de Uso: Adicionar o conteúdo do frasco de tampão (100 mL) a 400 mL de água destilada ou deionizada e misturar. Estável 12 meses em frasco âmbar, entre 2 – 8°C.

Preparo do Oxidante de Uso: Adicionar o conteúdo do frasco de oxidante (25 mL) a 475 mL de água destilada ou deionizada e misturar. Estável 12 meses em frasco plástico, entre 2 e 8°C.

Preparo da Urease Tamponada: Adicionar 1,0 mL de urease a 20 mL do Tampão de Uso. Estável 21 dias em frasco de vidro âmbar, entre 2 – 8°C.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância em 600 nm (580 a 610 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Urease tamponada	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e incubar a 37 °C durante 5 minutos e adicionar 1,0mL de oxidante de uso em todos os tubos. Misturar e incubar a 37 °C durante 5 minutos. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 600 nm (580 a 610 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 2 horas.

Cálculos

$$\text{Uréia (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 200$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/ dL x 0,166