



Universidade Federal do Pampa

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

**Efeitos do chá de *Bauhinia forficata* (subsp. *pruinosa*) sobre o dano oxidativo induzido por altas concentrações de glicose em eritrócitos humanos e por estreptozotocina em camundongos**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Andréia Caroline Fernandes Salgueiro

Uruguaiana, RS, Brasil

2013

Efeitos do chá de *Bauhinia forficata* (subsp. *pruinosa*) sobre o dano oxidativo induzido por altas concentrações de glicose em eritrócitos humanos e por estreptozotocina em camundongos

Por

Andréia Caroline Fernandes Salgueiro

Dissertação apresentada como exigência parcial para obtenção de grau de **Mestra em Bioquímica**, pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orione Puntel

Uruguaiana, RS, Brasil.

2013

Universidade Federal do Pampa/ UNIPAMPA  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado,  
**Efeitos do chá de *Bauhinia forficata* (subsp. *Pruinosa*) sobre o dano oxidativo  
induzido por altas concentrações de glicose em eritrócitos humanos e por  
estreptozotocina em camundongos**

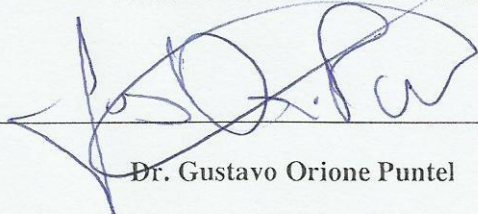
Elaborada por

**Andréia Caroline Fernandes Salgueiro**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

**Mestra em Bioquímica**

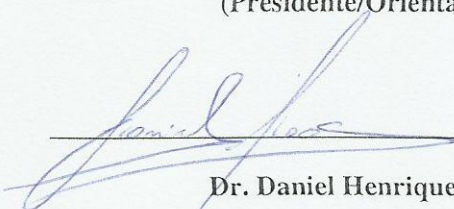
**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

**Dr. Gustavo Orione Puntel**

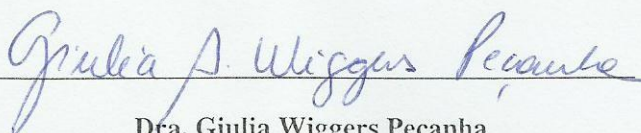
(Presidente/Orientador)



---

**Dr. Daniel Henrique Roos**

(UFSM)



---

**Dra. Giulia Wiggers Peçanha**

(UNIPAMPA)

Uruguaiana, 25 de janeiro de 2013.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha querida mãe Eloíza por seu incentivo permanente, e ao meu pai de criação e coração Paulo Timm por ser um exemplo de dedicação ao trabalho e aos estudos.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pampa pela oportunidade oferecida de realizar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Gustavo Orione Puntel, pela confiança, paciência e orientação ao longo deste trabalho.

Ao professor Vanderlei Folmer pela paciência, incentivo e orientação ao longo de toda minha formação acadêmica.

Aos professores Robson L. Puntel e Daiana Ávila pelo incentivo e orientação no decorrer deste trabalho.

Aos alunos de graduação Carina Q. Leal, Matheus C. Bianchini e Ianeli O. Prado por toda ajuda na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório 403, em especial, à Tatiana Tamborena.

Aos membros da banca professora Giulia Wiggers Peçanha, que tem acompanhado minha formação desde a graduação e Daniel Ross, por ter aceitado deslocar-se até Uruguaiana para avaliar este trabalho.

Ao professor Rodrigo Balk, que acompanha meu trabalho desde os semestres iniciais da graduação e que aceitou ser o avaliador suplente deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| APRESENTAÇÃO .....   | 17  |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 18  |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 21  |
| 2.1. <i>Diabetes mellitus</i> (DM).....                                      | 21  |
| 2.1.1. Modelos experimentais de hiperglicemia .....                          | 22  |
| 2.2. Estresse oxidativo .....  | 24  |
| 2.2.1 – Mecanismos de dano oxidativo relacionados ao DM.....                 | 25  |
| 2.2.1.1 - Auto-oxidação da glicose .....                                     | 25  |
| 2.2.1.2 - Glicação não enzimática .....                                      | 26  |
| 2.2.1.3 - Ativação da via dos poliois .....                                  | 26  |
| 2.2.2 Marcadores de dano oxidativo .....                                     | 29  |
| 2.2.3. Sistemas de defesa antioxidante.....                                  | 30  |
| 2.2.3.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos .....                            | 30  |
| 2.2.3.2. Sistemas antioxidantes não enzimáticos .....                        | 31  |
| 2.3. Plantas medicinais e DM .....   | 31  |
| 3. JUSTIFICATIVA .....   | 33  |
| 4. OBJETIVOS .....   | 34  |
| 4.1. Objetivo Geral .....  | 34  |
| 4.2. Objetivos Específicos .....   | 34  |
| 5. RESULTADOS .....  | 36  |
| 5.1. MANUSCRITO CIENTÍFICO 1 .....   | 36  |
| 5.2. MANUSCRITO CIENTÍFICO 2 .....   | 65  |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 91  |
| 7. CONCLUSÕES .....  | 94  |
| 8. PERSPECTIVAS .....  | 95  |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 96  |
| ANEXO I: Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA..... | 104 |

|   |     |
|---|-----|
| ANEXO II: Figura resumo dos resultados do Manuscrito 1 .....  | 105 |
| ANEXO III: Figura resumo dos resultados do Manuscrito 2 ..... | 106 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido ascórbico

AGEs – Advanced glycation end products

$\delta$ -ALA-D – Delta-aminolevulinato desidratase

BF – *Bauhinia forficata*

CAT – Catalase

DCFA-DA – Diclorofluoresceína-diacetato

DCF-RS – Diclorofluoresceína oxidada por espécies reativas

DM – *Diabetes mellitus*

DPPH<sup>•</sup> - Radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

EO – Estresse oxidativo

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ETZ - Estreptozotocina

GLUT – *Glucose transporter*

GSH – Glutathiona reduzida

HOCl - Ácido hipocloroso

HO<sub>2</sub><sup>•</sup> - Radical hidroperoxil

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

MDA – Malondialdeído

NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada reduzida

NPSH – Grupos –SH não proteícos



$\text{OH}\cdot$  – Radical hidroxila

$\text{O}_2\cdot^-$  – Radical ânion superóxido

PL – Peroxidação lipídica

$\text{RO}\cdot$  - Radical alcoxil

$\text{RO}_2\cdot$  - Radical peroxil

SOD – Superóxido dismutase

STZ - Streptozotocin

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

- SH – Grupos tióis

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Identificação dos constituintes químicos no extrato de folhas da <i>B. forficata</i><br>Link subsp. <i>pruinosa</i> ..... | 47 |
|--|----|

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Resumo dos principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento do estresse oxidativo no DM..... | 28 |
|--|----|

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura resumo dos resultados do Manuscrito 1</b> ..... | 105 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura resumo dos resultados do Manuscrito 2</b> ..... | 106 |
|---|-----|

### MANUSCRITO 1

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1:</b> Total phenolic (A) and flavonoids (B) contents of the BF tea ..... | 48 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 2:</b> Analysis of reduced iron chelation (A) and DPPH <sup>•</sup> radical scavenging (B) properties of the BF tea ..... | 49 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 3:</b> Analysis of TBARS in lipids extracted from chicken egg yolk (A) and deoxyribose degradation (B) ..... | 50 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 4:</b> Evaluation of the lipid peroxidation in human erythrocytes incubated for 24 hours (A) or 48 hours (B) with different concentrations of glucose and/or the BF tea. . | 52 |
|--|----|

**Figure 5:** Evaluation of the levels of NPSH in human erythrocytes incubated for 24 hours (A) or 48 hours (B) with different concentrations of glucose and/or the BF tea. . 54

## MANUSCRITO 2

**Figure 1:** Analysis of the body weight gain (A), food (B) and liquid (C) intake ..... 83

**Figure 2:** Analysis of blood glucose (A), total cholesterol (B) and triglycerides (C) levels ..... 84

**Figure 3:** Analysis of TBARS levels (A), DCF-RS levels (B)  $\delta$ -ALA-D enzyme reactivation index (C), NPSH levels (D), Ascorbic Acid levels (E), SOD activity (F) and CAT activity (G) in liver of mice. .... 85

**Figure 4:** Analysis of TBARS levels (A), DCF-RS levels (B)  $\delta$ -ALA-D enzyme reactivation index (C), NPSH levels (D), Ascorbic Acid levels (E), SOD activity (F) and CAT activity (G) in kidney of mice ..... 86

**Figure 5:** Analysis of TBARS levels (A), DCF-RS levels (B)  $\delta$ -ALA-D enzyme reactivation index (C), NPSH levels (D), Ascorbic Acid levels (E), SOD activity (F) and CAT activity (G) in brain of mice ..... 87

**Figure 6:** Histological analysis of liver ..... 88

**Figure 7:** Histological analysis of kidney ..... 89

**Figure 8:** Histological analysis of brain ..... 90

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa

**Efeitos do chá de *Bauhinia forficata* (subsp *pruinosa*) sobre o dano oxidativo induzido por altas concentrações de glicose em eritrócitos humanos e por estreptozotocina em camundongos**

Autora: Andréia Caroline Fernandes Salgueiro

Orientador: Gustavo Orione Puntel

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 25 de janeiro de 2013.

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma desordem metabólica caracterizada pela deficiência absoluta ou relativa na produção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas, ou ainda por uma incapacidade de utilização da insulina produzida. Acredita-se que a hiperglicemia crônica no DM esteja envolvida na gênese de diversos eventos bioquímicos, os quais resultam em um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante em neutralizá-las, levando a um estado de estresse oxidativo. Popularmente, muitas plantas conhecidas como medicinais, são utilizadas para tratar os sintomas do DM. Dentre estas plantas, estão as do gênero *Bauhinia* (Fabaceae, Leguminosae), cuja atividade antioxidante tem sido comprovada em modelos utilizando diferentes formas de extração de compostos químicos. Porém, pouco se sabe sobre os efeitos do chá das folhas de *Bauhinia*, tal como a mesma é popularmente utilizada. Com base no exposto, este trabalho teve como

objetivos investigar a atividade antioxidante da infusão das folhas de *Bauhinia forficata* (subsp. *pruinosa*) (BF), popularmente conhecida como “Pata de vaca” e largamente utilizada sob a forma de chá pela população, sobre o dano oxidativo induzido por altas concentrações de glicose em eritrócitos humanos (**Manuscrito 1**) e pela estreptozotocina (ETZ) em camundongos (**Manuscrito 2**). Os resultados do **Manuscrito 1** mostraram que o chá de BF foi efetivo em reduzir o dano lipídico e em manter, ou mesmo aumentar, os níveis de antioxidantes em eritrócitos humanos incubados com elevadas concentrações de glicose (0 a 500mM). Acreditamos que estes resultados estejam diretamente relacionados aos elevados níveis de polifenóis e flavonoides presentes no chá de BF, os quais podem explicar a sua significativa atividade quelante de ferro e de neutralização de radicais hidroxilas ( $\text{OH}^\bullet$ ), seja via neutralização do radical  $\text{DPPH}^\bullet$  seja via neutralização da reação de Fenton. Além de reduzir o dano oxidativo determinado por elevadas concentrações de glicose em eritrócitos humanos *in vitro*, observamos que o efeito antioxidante do chá de BF foi mantido em um modelo *ex vivo* de intoxicação por ETZ em camundongos (**Manuscrito 2**). Os resultados do **Manuscrito 2** mostraram que o chá de BF foi capaz de minimizar as alterações oxidativas e morfológicas em diferentes órgãos, e também em reduzir a perda de peso e a hiperglicemia provocada pela ETZ em camundongos. O chá das folhas de BF foi bem aceito pelos animais e não teve efeitos *per se* sobre os achados bioquímicos ou histológicos deste trabalho. Acreditamos que os resultados observados estejam diretamente relacionados aos níveis de polifenóis e flavonoides previamente relatados. Em resumo, os efeitos antioxidantes do chá de BF foram observados tanto *in vitro* quanto *ex vivo*, e estes resultados contribuem para ressaltar e justificar os benefícios do uso do chá das folhas desta planta medicinal, tal como a mesma é popularmente

utilizada, em minimizar as alterações oxidativas de processos patológicos com incidência crescente na sociedade contemporânea, a exemplo do DM.

**Palavras-chave:** *Diabetes mellitus*; Estresse oxidativo; Plantas medicinais; *Bauhinia forficata*, Antioxidantes.

**ABSTRACT**

Dissertation of Master's Degree

Post-Graduate Course in Biochemistry

Federal University of Pampa

**Effects of *Bauhinia forficata* (subsp *pruinosa*) tea on oxidative damage induced by high glucose concentrations in human erythrocytes and streptozotocin in mice**

Author: Andréia Caroline Fernandes Salgueiro

Advisor: Gustavo Orione Puntel

Date and place of defense: Uruguaiana, January, 25, 2013.

*Diabetes mellitus* (DM) is a metabolic disorder characterized by an absolute or relative deficiency in insulin production by pancreatic  $\beta$  cells, or by an inability to use the insulin produced. It is believed that the chronic hyperglycemia in DM is involved in the genesis of several biochemical events that result in an imbalance between the production of reactive oxygen species and the antioxidant defense systems capacity to neutralize them, leading to an oxidative stress state. Many plants known as medicinal are used to alleviate the symptoms of DM. Among these are the plants of the *Bauhinia* genus (Fabaceae, Leguminosae), which antioxidant activity was already proven in models of different extractions of chemical compounds. However, little is known about the effects of *Bauhinia* leaves tea, as it is popularly used. Based on the above, this study aimed to investigate the antioxidant activity of *Bauhinia forficata* (subsp. *pruinosa*)

(BF) leaves infusion, popularly known as “Paw cow” and used as tea in folk medicine, on the oxidative damage induced by high glucose concentrations in human erythrocytes (**Manuscript 1**) and by streptozotocin (STZ) in mice (**Manuscript 2**). The results of **Manuscript 1** showed that the BF tea was effective in reducing lipid damage and maintain, or even increase, the antioxidant levels in human erythrocytes incubated with high glucose concentrations. We believe that these results are directly related to high levels of polyphenols and flavonoids present in BF tea, which can explain its significant iron chelating activity and hydroxyl radical (OH •) neutralization, either via DPPH<sup>•</sup> radical scavenger or via Fenton reaction neutralization. More than the oxidative damage reduction determined by high glucose concentrations in human erythrocytes *in vitro*, we found that the antioxidant potential of BF tea was kept in an *ex vivo* model of STZ intoxication in mice (**Manuscript 2**). The results of **Manuscript 2** showed that BF tea was able to minimize the oxidative and morphological damage in various organs, and also to reduce the weight loss and hyperglycemia caused by STZ in mice. BF leaves tea was well accepted by the mice and had no *per se* effect on biochemical or histological findings of this study. We believe that the observed results are directly related with the polyphenols and flavonoids levels previously reported. In summary, the antioxidant effects of BF tea were observed both *in vitro* and *ex vivo*, and these results help to highlight and explain the benefits of using leaves tea of this medicinal plant, as it is popularly used, to minimize oxidative changes of pathological processes with increasing incidence in contemporary society, such as the DM.

**Key Words:** *Diabetes mellitus*; Oxidative stress; Medicinal plants; *Bauhinia forficata*, Antioxidants.



## APRESENTAÇÃO

O presente trabalho encontra-se dividido em itens. No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas abordados na dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscritos científicos, os quais se encontram alocados no item **MANUSCRITOS CIENTÍFICOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos respectivos manuscritos científicos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens, **CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES**, no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os resultados contidos neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ao final da dissertação se referem somente as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **CONSIDERAÇÕES FINAIS**.

## 1. INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é apontado como uma principais ameaças para a saúde humana no século XXI (Zimmet et al., 2001), sendo considerado a quinta principal causa de morte no mundo (SBD, 2009). Estudos recentes indicam que, atualmente, existem cerca de 350 milhões de diabéticos no mundo e estimativas mundiais sugerem que haverá 439 milhões de indivíduos com DM no ano de 2030 (Shaw et al., 2010). No Brasil, dados da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2012) apontam a existência de mais de 12 milhões de pessoas com DM e dados epidemiológicos da Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (SES / RS, 2011) indicam que há mais de meio milhão de diabéticos no Estado. Particularmente, na cidade de Uruguaiana / RS, que tem uma população estimada em 230.000 habitantes (IBGE, 2011), há 12.907 diabéticos cadastrados no Programa Nacional de Monitoramento de Hipertensos e Diabéticos (DATASUS, 2012).

O DM é caracterizado por uma deficiência na produção pancreática de insulina ou no reconhecimento tissular periférico da insulina produzida (IDF, 2012), o que resulta na elevação dos níveis glicêmicos. A manutenção de um quadro de hiperglicemia crônica desencadeia uma série de desequilíbrios bioquímicos. Estes, em geral, estão envolvidos na gênese do estresse oxidativo (EO) característico do DM, o qual resulta de um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) associado a uma redução das defesas antioxidantes do organismo (Halliwell & Gutteridge, 2000). Dentre estes desequilíbrios destacam-se os processos de auto-oxidação da glicose, glicação não enzimática com a formação de produtos finais de glicação avançada e a ativação da via dos poliois (Kassab & Piwowar, 2012), os quais serão descritos na revisão bibliográfica. Isoladamente ou em conjunto, todos estes

processos resultam em um aumento na produção de EROs e culminam com o desenvolvimento de diversos graus de disfunção celular (Kassab & Piwowar, 2012).

A extensão dos danos oxidativos causados pela hiperglicemia podem ser avaliadas através da utilização de modelos experimentais *in vitro* ou *ex vivo*. Dentre os modelos *in vitro* está o uso de eritrócitos humanos incubados com elevadas concentrações de glicose (Soares et al., 2006). Conforme Yang et al. (2006), Magalhães et al. (2009) e Okoko & Ere (2012), os eritrócitos são bons modelos para o estudo do EO e da atividade de compostos antioxidantes por apresentarem-se particularmente susceptíveis a ação de radicais livres. A avaliação do EO relacionado com a hiperglicemia em modelos experimentais *ex vivo* por sua vez, pode ser efetuada utilizando-se a toxina estreptozotocina (ETZ) (Maritim et al., 2003). A ETZ é uma toxina sintetizada pela levedura *Streptomyces achromogenes* e foi identificada como um potente indutor de hiperglicemia por causar a destruição das células  $\beta$  – pancreáticas (Delfino et al., 2002). Além da toxicidade dirigida às células  $\beta$  – pancreáticas, a ETZ *per se*, assim como a hiperglicemia secundária à sua intoxicação, podem aumentar a geração de EROs e assim resultar no desenvolvimento de lesões oxidativas em diversos órgãos (Szkudelski, 2001). De fato, modelos de indução de DM com ETZ têm sido largamente utilizados tanto em ratos quanto em camundongos (Volpato et al., 2008; Wang et al., 2010; Ramkumar et al., 2011). Neste contexto, há evidências de que os animais intoxicados com ETZ exibem a maioria das complicações diabéticas mediadas pelo EO (Comelli et al., 2009).

Muitas espécies vegetais são utilizadas com fins terapêuticos pelas populações humanas, sendo coletivamente conhecidas como plantas medicinais. Para Simões et al. (2001), as plantas medicinais são consideradas misturas complexas de produtos biologicamente ativos, sendo que muitos destes produtos podem servir como modelos

para a síntese de um grande número de fármacos, sendo assim, há um interesse crescente no uso destas como agentes terapêuticos naturais (Toledo et al., 2003). Para Dornas (2009), apesar de o Brasil apresentar uma grande riqueza em sua flora e da ampla utilização de plantas medicinais pela população, existe um consenso acerca da insuficiência de estudos científicos que visem investigar as propriedades das mesmas. Algumas espécies de plantas medicinais são utilizadas com fins antidiabéticos ou hipoglicemiantes (Cechinel-Filho, 2009), e, conforme Volpato et al. (2002), esta constitui a forma de tratamento mais antiga para o DM, sendo utilizada por cerca de 40% dos indivíduos com DM (Silva et al., 2008). Entre as plantas mais empregadas para o tratamento do DM na região sul do Brasil está a *Bauhinia forficata* (BF) (Trojan-Rodrigues et al., 2012). De fato, os efeitos antioxidantes e antidiabéticos de diversas plantas usadas no controle do DM já foram avaliados. Dentre as preparações de plantas medicinais estudadas estão o extrato butanólico de BF, o qual teve efeito hipoglicemiante em ratos intoxicados por ETZ (Silva et al., 2002). O extrato aquoso de BF também já foi previamente estudado, e, apesar de não apresentar efeito hipoglicemiante, melhorou o perfil antioxidante e reduziu anomalias fetais em ratas grávidas (Volpato et al., 2008). Já Pepato et al. (2002) observaram que a decocção das folhas de BF, administrada no lugar da água de beber, reduziu a hiperglicemia em ratos intoxicados com ETZ. Apesar de diversos estudos já terem sido desenvolvidos com o intuito de avaliar a capacidade hipoglicemiante de diferentes extratos de BF, poucos consideram análises mais complexas e aprofundadas na forma de infusão aquosa (Damasceno et al., 2004; Volpato et al., 2008) ou, como popularmente é conhecida, na forma de chá, que será apresentada neste trabalho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Diabetes mellitus*

O DM é definido como um grupo heterogêneo de desordens metabólicas causadas pela deficiência na produção pancreática de insulina ou no reconhecimento tecidual periférico da mesma (IDF, 2012). O sinal clínico mais característico na fisiopatologia do DM é a manutenção de níveis glicêmicos elevados (hiperglicemia) resultantes de uma disfunção no metabolismo dos glicídios, protídeos e lipídios (WHO, 2012). A glicemia deve ser mantida dentro de uma faixa estritamente controlada, sendo que os níveis aceitáveis atualmente ficam na faixa de 70 a 100mg/dL (SBD, 2009). Níveis elevados de glicose circulantes estão associados a uma série de alterações oxidativas, cujas principais serão descritas posteriormente no tópico mecanismos de dano oxidativo relacionados ao DM, as quais culminam com o desenvolvimento das complicações reconhecidamente relacionadas ao DM, tais como a retinopatia, a vasculopatia e a neuropatia diabéticas (SBD, 2009). Os sintomas clássicos relacionados com o DM incluem poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso (SBD, 2009).

Resumidamente, existem duas formas principais de DM, denominados *Diabetes mellitus* Tipo I, ou imuno-mediado, e *Diabetes mellitus* Tipo II. A fisiopatologia destas duas formas de DM está relativamente bem descrita na literatura e sabe-se que tanto fatores ambientais quanto genéticos estão envolvidos. A patogênese do DM Tipo I envolve uma destruição autoimune ou ainda idiopática das células  $\beta$  - pancreáticas, originando uma deficiência parcial ou total na produção endógena de insulina pelo pâncreas (SBD, 2009). Por outro lado, a patogênese do DM Tipo II envolve o desenvolvimento de uma resistência tecidual periférica à insulina produzida pelo pâncreas, devido a uma falha de reconhecimento da mesma em nível de receptores

localizados nos tecidos-alvos. Esta condição de resistência à insulina faz com que a produção de insulina pelo pâncreas seja aumentada nas fases iniciais do DM tipo II, caracterizando o desenvolvimento de uma hiperinsulinemia compensatória (Timper & Donath, 2012). Além disso, o desenvolvimento do DM Tipo II está fortemente correlacionado a manutenção de hábitos de vida inadequados, dentre os quais se destaca a obesidade e o sedentarismo, além da predisposição genética do indivíduo (Timper & Donath, 2012).

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido e secretado pelas células  $\beta$  do pâncreas em resposta a um aumento nos níveis de glicose e aminoácidos circulantes (Carvalho et al., 2002). Uma das funções mais importantes da insulina é aumentar a captação de glicose pelos tecidos, especialmente o muscular e o adiposo (tecidos sensíveis à insulina). As células destes tecidos expressam em sua membrana plasmática receptores de insulina que, quando sensibilizados pela mesma, são capazes de mobilizar transportadores intracelulares especializados na captação de glicose. Tais transportadores são conhecidos como *Glucose Transporters* (GLUTs) os quais se apresentam em diferentes isoformas dependendo do tecido. Os GLUTs são uma família de 14 membros, os quais permitem a difusão facilitada de glicose, por gradiente de concentração, através da membrana plasmática celular (Machado et al., 2006). Além de estimular a captação de glicose pelos tecidos, a insulina também estimula a lipogênese e inibe a degradação proteica, sendo considerada um hormônio predominantemente anabólico (Carvalho et al., 2002).

### **2.1.1. Modelos experimentais de hiperglicemia**

Atualmente diversos modelos experimentais são utilizados para avaliar os efeitos da hiperglicemia em sistemas biológicos. Dentre estes, é possível destacar o uso de

modelos *in vitro* com células humanas ou animais, e *in vivo* ou *ex vivo* em animais de experimentação.

Os eritrócitos ou hemácias são células vermelhas do sangue especializadas no transporte de oxigênio aos tecidos, as quais têm sido amplamente usadas para o estudo de mecanismos de dano oxidativo em biomembranas (Soares et al., 2006; Yang et al., 2006; Magalhães et al., 2009; Okoko & Ere, 2012). Estas células são altamente sensíveis ao dano oxidativo devido ao fato de possuírem um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas plasmáticas, bem como uma elevada concentração de hemoglobina. De fato, um recente estudo mostrou que a peroxidação lipídica (PL) é aumentada em eritrócitos de pacientes com hiperglicemia (Mallick et al., 2011) e que eritrócitos humanos incubados com altas concentrações de glicose apresentam um aumento da PL e uma redução nas defesas antioxidantes (Soares et al., 2006).

Os modelos para o estudo dos efeitos da hiperglicemia *in vivo* ou *ex vivo* incluem a indução de hiperglicemia em animais de experimentação. Nestes modelos, o DM tipo I pode ser induzido por uma pancreatectomia parcial ou pela administração de drogas diabetogênicas (Folmer, 2004). Entre as substâncias mais utilizadas para a indução de DM em roedores estão o aloxano e a estreptozotocina (ETZ - [2-desoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glicopiranos]), as quais destroem seletivamente as células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans no pâncreas (Szkudelski, 2001). A ETZ é sintetizada pela levedura *Streptomyces achromogenes*, e foi inicialmente identificada como um antimicrobiano, porém, estudos pré-clínicos revelaram que sua administração em altas doses causava a destruição das células  $\beta$ - pancreáticas (Delfino et al., 2002). Segundo Wang et al. (2010) a ETZ é uma toxina que destrói as células  $\beta$ - pancreáticas por alquilação do DNA, resultando em uma síntese e liberação reduzida de insulina.

Evidências indicam que a toxicidade da ETZ é devida a sua similaridade com a molécula de glicose, o que permite sua internalização via transportadores de glicose do tipo GLUT 2 (Schnedl, 1994). Além da toxicidade dirigida ao DNA, a ETZ assim como a hiperglicemia resultante de sua intoxicação, contribuem para o aumento da produção de EROs, as quais igualmente levam à fragmentação do DNA e provocam outros efeitos deletérios nestas células (Szkudelski, 2001). A indução do DM por ETZ é um modelo experimental bem documentado (Schnedl, 1994; Szkudelski, 2001) e, além da hiperglicemia, os animais tratados desenvolvem a maioria das complicações diabéticas mediadas pelo EO tais como a neuropatia e a retinopatia diabéticas (Comelli et al., 2009), e outras como perda de massa corporal (Wang et al., 2010; Ramkumar et al., 2011) e dislipidemias (Damasceno et al., 2004).

## **2.2. Estresse oxidativo**

As EROs são compostos químicos derivados do oxigênio molecular que surgem como um produto normal do metabolismo dos sistemas biológicos (Halliwell, 2001). As EROs podem apresentar-se como radicais livres ou ainda como espécies não radicalares sendo que, radicais livres são definidos como qualquer átomo ou molécula que apresente em seu orbital mais externo um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell, 2001). Já as espécies não radicalares, como os peróxidos, não possuem elétrons desemparelhados, porém desempenham um papel importante no dano oxidativo devido a sua grande instabilidade (Halliwell & Gutteridge, 2000). Entre as principais espécies reativas não radicais estão o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido hipocloroso (HOCl). Os radicais livres incluem o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radicais hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), peroxil ( $RO_2^{\bullet}$ ), alcoxil ( $RO^{\bullet}$ ) e hidroperoxil ( $HO_2^{\bullet}$ ) (Halliwell, 2001). Nos organismos vivos, em condições fisiológicas, os níveis de EROs são controlados por uma complexa



teia de defesas antioxidantes, que minimizam (mas não impedem completamente) o dano oxidativo às biomoléculas (Halliwell, 2001). Em diversas doenças humanas o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes está inclinado em favor das EROs, gerando uma situação de EO (Halliwell & Gutteridge, 2000). A relação entre as EROs e muitas doenças humanas já está bem estabelecida, sendo que o EO pode estar implicado em mais de 200 desordens, entre elas o DM (Halliwell & Gutteridge, 2000).

### **2.2.1 – Mecanismos de dano oxidativo relacionados ao DM**

A hiperglicemia crônica no DM leva a diversas alterações bioquímicas e patológicas em diferentes tecidos e sugere-se que o EO possui papel central em sua fisiopatologia (Barbosa et al., 2008). Segundo Reis et al. (2008), há evidências de que disfunções celulares, ocasionadas pelo aumento na produção de EROs, estejam relacionadas à origem das complicações do DM. Além disso, indivíduos com DM, apresentam uma diminuição das defesas antioxidantes diretamente proporcionais à gravidade das alterações patológicas apresentadas (Reis et al., 2008). Dentre os diversos mecanismos que relacionam diretamente a hiperglicemia e EO estão os processos de auto-oxidação da glicose, glicação não enzimática e ativação da via dos poliois.

- **2.2.1.1 - Auto-oxidação da glicose**

Caracteriza-se por uma reação auto-oxidativa da glicose com a subsequente produção de EROs. Neste contexto, a elevação crônica da glicemia favorece a auto-oxidação da glicose, sendo que os açúcares oxidados reagem com componentes lipoproteicos e receptores de membrana, estimulando a formação de  $O_2\cdot^-$  e  $H_2O_2$ . Além disso, o excesso de glicose circulante aumenta a taxa de respiração celular com

concomitante aumento da produção de  $O_2\cdot$ . (Wajchenberg, 2002; Giacco & Brownlee, 2010).

- **2.2.1.2 - Glicação não enzimática**

Os açúcares redutores como a glicose são capazes ligar-se covalentemente em uma reação não enzimática aos grupos amino livres de proteínas, em um processo chamado de glicação (Nguyen et al., 2006). Este processo resulta em alterações estruturais e funcionais de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos e, conforme Folmer (2004), a partir do momento em que esses processos acontecem se iniciam as disfunções teciduais.

A reação entre a glicose ou outros açúcares redutores com proteínas é conhecida como *reação de Maillard* e o produto final desta reação resulta na formação irreversível dos chamados ‘Produtos Finais de Glicação Avançada’ (AGEs de ‘Advanced Glycation End Products’) (Bierhaus et al., 1998; Mohamed et al., 1999). EROs também são geradas durante a formação dos AGEs e provocam um ciclo de auto perpetuação (Kassab & Piwovar, 2012). Por ser um processo não enzimático, a extensão da glicação de proteínas depende essencialmente da concentração de glicose sanguínea sendo, portanto, mínimo em condições fisiológicas, mas aumentando dramaticamente nos dois tipos de DM e em modelos experimentais de DM (Nguyen et al., 2006).

- **2.2.1.3 - Ativação da via dos poliois**

Na via dos poliois os aldeídos tóxicos para as células são reduzidos a alcoóis inativos (Brownlee, 2005). Em situações fisiológicas normais as enzimas desta via possuem baixa afinidade pela glicose, porém em concentrações intracelulares elevadas a glicose é desviada e sofre metabolização por esta via (Brownlee, 2005). Na via dos

poliois ocorrem basicamente duas reações, uma catalisada pela enzima aldose redutase e outra pela sorbitol desidrogenase. A redução da glicose a sorbitol é catalisada pela aldose redutase, que utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatado reduzido (NADPH) como coenzima (Kassab & Piwovar, 2012). O aumento da atividade desta enzima resulta na depleção dos níveis intracelulares de NADPH e por consequência de glutatona reduzida (GSH), necessária para manter a atividade da enzima glutatona peroxidase (Kassab & Piwovar, 2012), reduzindo assim a atividade antioxidante celular.

A segunda etapa da via dos poliois consiste na oxidação do sorbitol a frutose, catalisada pela sorbitol desidrogenase, a qual utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD) como cofator (Hammes et al., 2003). A depleção intracelular de NAD acaba por interferir na via glicolítica, resultando em uma diminuição dos níveis intracelulares de 2,3 difosfoglicerato, o qual desempenha um importante papel na regulação e ligação do oxigênio aos tecidos devido a sua alta afinidade por hemoglobina (Nakamura *et al.*, 1995). Assim, baixas concentrações de 2,3-difosfoglicerato dificultam o transporte/liberação de oxigênio aos tecidos e levam a um estado de pseudo - hipóxia hiperglicêmica, o que também contribui para aumentar os níveis de radicais livres.

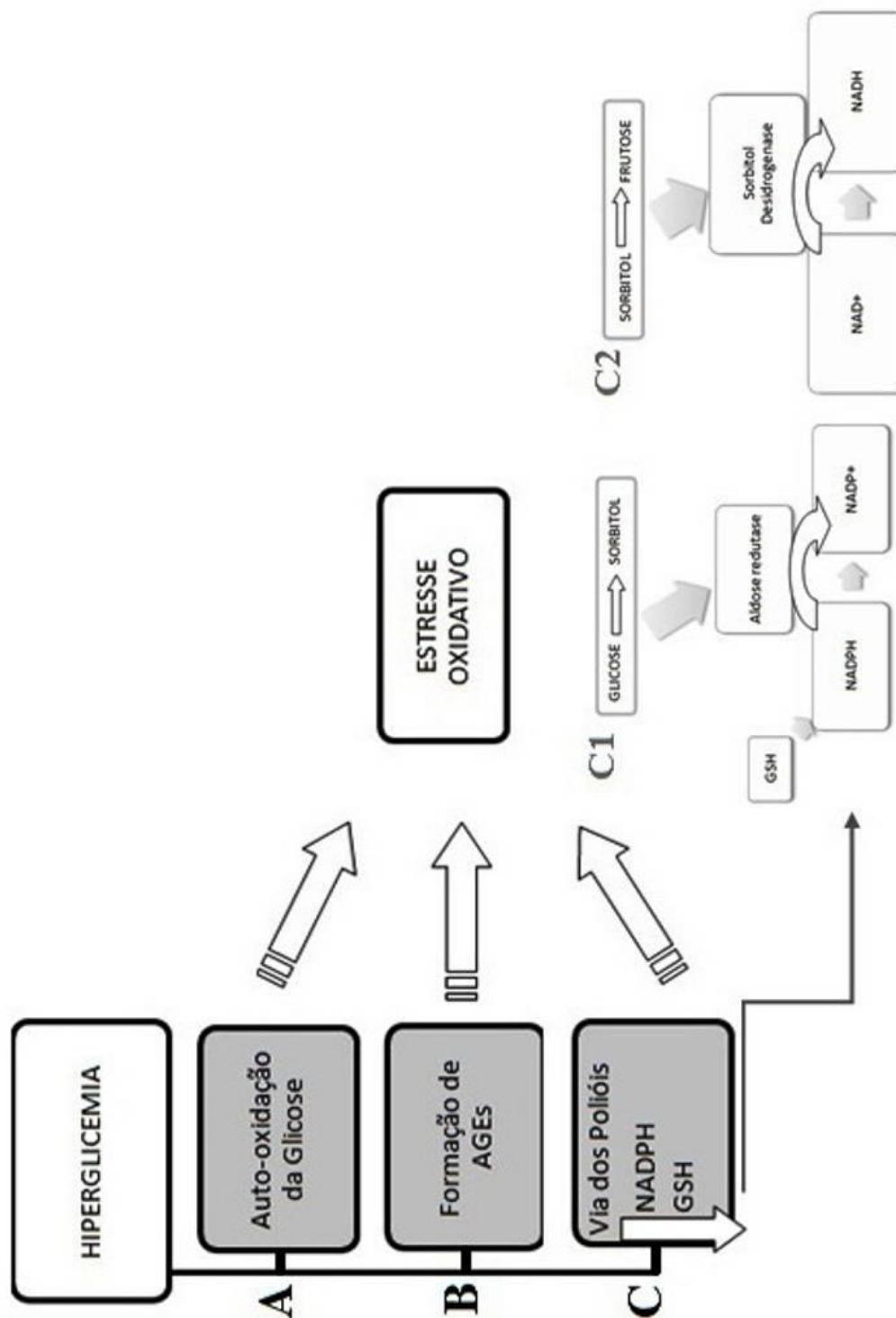


Figura 1: Resumo dos principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento do estresse oxidativo no DM

### 2.2.2 Marcadores de dano oxidativo

A magnitude do EO pode ser avaliada através de ensaios bioquímicos que determinem a formação de EROs ou a extensão do dano oxidativo causado por estas. Dentre as medidas para avaliação da extensão do dano oxidativo estão as análises da atividade de enzimas sensíveis aos oxidantes e a mensuração dos produtos da PL de membranas celulares.

A PL é um processo complexo que envolve a interação de EROs com ácidos graxos poli-insaturados componentes das membranas celulares (Reed, 2011). Este processo resulta em uma desorganização estrutural destas membranas e a consequente falência dos mecanismos de trocas iônicas entre os meios intra e extracelular. Estas alterações contribuem para a perda de seletividade das membranas, podendo levar à morte celular (Halliwell & Gutteridge, 2000). Dentre os produtos finais da PL estão os acetaldeídos tais como o malondialdeído (MDA) (Rosen et al., 1999). O MDA é uma das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) e sua quantificação pode ser realizada através do método conhecido como TBARS (espécies reativas ao TBA) (Ohkawa et al., 1979).

A formação de lipoperóxidos está intimamente associada com a produção excessiva de EROs nos sistemas biológicos (Rosen et al., 1999). Entre os métodos de análise da produção de EROs está o que avalia a oxidação inespecífica do molécula diclorofluoresceína-diacetato (DCFA-DA) até sua forma oxidada por espécies reativas (DCF-RS), a qual pode ser quantificada fluorimetricamente (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Outra forma de avaliar a extensão do dano oxidativo é através da avaliação da atividade de enzimas altamente sensíveis a agentes oxidantes, a exemplo da enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D). Por ser uma enzima que contém grupos

sulfidrílicos (-SH), a atividade da  $\delta$ -ALA-D é altamente sensível à presença de elementos pró-oxidantes, os quais podem oxidar estes grupos (Farina et al., 2001). De fato, o EO é apontado como a principal causa de inibição da  $\delta$ -ALA-D e já foi demonstrado que a atividade desta enzima está inibida em animais diabéticos, o que a coloca como um alvo em potencial para acompanhar as oxidações patológicas causadas pelo DM (Folmer, 2004).

### **2.2.3. Sistemas de defesa antioxidante**

Antioxidantes podem ser definidos como quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, retardam ou inibem significativamente a oxidação de um substrato (Sies, 1991; Halliwell, 2001). Esta definição compreende compostos de natureza enzimática e não enzimática (Halliwell & Gutteridge, 2000) e, além disto, moléculas de origem endógena ou derivadas da dieta (Halliwell, 2001). Com base na atividade dos antioxidantes, tanto EROs quanto outras espécies reativas, são constantemente inativadas através de diferentes mecanismos, de forma a impedir o dano oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2000).

#### **2.2.3.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos**

Dentre os agentes que fazem parte deste sistema estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) (Halliwell & Gutteridge, 2000).

A SOD está presente sob três formas principais, a cobre e zinco (CuZn-SOD) localizada predominantemente no citosol celular, a manganês (Mn-SOD) de localização mitocondrial e a SOD extracelular. A SOD catalisa a reação de dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  (Halliwell e Gutteridge, 2000). A enzima CAT, por sua vez, está localizada em

grande quantidade nos peroxissomas e tem como função catalisar a reação de degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em moléculas de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (Halliwell & Gutteridge, 2000). Já a GPx está vastamente distribuída nos tecidos animais e tem por função degradar peróxidos, entre estes o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as custas da oxidação de GSH (Halliwell & Gutteridge, 2000). Desta forma, as reações das enzimas SOD, CAT e GPx acabam estando encadeadas num mesmo mecanismo antioxidante que tem por objetivo neutralizar a ERO  $\text{O}_2\cdot$  até a molécula inerte de  $\text{H}_2\text{O}$ .

### **2.2.3.2. Sistemas antioxidantes não enzimáticos**

As moléculas que fazem parte do sistema de defesas antioxidantes não enzimáticas podem ter origem endógena, tais como a GSH, ou serem obtidas através da dieta, tais como o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e a maioria dos flavonoides (Halliwell, 2001).

A análise do antioxidante GSH pode ser realizada pela mensuração dos níveis de grupos  $-\text{SH}$  não-protéicos (NPSH) nos sistemas biológicos, já que a ação antioxidante da GSH depende da integridade do grupo  $-\text{SH}$  presente no resíduo de cisteína de sua molécula (Vertuani et al., 2004). O ácido ascórbico (AA), por sua vez, é um antioxidante hidrofílico que neutraliza o  $\text{O}_2\cdot$  e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e recicla o alfa-tocoferol (Vit, E), e desta forma ajuda a prevenir a PL (Vertuani et al., 2004).

## **2.3. Plantas medicinais e DM**

Segundo Souza (2009), em todo o mundo as plantas medicinais são utilizadas empiricamente pela população para o tratamento de diversas doenças. Para Macedo & Ferreira (2004), este uso está relacionado à cultura popular que é transmitida de geração para geração, sendo que atualmente há uma grande variedade de plantas utilizadas por

seus efeitos hipoglicemiantes. Além de um potencial hipoglicemiante, a maioria dos extratos de plantas medicinais exibe atividade antioxidante. Segundo Carvalho et al. (2005) existem cerca de 800 plantas medicinais com comprovado efeito hipoglicemiante, sendo que mais de 200 compostos já foram identificados com potencial antioxidante nos extratos das mesmas.

Entre as plantas mais utilizadas por indivíduos com DM na região sul do Brasil, devido ao seu potencial hipoglicemiante, está a BF (Trojan-Rodrigues, 2012). Segundo Cechinel-Filho (2009), as plantas do gênero *Bauhinia* (Fabaceae, Leguminosae) consistem em cerca de 300 espécies que são largamente distribuídas na maioria dos países tropicais da África, Ásia e América do Sul, e são popularmente conhecidas como “Pata de vaca” devido ao formato único, bilobado de suas folhas.

Conforme a revisão de Cechinel-Filho (2009), de uma forma geral, muitos estudos já comprovaram as propriedades terapêuticas das plantas do gênero *Bauhinia*, indicando que estas são devidas principalmente à presença de flavonoides. Para Cos et al. (2001), os flavonoides são facilmente disponíveis no reino vegetal e possuem particular importância por seu potencial antioxidante, podendo proteger os componentes biológicos do EO. Os componentes adicionais incluem terpenos, esteroides, ácidos aromáticos, quinonas, lactonas e alcaloides, entre outros (Silva & Cechinel Filho, 2002; Mali et al., 2007). Conforme Okoko & Ere (2012), as propriedades antioxidantes destes fitoquímicos são atribuídas a sua capacidade de doar elétrons ou átomos de hidrogênio e/ou quelar metais absorvendo ou neutralizando radicais livres.

Muitos compostos extraídos das plantas do gênero *Bauhinia* e considerados potencialmente terapêuticos, já foram isolados e identificados. Porém, apesar de muitos compostos serem conhecidos, pouco se conhece sobre a atividade farmacológica da maioria destas substâncias isoladas (Silva & Cechinel-Filho, 2002). Um dos flavonoides



mais encontrados nas plantas deste gênero é a canferitrina, considerada responsável pela atividade hipoglicemiante e antioxidante da planta. Conforme Sousa et al. (2004), a canferitrina é apenas 2-3 vezes menos potente do que a quercetina, um antioxidante forte e bem caracterizado. Estes autores afirmam que a canferitrina apresenta potencial antioxidante em concentrações muito baixas, e que, entre outros efeitos, é capaz de inibir a PL em diferentes modelos de membranas e de neutralizar radicais livres, entre eles o radical DPPH<sup>\*</sup> (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) (Sousa et al., 2004). Além disto, a canferitrina é considerada responsável pelo efeito hipoglicemiante dos diferentes extratos de BF, por propiciar o aumento do consumo de glicose pelos tecidos periféricos e potencializar a secreção de insulina pelo pâncreas (Sousa et al., 2004). Outros autores apontam que a canferitrina possui um efeito insulino-mimético (Cazarolli et al., 2009) e tem o poder de ativar a via de sinalização de insulina e estimular a secreção de adiponectina em adipócitos (Tzeng et al., 2009) além de inibir a absorção intestinal de glicose (Rodríguez et al., 2010).

### **3. JUSTIFICATIVA**

Atualmente há um crescente interesse por pesquisas que visem o desenvolvimento de estratégias alternativas para o tratamento das mais diversas desordens que afetam a saúde humana, entre elas o DM. Estudos apontam que o DM é uma enfermidade de crescente prevalência e que a sua fisiopatologia está diretamente relacionada ao desenvolvimento de um quadro de EO. Diferentes espécies vegetais são culturalmente utilizadas como coadjuvantes ou mesmo como única forma de tratamento por indivíduos diabéticos, entre elas está a espécie BF. Apesar de a BF ter seus efeitos hipoglicemiantes e antioxidantes avaliados em diferentes formas de extração, muito se têm a esclarecer sobre os mecanismos pelos quais a BF exerce seus efeitos

especialmente na forma de chá, tal como é comumente utilizada pela população. Desta forma, o presente trabalho justifica-se à medida que se propõe a avaliar os efeitos do chá das folhas da BF sobre marcadores de EO *in vitro* em eritrócitos humanos incubados com altas concentrações de glicose, e em um modelo *ex vivo* de hiperglicemia induzida por ETZ em camundongos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos do chá de BF sobre o dano oxidativo induzido *in vitro* por altas concentrações de glicose em eritrócitos humanos e *in vivo* e *ex vivo* pela intoxicação de camundongos por ETZ.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar os efeitos *in vitro* do chá da BF sobre o dano oxidativo induzido por altas concentrações de glicose em eritrócitos humanos. Neste contexto, analisar os mecanismos pelos quais o chá de BF exerce seus efeitos, tais como:
  - a. Quantificar os níveis de polifenóis e flavonoides do chá de folhas de BF;
  - b. Investigar a interação do chá de BF com o radical DPPH<sup>•</sup>, com a quelatação de íons ferrosos (Fe<sup>2+</sup>), e na reação de Fenton via peroxidação de lipídios isolados ou da degradação da desoxirribose.

2. Avaliar os efeitos *in vivo* e *ex vivo* do chá da BF sobre o dano oxidativo induzido por ETZ em camundongos, neste contexto:
  - a. Avaliar *in vivo* o perfil glicídico e lipídico, a ingestão alimentar e hídrica, e as variações de peso dos animais tratados;
  - b. Avaliar *ex vivo* o estresse oxidativo através da análise de marcadores de dano oxidativo e das defesas antioxidantes em diferentes órgãos dos camundongos tratados;
  - c. Avaliar *ex vivo* as possíveis alterações histopatológicas em diferentes órgãos dos camundongos tratados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. MANUSCRITO CIENTÍFICO 1

A influência do chá de *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* sobre a peroxidação lipídica e sobre grupos -SH não proteicos em eritrócitos humanos expostos a altas concentrações de glicose

*The influence of Bauhinia forficata Link subsp. pruinosa tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations*

Andréia C. F. Salgueiro, Carina Q. Leal, Matheus C. Bianchini, Ianeli O. Prado, Andreas S. L. Mendez, Robson L. Puntel, Vanderlei Folmer, Félix A. Soares, Daiana S. Ávila, Gustavo O. Puntel

Este manuscrito foi submetido ao Journal of Ethnopharmacology no mês de novembro de 2012. O Journal of Ethnopharmacology é um importante periódico da área que publica trabalhos relacionados à avaliação de plantas utilizadas na medicina popular.

**The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations**

Andréia C. F. Salgueiro <sup>a</sup>, Carina Q. Leal <sup>a</sup>, Matheus C. Bianchini <sup>a</sup>, Ianeli O. Prado <sup>a</sup>,  
Andreas S. L. Mendez <sup>a</sup>, Robson L. Puntel <sup>a</sup>, Vanderlei Folmer <sup>a</sup>, Félix A. Soares <sup>b</sup>,  
Daiana S. Ávila <sup>a</sup>, Gustavo O. Puntel <sup>c\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA – Campus Uruguaiana, Uruguaiana, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal de Santa Maria, UFSM – Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE) - Departamento de Química.

<sup>c</sup> Universidade Federal de Santa Maria, UFSM – Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Departamento de Morfologia.

---

\*Corresponding author:

Gustavo Orione Puntel - Universidade Federal de Santa Maria, UFSM – Centro de Ciências da Saúde CCS - Departamento de Morfologia, Av. Roraima nº 1000 - Cidade Universitária - Bairro Camobi - CEP: 97105-900 - Santa Maria - RS - Brazil

Phone: +55-55-3220-8239

Fax: +55-55-3220-8978

E-mail: [gustavopuntel@yahoo.com.br](mailto:gustavopuntel@yahoo.com.br)

## Abstract

**Ethnopharmacological relevance:** *Bauhinia forficata* (BF) has been traditionally used as tea in folk medicine of Brazil for treatment of Diabetes mellitus (DM). **Aim of the study:** To evaluate the effects of BF leaf tea on markers of oxidative damage and antioxidant levels in an experimental model of hyperglycemia in human erythrocytes *in vitro*. **Materials and methods:** Human erythrocytes were incubated with high glucose concentrations or glucose and BF tea for 24 h and 48 h. After incubation were analyzed lipid peroxidation and non protein SH levels. Moreover, quantification of polyphenols and flavonoids, iron chelating property, scavenging of DPPH<sup>•</sup>, and prevention of lipid peroxidation in isolated lipids were also assessed. **Results:** A significant amount of polyphenols and flavonoids was observed. The main components found by LC-MS analysis were quercetin-3-O-(2-rhamnosyl) rutinoside, kaempferol-3-O-(2-rhamnosyl) rutinoside, quercetin-3-O-rutinoside and kaempferol-3-O-rutinoside. BF tea presents important antioxidant and chelating properties. Moreover, BF tea was effective to increase non protein SH levels and reduce lipid peroxidation induced by high glucose concentrations in human erythrocytes. **Conclusion:** The antioxidant effects of BF tea could be related to the presence of different phenolic and flavonoids components. We believe that these components can be responsible to protect human erythrocytes exposed to high glucose concentrations against oxidative damage.

**Key Words:** *Bauhinia forficata*; Diabetes mellitus; Natural Products; Oxidative Stress; Red Blood Cells; *In vitro*.

## 1. Introduction

In recent years, the interest in medicinal plants with antioxidant properties used for treatment of human diseases, including Diabetes mellitus (DM), has increased (Oliveira et al., 2012). An important medicinal plant that is largely used for treatment of DM is *Bauhinia forficata* (BF) (Trojan-Rodrigues et al., 2012). The genus *Bauhinia* (Fabaceae, Leguminosae) consist of approximately 300 species which are mostly distributed in tropical countries from Africa, Asia and South America, and are popularly known as “cow’s paw”, because of the shape of their leaves (Cechinel Filho, 2009). Notably, BF is an important medicinal plant to be studied for its effects against the DM. Although many studies have already evaluated the antioxidants effects of different extracts of BF on the DM, few have evaluated the effects of BF tea prepared from the leaves (infusion), as used in folk medicine.

DM is defined as a group of metabolic disorders characterized by the impaired insulin production or inability to properly use the insulin produced in human organism (International Diabetes Federation, 2012). Chronic hyperglycemia was found to increase the production of reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative stress, a condition that could be associated with cell dysfunction (Kassab and Piwowar, 2012).

Several hypotheses have been postulated to explain the genesis of ROS in DM, such as the non-enzymatic and progressive glycation of proteins and/or lipids and nucleic acids, changing the characteristics and function of these molecules (Kassab and Piwowar, 2012; Yamagishi et al., 2012). In fact, the oxidative damage resulting from hyperglycemia has been well reported. For instance, a depletion of intracellular levels of glutathione (GSH) is often present in DM (Kassab and Piwowar, 2012). In addition, the

increased lipid peroxidation was already demonstrated in erythrocytes of diabetic patients compared with controls (Mallick et al., 2011).

Considering previous studies reporting that hydro-ethanolic extracts of BF have a significant antioxidant activity *in vitro* (Ferrerres et al., 2012; Sayago et al., 2013), and that oxidative stress plays a key role in the pathogenesis of DM, the present work evaluated the leaf extract of *B. forficata* Link subsp. *pruinosa* (Vogel) Fortunato & Wunderlin, widely used in the form of tea by diabetic population.

Moreover, taking into account the extensive oxidative damage depicted by a high glucose condition in erythrocytes and considering the use of medicinal plants as exogenous sources of antioxidants, this study aimed:

i) To analyze the total phenol and flavonoid levels; the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH<sup>\*</sup>) and nitric oxide (NO) scavenging activities of BF tea;

ii) To assess the reduced iron (Fe<sup>++</sup>) chelating activity and the protection against deoxyribose degradation of BF tea;

iii) To evaluate the effects of BF tea on markers of the oxidative damage and antioxidant levels in an experimental model of hyperglycemia in human erythrocytes *in vitro*.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Chemical reagents**



The reagents thiobarbituric acid (TBA), deoxyribose, and the Ellman's reagent (DTNB) were supplied by Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). The other used reagents were obtained from local suppliers.

## **2.2. *Bauhinia forficata* tea preparation**

BF leaves were collected on the campus of Federal University of Pampa-RS, Brazil, in September (spring) of 2011. The botanical identification of the samples was confirmed and a voucher specimen (number ICN 167491; *B. forficata* Link subsp. *pruinosa* (Vogel) Fortunato & Wunderlin) was deposited at the ICN Herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The leaves were dried at room temperature (average temperature of 25 ° C to 30 ° C) for five days. Dried leaves were weighed (0.001, 0.01 and 0.1 g) for 10 mL of hot water (80°C) for preparation of infusion concentrations 0.1 µg / µL, 1.0 µg / µL and 10 µg / µL, respectively. After the tea was filtered and used for analysis. All analysis was performed using a fresh prepared tea infusion.

### **2.2.1. LC-MS analyses**

The LC analyses were conducted using a Prominence Liquid Chromatography (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with SLC-10A controller, LC-20AD pump, SIL-10AF auto sampler and SPD-M10A PDA detector. A Phenomenex Luna C-18 (2) column (250 x 4.6 mm, 5 µm) was used. The mobile phase consisted of a water containing 0.05% phosphoric acid (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 0.8 ml min<sup>-1</sup> using the gradient as follows: 0.1-23 min, 10-40% solvent B in A; 23.01-40 min, a fixe proportion of 10% solvent B and 90% solvent A. The detection was done on DAD

detector, set at 340 nm. The mobile phase was prepared daily, filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter (Millipore) and sonicated before use.

The MS analysis were performed on an Esquire plus 3000 (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) ion trap mass spectrometer with an electrospray interface (ESI). The data acquisition software employed was esquire CONTROL 5.2. The LC/ESI/MS was conducted in positive-ion mode and operated according to defined conditions: nitrogen gas temperature 320°C; drying gas flow rate 7 l min<sup>-1</sup>; capillary voltage 4000V; nebulizing pressure 27 psi. Mass spectra were recorded by using full scan mode in the range of  $m/z$  200-800.

### **2.3. Biochemical analysis**

#### **2.3.1. Assays without biological tissues**

##### *Phenolic and flavonoid levels*

Total phenolic content of BF tea was determined by the Folin–Ciocalteu colorimetric method (Singleton and Rossi, 1965). The mixture was incubated at room temperature for 30 minutes and the reaction product was read at 720 nm. A calibration curve obtained with gallic acid was used to determine the tea total phenolic content. Total flavonoid content of BF tea was assayed as described by Chang et al., (2002), with some modifications. Briefly, the tea was added to a reaction medium containing: 5% sodium nitrite, 10% aluminium chloride and 1.0 M sodium hydroxide. The mixture was incubated at 37 °C for 10 minutes and the reaction product was read at 510 nm. A calibration curve with quercetin was used to determine the tea flavonoid content.

##### *Nitric oxide (NO) scavenging assay*

The scavenging of NO was assessed by incubating sodium nitroprusside (SNP) (5 mM, in PBS) with different BF tea concentrations at 25 °C. After 120 minutes incubation, 0.5 mL of incubation media was sampled and mixed with 0.5 mL of Griess reagent (Green et al., 1982). The absorbance was measured at 550 nm. The amount of nitrite was calculated using different concentrations of sodium nitrite. The values were compared to control tube (without tea) to determine the percentage of inhibition of nitrite reaction with Griess reagent depicted by the BF tea as an index of the NO scavenging activity.

#### *DPPH<sup>•</sup> radical scavenging activity assay*

The measurement of the BF tea activity against the DPPH<sup>•</sup> (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical was performed in accordance with Choi et al. (2002). Briefly, 85 µM DPPH<sup>•</sup> was added to a medium containing different BF tea concentrations. The medium was incubated for 30 minutes at room temperature, in the dark. The decrease in the absorbance measured at 518 nm depicted the scavenging activity of the BF tea against DPPH<sup>•</sup>. Ascorbic acid was used as positive control to determine the maximal decrease in DPPH<sup>•</sup> absorbance. The values were expressed as percentage of inhibition of DPPH<sup>•</sup> absorbance in relation to the control values without the BF tea (ascorbic acid maximal inhibition was considered 100% of inhibition).

#### *Deoxyribose degradation assay*

The deoxyribose degradation assay was performed according to Puntel et al., (2005). Briefly, the reaction medium was prepared containing: BF tea (concentrations 0µg - 50µg), 2mM deoxyribose, 0.05mM FeSO<sub>4</sub> and 0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reaction medium was incubated at 37 °C for 60 minutes and stopped with 2% of trichloroacetic

acid (TCA). The color reaction was started with addition of 0.4 mL of TBA and allowed to incubate for 30 minutes at 100°C. Standard curves of malondialdehyde (MDA) were performed to determine the MDA generated by the deoxyribose degradation, and the values were expressed as percentage of control (condition without BF).

#### *Iron chelating properties*

In order to examine iron chelating properties of the BF tea we used the o-phenantroline method according to Puntel et al. (2005). The method is based on the reaction of free  $\text{Fe}^{2+}$  with o-phenantroline forming a colored complex. First, the mixture containing  $\text{Fe}^{2+}$  (150  $\mu\text{M}$ ) and the BF tea were allowed to interact for 5 minutes; afterwards, a solution of o-phenantroline was added to the mixture (62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  equivalent to 0.25%). The formation of complexes between  $\text{Fe}^{2+}$  and the BF tea was estimated by a decrease in the color reaction at 510 nm when compared to a control tube containing  $\text{Fe}^{2+}$  and o-phenantroline alone. The values are expressed in percentage of inhibition in relation to control ( $\text{Fe}^{2+}$  and o-phenantroline alone without BF tea). The solutions were prepared freshly for each experiment

#### **2.3.2) Assays with biological samples**

##### *Analysis with lipid from eggs yolks*

The lipids of eggs used in the biochemical analysis were prepared according methodology proposed by Hassan et al., (2009) with some modifications. The lipids were prepared mixing chicken egg yolk with Tris-HCl (10mM) in a proportion 1/100 (weight/volume) in order to obtain a concentration of 10 $\mu\text{g}$  of lipid in 1 $\mu\text{L}$  final solution. The lipids were incubated in medium containing different BF tea concentrations, with or without the pro-oxidant reduced iron (20 $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ ), and with Tris-HCL (10mM) for

one hour at 37°C. After the incubation period the mixture was used for the biochemical analysis.

#### *Analysis with human blood*

The human erythrocytes used in the biochemical analysis were prepared according Soares et al., (2006) with some modifications. Samples of human blood (10 mL) were collected from healthy adult volunteers by venous puncture in heparinized tubes. The collected whole blood was centrifuged (2,000g. for 10 minutes) in order to separate the cellular blood fraction and the plasma. Then the plasma content was discarded and an equal volume of saline solution (NaCl 0.9%) was used to resuspend the precipitated cellular blood fraction. This procedure was repeated twice in order to remove the glucose content from the blood samples. After this procedure, small samples of the washed cellular blood fraction was incubated with different glucose concentrations (0-500 mM) and different BF tea concentrations, in a medium containing gentamicine (200µg) for 24 and/or 48h at slight and constant stirring and with a controlled temperature of 37 °C. After the incubation period, the human blood samples, with or without glucose, were washed twice again with saline solution, according described above. Then, the final washed blood samples (1 mL) were precipitated with TCA (40%) (1mL) and subsequently centrifuged at 2,000g. for 10 minutes in order to obtain the first supernatant fraction (S1) that was used for the biochemical analysis.

#### *Lipid peroxidation assay*

The lipid peroxidation was determined by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) levels as described by Ohkawa et al., (1979). In the egg yolk samples, the TBA-RS levels determination was performed by addition of acetic acid

buffer (0.5mL, pH 3.4), and TBA 0.6% (0.5mL) to the incubation medium containing lipids (250µg). In human erythrocytes, TBA-RS was assayed by adding S1 samples (0.5mL) to a medium containing acetic acid buffer (0.5mL pH 3.4), and TBA 0.6% (0.5mL). For both egg lipids and human erythrocytes, the reaction media was allowed to react for 1 hour at 100 °C. At the end of incubation time the quantification of Malondialdehyde (MDA) in the samples was measured spectrophotometrically at 532 nm. MDA is one of the end products of the lipid peroxidation process and is formed during oxidative degeneration as a product of free oxygen radicals, which is accepted as an indicator of lipid peroxidation. The MDA levels were calculated from a standard curve and the values were expressed in nmol MDA per mg of lipid or nmol MDA per mL of blood.

#### *Non protein -SH levels (NPSH) determination*

The levels of NPSH were determined according proposed by Ellman (1959) with some modifications. Briefly, samples from S1 (100 µL) were added to a medium containing phosphate buffer (TFK 250mM ph 7.4), and Ellman reagent (DTNB 100 µM). The NPSH levels were measured spectrophotometrically at 412 nm and the results were calculated in relation to a standard curve constructed with GSH.

#### **2.4. Statistical analysis**

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan test, using the software SPSS 10 for windows. Differences between groups were considered significant when  $p \leq 0.05$ .

### **3. Results**

### 3.1. LC-MS

Chemical composition of BF tea in terms of flavonoids is presented in Table 1, which illustrates the measurements of ion mass and fragments obtained from LC-ESI-MS analysis. The chemical structures of the respective flavonoids were suggested based on analytical results and the main components were characterized as quercetin-3-*O*-(2-rhamnosyl) rutinoside, kaempferol-3-*O*-(2-rhamnosyl) rutinoside, quercetin-3-*O*-rutinoside and kaempferol-3-*O*-rutinoside.

**Table 1:** Chemical constituents identified in *B. forficata* Link subsp. *pruinosa* (Vogel) Fortunato & Wunderlin with corresponding retention times, quasi-molecular ions in positive mode and key fragments by LC/ESI-MS.

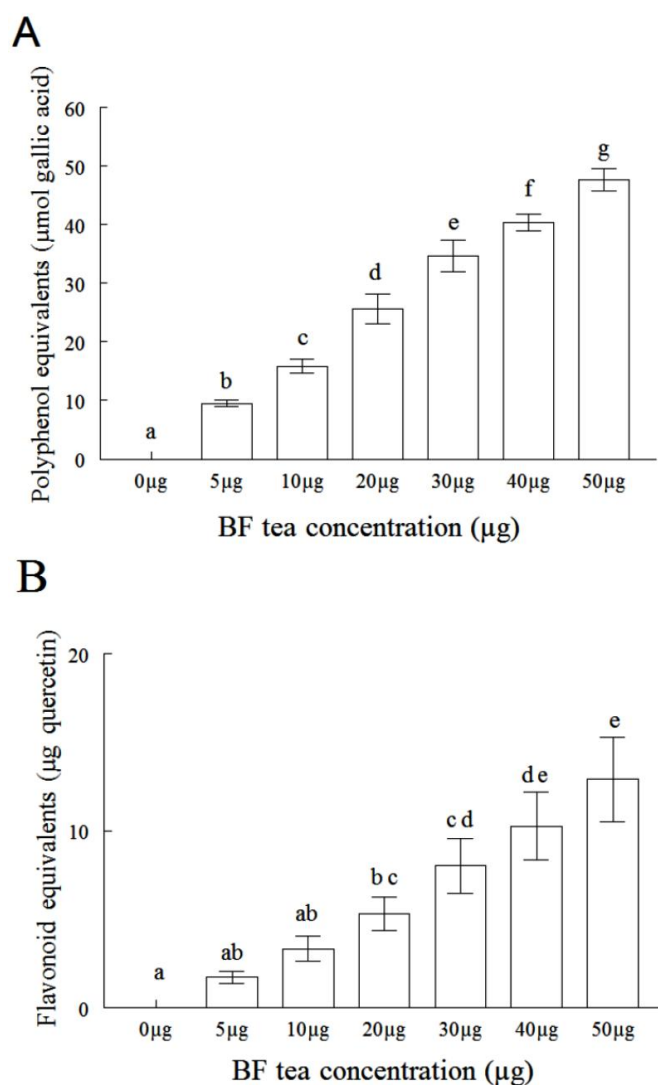
| Peak | Rt (min) | [M+H] <sup>+</sup> | MS fragmentation                  | Compound   |
|------|----------|--------------------|-----------------------------------|--|
|      |          | ( <i>m/z</i> )     | [M+H] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> ) |  |
| 1    | 12.6     | 757.1              | 611.1; 302.8                      | Quercetin-3- <i>O</i> -(2-rhamnosyl) rutinoside  |
| 2    | 13.9     | 741.1              | 595.1; 286.8                      | Kaempferol-3- <i>O</i> -(2-rhamnosyl) rutinoside |
| 3    | 15.0     | 611.1              | 302.8                             | Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside                |
| 4    | 16.1     | 595.1              | 286.9                             | Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside               |

### 3.2. Antioxidant properties of BF tea

The analysis of the total phenolic compounds and flavonoid levels presented in Figures 1A and 1B, respectively, shows a large amount of these components in the BF

tea. Figure 2 presents the properties of the BF tea in iron chelating (A) and DPPH<sup>•</sup> radical scavenging (B). We observed a significant reduction in iron (Fe<sup>2+</sup>) chelation activity ( $p \leq 0.05$ ) and also a significant DPPH<sup>•</sup> scavenging activity of the BF tea ( $p \leq 0.05$ ). However, no significant NO scavenging activity of the BF tea was observed (data not shown).

Figure 1

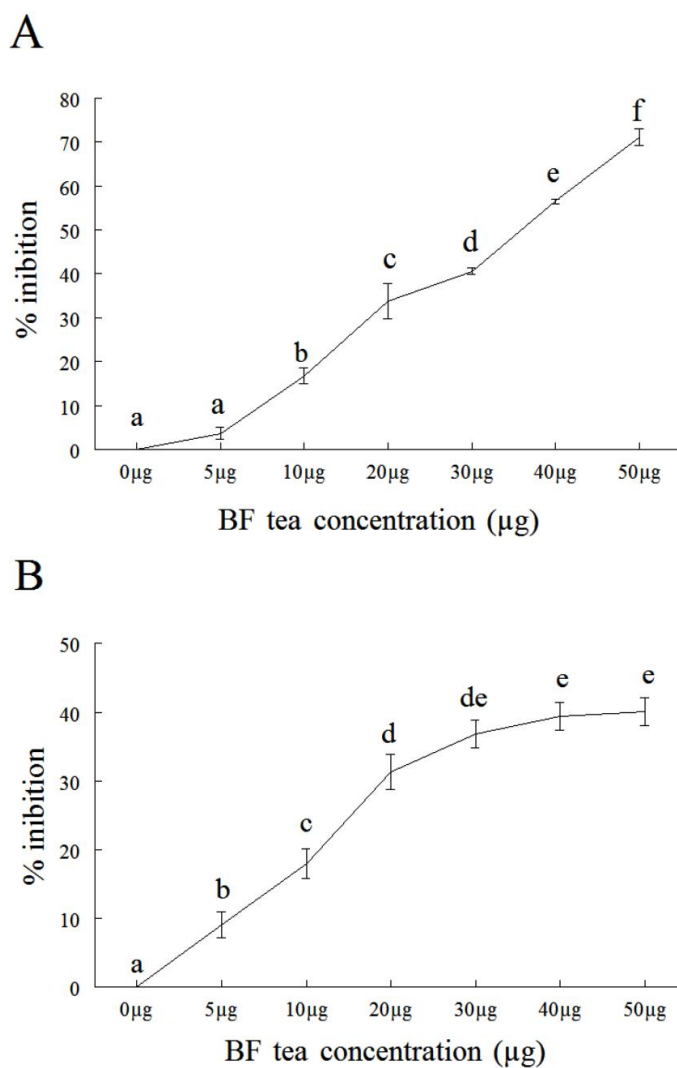


**Figure 1:** Total phenolic (A) and flavonoids (B) contents of the BF tea. In 1A the values are expressed in equivalents to µmol of phenols observed in gallic acid (233,188mg of total phenols per gram of BF dried leaf). In 1B the values are expressed



in equivalents to  $\mu\text{g}$  of flavonoids observed in quercetin (161,486mg of flavonoids per gram of BF dried leaf). The values are expressed as means  $\pm$  standard error ( $n = 3$ ). Means with different letters were significantly different at the level of  $p < 0.05$ .

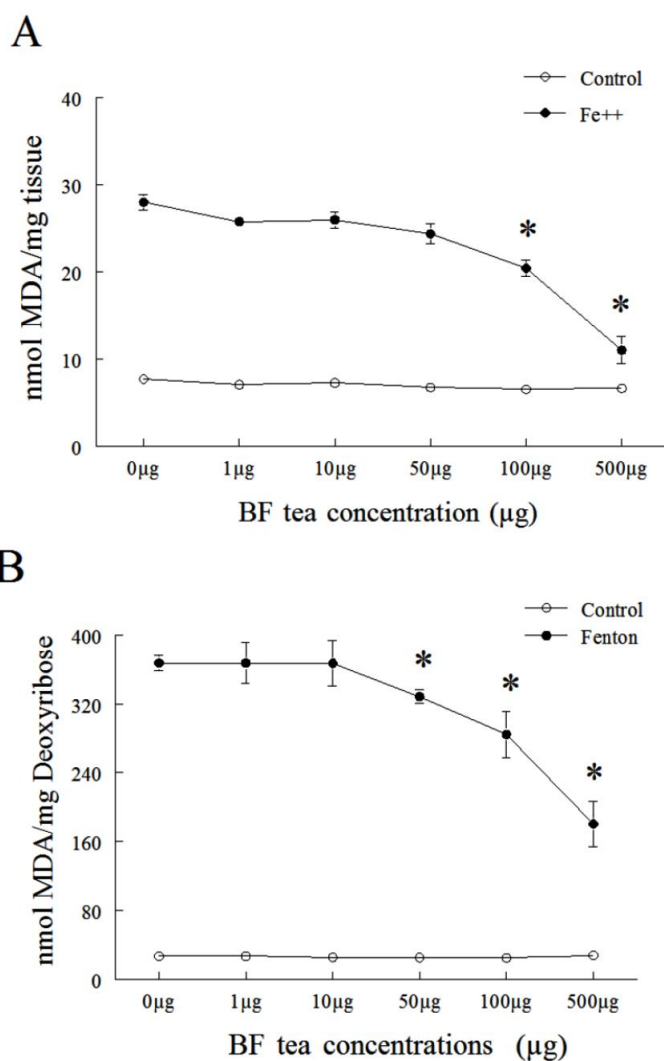
Figure 2



**Figure 2:** Analysis of reduced iron chelation (A) and DPPH $\cdot$  radical scavenging (B) properties of the BF tea. Both in 2A and 2B the values are expressed as percentage of inhibition in relation to control (absence of tea). Values are expressed as means  $\pm$  standard error ( $n = 3$ ). Means with different letters were significantly different at the level of  $p < 0.05$ .

The BF tea also decreased the high TBA-RS levels depicted by reduced iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in lipids extracted from chicken egg yolk ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 3A). Moreover, the increased deoxyribose degradation induced by Fenton reaction was reduced by the higher concentrations of the BF tea ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 3B).

Figure 3

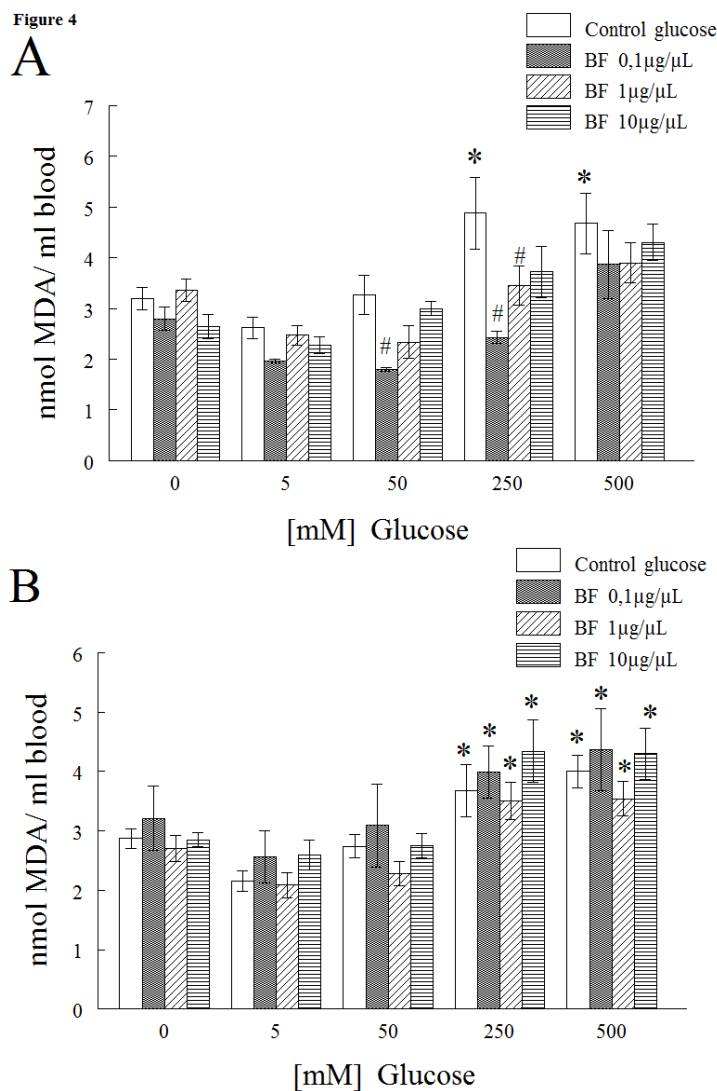


**Figure 3:** Analysis of TBA-RS in lipids extracted from chicken egg yolk (A) and deoxyribose degradation (B). In 3A the values are expressed in nmol of MDA per mg of lipids. In 3B the values are expressed in nmol of MDA per mg of deoxyribose. The

results are expressed as means  $\pm$  standard error (n = 3). The \* indicates significant difference in comparison to a condition without BF tea ( $p < 0.05$ ).

### **3.3. Effect of BF tea on human erythrocytes incubated with high glucose concentrations**

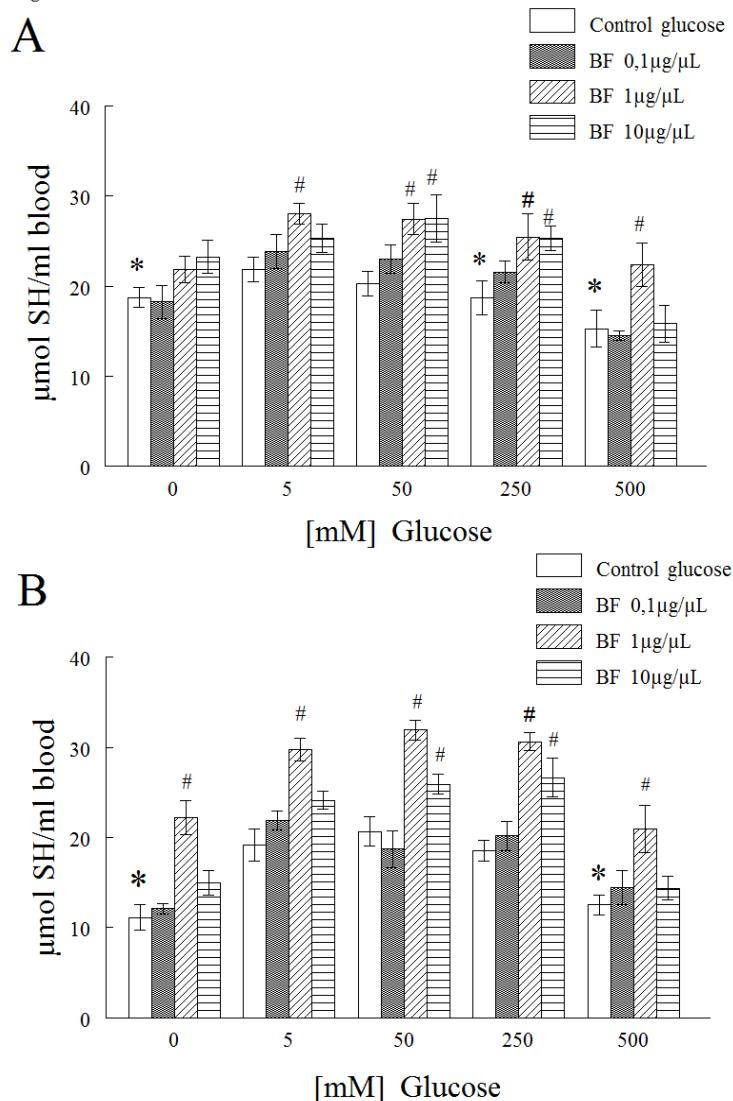
Figure 4 shows the lipid peroxidation in human erythrocytes incubated for 24 hours (A) or 48 hours (B) with different concentrations of glucose and/or BF tea. The high glucose concentrations *in vitro* resulted in a significant increase in human erythrocytes TBA-RS levels at the highest glucose concentrations (250 and 500mM), at both 24 and 48 hours incubation ( $p \leq 0.05$ ). It was observed that the BF tea in all concentrations (0.1; 1.0 and 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) was effective in limiting lipid peroxidation induced by high glucose concentrations in 24 hours of incubation ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 4A). Moreover, the different concentrations of BF tea showed diverse results. The lowest tea concentrations tested (0.1 and 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) were most effective to maintain the erythrocytes TBA-RS levels near to the content observed at the physiological glucose condition (5mM) ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 4A). In 48 hours of incubation, any of BF tea concentrations were effective to reduce the lipid peroxidation determined by high glucose concentrations (Figure 4B).



**Figure 4:** Evaluation of the lipid peroxidation in human erythrocytes incubated for 24 hours (A) or 48 hours (B) with different concentrations of glucose and/or the BF tea. Results are expressed in nmol of malondialdehyde (MDA) per mL of incubated blood. Values are expressed as means  $\pm$  standard error ( $n = 5$ ). The \* indicates significant difference in comparison to control glucose (5mM) ( $p < 0.05$ ) and # indicates significant difference between the different BF tea concentrations in each glucose concentration ( $p < 0.05$ ).

Figure 5 presents the NPSH levels in human erythrocytes incubated for 24 hours (A) or 48 hours (B) with different glucose concentrations and/or the BF tea. The NPSH levels in human erythrocytes were also significantly changed by high glucose concentrations, both after 24 and 48 hour incubation ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 5A and 5B, respectively). The highest glucose concentrations (250 and 500mM) and also the hypoglycemic condition (erythrocytes incubated without glucose) depicted a significant decrease in the NPSH levels in erythrocytes at 24 and 48hs incubation ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 5A and 5B, respectively). Similarly to the observed in TBA-RS analysis, the different concentration of BF tea showed diverse results regarding the NPSH levels in erythrocytes incubated with high glucose concentrations. Furthermore, the BF tea led to an increase of the  $-SH$  levels in the without glucose condition and in the physiological glucose condition (5mM), showing a *per se* effect of the BF tea in increasing antioxidant defenses. Here, the highest tea concentrations (1.0 and 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) were more effective to increase the erythrocytes  $-SH$  levels, both after 24 and 48 hours of incubation ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 5A and 5B, respectively).

Figure 5



**Figure 5:** Evaluation of the levels of NPSH in human erythrocytes incubated for 24 hours (A) or 48 hours (B) with different concentrations of glucose and/or the BF tea. Results are expressed as  $\mu\text{mol}$  of SH per mL of incubated blood. Values are expressed as means  $\pm$  standard error ( $n = 5$ ). The \* indicates significant difference in comparison to control glucose (5mM) ( $p < 0.05$ ) and # indicates significant difference between the different BF tea concentrations in each glucose concentration ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

BF is one of the *Bauhinia* species mostly used as hypoglycemic agent in folk medicine in southern of Brazil (Trojan-Rodrigues et al., 2012) and the present study showed that the tea (infusion) of BF leaves, as used in folk medicine, was able to decrease the oxidative damage induced by high glucose concentrations in human erythrocytes *in vitro*.

The benefits of the BF tea observed in this study could be related to its high polyphenols and flavonoids levels (Fig 1A and 1B). Many studies have demonstrated high levels of these compounds in ethanol extracts of plants from the *Bauhinia* genus (Sousa et al., 2004; Sayago et al., 2013). However, our study identified high levels of polyphenols and flavonoids in a tea preparation that is traditionally used by the population, the infusion of the leaves in hot water. The main components were identified as quercetin and kaempferol glycosides (Table 1), being in accordance to the chemical composition of *Bauhinia* genus based on flavonoids derivatives. The phenolic compounds are widely distributed in plants and are well known to be powerful antioxidants through ROS scavenging and metal chelating activities (Brangoulo and Molan, 2011). In fact, the BF tea showed a significant  $\text{Fe}^{2+}$  chelating activity (Fig. 2A) and also caused a decrease in lipid peroxidation induced by  $\text{Fe}^{2+}$  in lipids from chicken egg yolk (Fig. 3A). It is well known that iron plays a central role in generating harmful oxygen species (Macáková et al., 2012) and the mechanism of  $\text{Fe}^{2+}$  chelation is important since that reduces its availability to interact with  $\text{H}_2\text{O}_2$ , thus decreasing the hydroxyl radical ( $\text{OH}^\bullet$ ) formation via Fenton reaction. The  $\text{OH}^\bullet$  radicals are well known as the most reactive between the radicals (Sakanaka et al., 2005) and the decrease in its generation could be understood as an important antioxidant mechanism. Furthermore, according to Macáková et al., (2012) flavonoids can scavenge  $\text{OH}^\bullet$  and/or superoxide

anion ( $O_2^-$ ) via a one electron transfer, and also act as metal chelating agents. In line with this, our analysis revealed that the BF tea also decreased the deoxyribose degradation induced by Fenton reaction (Fig. 3B). Moreover, we observed a significant DPPH $\cdot$  scavenging activity of the BF tea (Figure 2B). The DPPH $\cdot$  is a stable radical that is used as a convenient method for the antioxidant assay of biological materials (Nishizawa et al., 2005). The ability of a compound to neutralize the DPPH $\cdot$  radical could be related to its OH $\cdot$  radical scavenging potential.

Many studies have pointed out the benefits of flavonoids in the treatment of several diseases, reinforcing its importance for the human health (Saija et al., 1995; Lila, 2008). In fact, the antioxidant activity of BF is related to its components such as terpenes, steroids, aromatic acids, quinones, lactones and alkaloids (Cechinel Filho, 2009). However, a main component identified in hydro-alcoholic extracts of BF leaves is kaempferitrin (Sayago et al., 2013; Sousa et al. 2004). According to Sousa et al. (2004), kaempferitrin is only 2-3 times less potent than quercetin, a strong and well-characterized antioxidant. Furthermore, kaempferitrin presents an antioxidant potential at very low concentrations being able to inhibit the lipid peroxidation in different membrane models and to scavenge the DPPH $\cdot$  radical (Sousa et al. 2004).

In this study we also investigated the effects of the BF tea on lipid peroxidation and thiol oxidation induced by high glucose concentrations in human erythrocytes. Recent studies showed that the lipid peroxidation is increased in erythrocytes of diabetic patients compared to controls (Mallick et al., 2011). In fact, the erythrocytes have high polyunsaturated fatty acid content in their membranes, and also high concentration of hemoglobin. These characteristics make human erythrocytes a good model for the study of biomembranes oxidation in general (Martínez et al., 2012). Further, erythrocyte lipid



peroxidation may be associated with a variety of pathological events (Yang et al., 2006). We observed an increase in TBA-RS (Figure 4) and a decrease in NPSH levels (Figure 5) in human erythrocytes incubated with high glucose concentrations. This result was similar to that shown by Soares (2006). However, in the presence of the BF tea, the production of TBA-RS decreased and the NPSH levels increased, protecting from glucose oxidation. We believe that these results could be related with the ability of polyphenols and flavonoids, which are present in the BF tea, to interact with biomembranes (Saija et al. 1995) or their capacity to reduce/neutralize ROS formation (Brangoulo and Molan, 2011; Macáková et al., 2012). Moreover, the different effects of BF tea regarding the time of incubation could be attributed to an oxidative damage over the capacity of the tea to counteract it after 48 hours of incubation. In general, the BF tea was able to preserve the NPSH, mainly glutathione (GSH), that are naturally depleted in response to oxidative stress, thereby reducing the antioxidant defenses of the cells (Kassab and Piwowar, 2012). Furthermore, the results of TBA-RS and NPSH levels do not exhibited a proportional variation regarding the BF tea concentration (0.1, 1 or 10  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ ). Thus, more and specific studies must be carried out to perform a curve of BF tea concentrations that highlight which concentrations exhibit antioxidant or pro-oxidant activity. However, we believe that a variation in TBA-RS levels not necessarily should be accompanied by a variation in NPSH levels, mainly in *in vitro* studies were there are limited and specific biological components. In fact, the same BF tea concentration that depicted increases in lipid peroxidation, which could be associated with an increased oxidative damage, caused also an increase in NPSH levels. Thus, more and specific studies must be carried out to verify the effects of BF tea on routes of synthesis/degradation of NPSH groups, as well as in the complex cascade of reactions of lipid peroxidation.

Taken together, our results indicate that the antioxidant effects of the BF tea could be related to the presence of different phenolic and flavonoids components, which are able to act as DPPH<sup>•</sup> radical scavenger and also as iron chelators. We believe that these mechanisms can be responsible for the reduction in lipid peroxidation and also to the increase in NPSH levels in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations *in vitro*. Finally, more studies are necessary to identify the main components of the BF tea and also to evaluate its pharmacological use *in vivo* as a putative adjuvant of the DM treatment.

#### **Conflict of interest statement**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### **Acknowledgments**

The authors are grateful the FAPERGS, CAPES and CNPq. ACFS received fellowship from CAPES and MB from FAPERGS.

## Glossary

ANOVA – Analysis of variance;

BF – *Bauhinia forficata*;

DTNB – Ellman's reagent;

DM – Diabetes *mellitus*;

DPPH - 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl;

GSH – Reduced glutathione;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Hydrogen peroxide;

MDA – Malondialdehyde;

NO – Nitric oxide;

NPSH - Non protein –SH;

OH<sup>•</sup> - Hydroxyl radical;

ROS – Reactive oxygen species;

-SH – Sulfhydryl group

S1 – Low speed supernatant fraction;

TBA – Thiobarbituric acid

TBA-RS – Thiobarbituric acid reactive substances;

TCA – Trichloroacetic acid;

## 5. References

- Brangoulo, H.L., Molan, P.C., 2011. Assay of the antioxidant capacity of foods using an iron (II)-catalysed lipid peroxidation model for greater nutritional relevance. *Food Chemistry*. 125, 1126-1130.
- Cechinel Filho, V., 2009. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. *Phytotherapy Research*. 23, 1347-1354.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10, 178-182.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay - guided comparison. *Plant Science*. 163, 1161-1168.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82, 70-77.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Vinholes, J., Silva, S.T., Valentão, P., Andrade, P.B., 2012. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. *Food Chemistry*. 134, 894-904.
- Green, L.C., Wanger, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 126, 131-138.
- Hassan, W., Ibrahim, M., Nogueira, C.W., Ahmed, M., Rocha, J.B.T., 2009. Effects of acidosis and Fe (II) on lipid peroxidation in phospholipid extract: comparative effect of diphenyl diselenide and ebselen. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 28, 152-154.

International Diabetes Federation, 2012. About diabetes. Available from: <http://www.idf.org/about-diabetes> (accessed 28.07.2012).

Kassab, A., Piwovar, A., 2012. Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes. *Biochimie*. 94, 1837-1848.

Lila, M.A., 2008. Interactions between flavonoids that benefit human health, in: Gould, K., Davies, K., Winefield, C. (Eds.), *Anthocyanins: Biosynthesis, Function and Applications*. Springer, New York, pp. 306-323.

Macáková, K., Mladenka, P., Filipsky, T., Ríha, M., Jahodár, L., Trejtnar, F., Bovicelli, P., Silvestri, I.P., Hrdina, R., Saso, L., 2012. Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chemistry*. 135, 2584-2592.

Mallick, A.K., Maradi, R., Joshi, V.R., Shorey, G., Ahsan, M., 2011. Study on malondialdehyde as a marker of lipid peroxidation in male and female patients with type 2 Diabetes mellitus. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 8, 198-201.

Martínez, V., Ugartondo, V., Vinardell, M.P., Torres, J.L., Mitjans, M., 2012. Grape epicatechin conjugates prevent erythrocyte membrane protein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 4090-4095.

Nishizawa, M., Kohno, M., Nishimura, M., Kitagawa, A., Niwano, Y., 2005. Non-reductive scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) by peroxyradical: a useful method for quantitative analysis of peroxyradical. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 53, 714-716.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95, 351-358.

Oliveira, V.B., Yamada, L.T., Fagg, C.W., Brandão, M.G.L., 2012. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Research International*. 48, 170-179.

Puntel, R.L., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2005. Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain *in vitro*. *Neurochemical Research*. 30, 225-235.

Saija, A., Sclese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F., 1995. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology & Medicine*. 19, 481-486.

Sakanaka, S., Tachibana, Y., Okada, Y., 2005. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*. 89, 569-575.

Sayago, C.T.M., De Camargo, V.B., Barbosa, F., Gularte, C., Pereira, G., Miotto, S., Cechinel Filho, V., Puntel, R.L., Folmer, V., Mendez, A., 2013. Chemical composition and *in vitro* antioxidant activity of hydro-ethanolic extracts from *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* and *B. variegata*. *Acta Biologica Hungarica*. 64, 25-37 (DOI: 10.1556/ABiol.64.2013.1.3).

Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144-158.

Soares, J.C.M., Gabriel, D., Folmer, V., Augusti, G.R., Rocha, J.B.T., 2006. High concentrations of glucose can activate or inhibit human erythrocyte aminolevulinatase *in vitro* depending exposure time. *American Journal of Biotechnology and Biotechnology*. 2, 180-185.

Sousa, E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T.B., Pizzolatti, M.G., Szpoganicz, B., Silva, F.R.M.B., 2004. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of

Kaempferol-3,7-O-(r)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *Journal of Natural Products*. 67, 829-832.

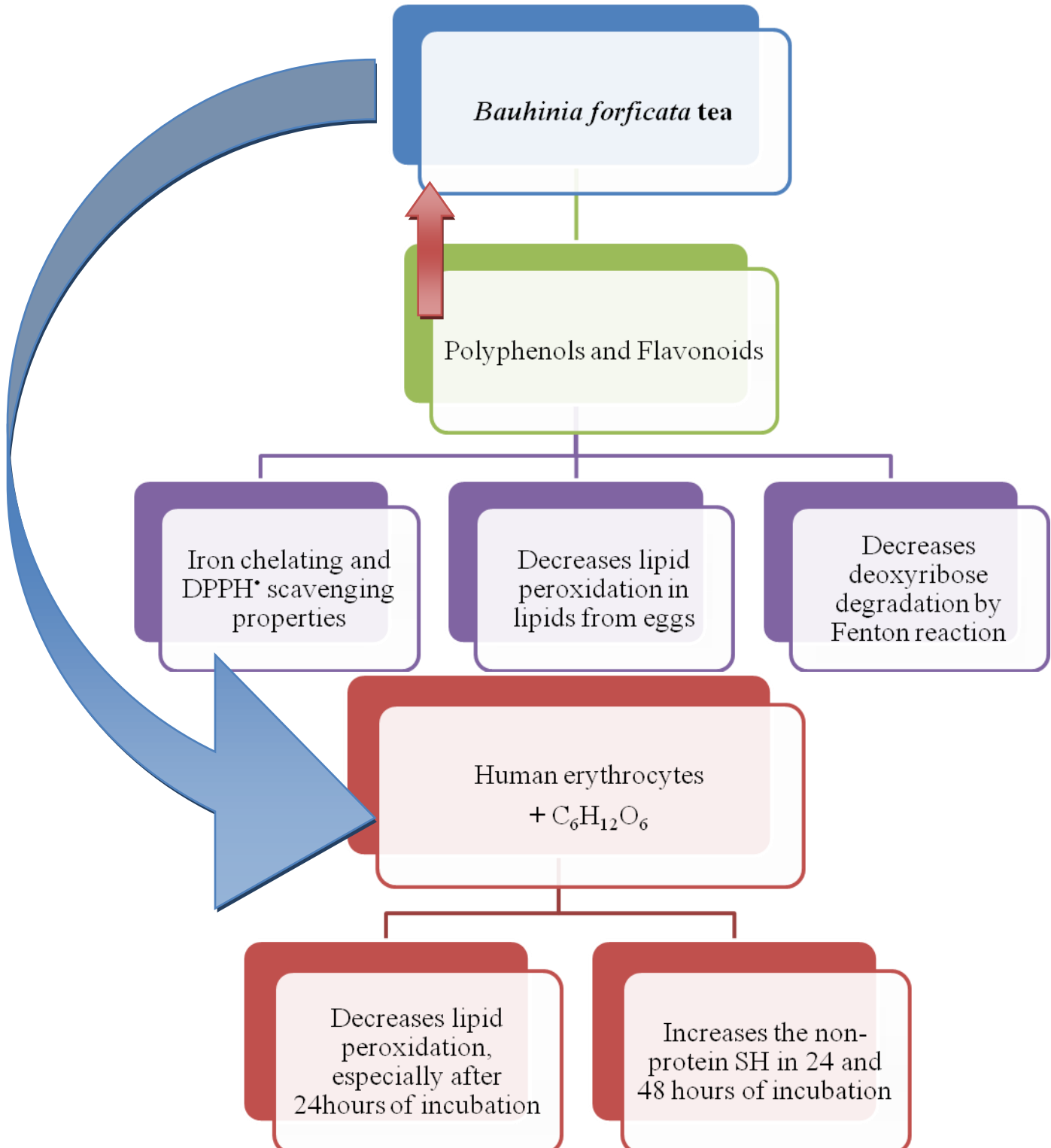
Trojan-Rodrigues, M., Alves, T.L.S., Soares, G.L.G., Ritter, M.R., 2012. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 139, 155-163.

Yamagishi, S., Maeda, S., Matsui, T., Ueda, S., Fukami, K., Okuda, S., 2012. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1820, 663-671.

Yang, H., Chen, S., Chang, N., Chang, J., Lee, M., Tsai, P., Fu, H., Kao, W., Chiang, H., Wang, H., Hseu, Y., 2006. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 44, 1513-1521.

## Table of Contents

### The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations





## 5.2. MANUSCRITO CIENTÍFICO 2

O chá de *Bauhinia forficata* reduz o dano oxidativo e morfológico em diferentes tecidos de camundongos intoxicados por estreptozotocina

*Bauhinia forficata* tea reduces oxidative and morphological damage in different tissues of mice intoxicated by streptozotocin

Andréia C. F. Salgueiro, Carina Q. Leal, Matheus C. Bianchini, Ianeli O. Prado, Felipe W. Langer, Marcelo L. Veiga, Robson L. Puntel, Vanderlei Folmer, Félix A. Soares, Gustavo O. Puntel

Este manuscrito está organizado de acordo com as normas para submissão na Revista Biochimie. A Biochimie é um importante periódico da área das ciências biológicas e publica trabalhos científicos que considerem a investigação de variáveis bioquímicas e de biologia molecular.

***Bauhinia forficata* tea reduces oxidative and morphological damage in different tissues of mice intoxicated by streptozotocin**

Andréia C. F. Salgueiro <sup>a</sup>, Carina Q. Leal <sup>a</sup>, Matheus C. Bianchini <sup>a</sup>, Ianeli O. Prado<sup>a</sup>,  
Felipe W. Langer <sup>b</sup>, Marcelo L. Veiga <sup>b</sup>, Robson L. Puntel <sup>a</sup>, Vanderlei Folmer <sup>a</sup>, Félix  
A. Soares <sup>c</sup>, Gustavo O. Puntel <sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA – Campus Uruguaiana, Uruguaiana, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal de Santa Maria, UFSM – Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Departamento de Morfologia, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Federal de Santa Maria, UFSM – Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE) - Departamento de Química, Santa Maria, RS, Brasil.

\*Corresponding author:

Gustavo Orione Puntel - Universidade Federal de Santa Maria, UFSM – Centro de Ciências da Saúde CCS - Departamento de Morfologia, Av. Roraima nº 1000 - Cidade Universitária - Bairro Camobi - CEP: 97105-900 - Santa Maria - RS - Brazil

Phone: +55-55-3220-8239

Fax: +55-55-3220-8978

E-mail: [gustavopuntel@yahoo.com.br](mailto:gustavopuntel@yahoo.com.br)

### **Abbreviations**

BF – *Bauhinia forficata*; DM – *Diabetes mellitus*; STZ – Streptozotocin.

## ABSTRACT

Medicinal plants are widely used for *Diabetes mellitus* (DM) treatment. Thus, many studies are important to elucidate the medicinal properties as well as the antioxidant potential of these plants. Streptozotocin (STZ) is a common drug used to experimentally induce Diabetes mellitus (DM) and the present study was conducted to evaluate effects of *Bauhinia forficata* (BF) tea, one the most commonly used plants for DM treatment, over oxidative and morphological changes in different tissues of mice intoxicated by STZ. Young male mice received or not a single STZ dose (100mg/kg *i.p.*) and part them was treated with BF tea (1mg/mL) in drinking water. Mice treated with BF tea and also STZ were divided in two groups named pre-treated (BF+STZ) and post-treated (STZ+BF). Our results showed that both pre and post-treatment with BF tea were effective to reduce weight loss, while only pre-treatment reduced the hyperglycemia triggered by STZ treatment. Furthermore, both pre and post-treatment reduced oxidative damage observed in liver, kidney and brain of STZ mice. BF tea also minimized changes determined by STZ intoxication in non enzymatic and enzymatic antioxidant levels. Additionally, BF treatment reduced morphological damage triggered by STZ in liver, kidney and brain of mice intoxicated. In general, BF tea was well accepted as a drink for the mice and did not depicted anyone significant effect *per se* in all analyzed parameters. Based on our results, the BF tea, as popularly used, was effective in reducing oxidative and morphological damage induced by STZ in mice. In conclusion, these data highlight the benefits of BF tea as an agent to be used as adjuvant in clinical conditions. However, further studies should be conducted to improve the knowledge about effects of medicinal plants in general, and particularly of BF, in the treatment of human disorders.

**KEYWORDS:** *Bauhinia forficata*; Streptozotocin; Oxidative damage; Morphological damage; Antioxidant levels.

## 1. INTRODUCTION

Diabetes *mellitus* (DM) is a chronic syndrome that starts when pancreas  $\beta$ -cell does not produce sufficient insulin or when peripheral body tissue cannot effectively use them [1]. This clinical condition results in a deregulation of glucose and lipid metabolism [2], and leads to hyperglycemia associated with long-term damage to several organs and tissues [1]. Many studies indicate that hyperglycemia increases production of reactive oxygen species (ROS) by various routes [3, 4, 5]. Moreover, in DM or hyperglycemia the body antioxidant defenses are also in a vulnerable condition [6].

Streptozotocin (STZ) is a common drug used to experimentally induce DM [7, 8], both in rats and mice [8, 9, 10, 11]. STZ destroys pancreatic  $\beta$ -cells by alkylation of DNA which results in a reduced synthesis and release of insulin [11]. Evidence indicates that STZ toxicity is due to similarity with glucose molecule, allowing its internalization via glucose transporters [12]. Furthermore, the increased production of ROS has been shown to be involved in fragmentation of pancreatic  $\beta$ -cells DNA [13, 14]. In addition of hyperglycemia, STZ-treated animals exhibit many diabetic complications mediated through oxidative stress, such as diabetic neuropathy and diabetic retinopathy [15], and others such as weight loss [8, 11] and dyslipidemia [9].

It is well known that over time many medicinal plants have been popularly used for treatment of diabetes symptoms. Among these plants is the *Bauhinia forficata* specie (BF), commonly used as an antidiabetic herbal remedy in southern Brazil [16]. Plants of *Bauhinia* genus (Fabaceae, Leguminosae) are widely distributed in countries of Africa, Asia and South America and consist of approximately 300 species popularly known as “cow’s paw”, because of their leaf shape [17]. Protective effects of exogenously administered antioxidants, such as those derived from medicinal plants, have been extensively studied in animal models within recent years [7], thus providing some insight regarding the relationship between oxidative stress, diabetes, and its complications. In fact, although many studies have already evaluated antioxidant and antidiabetic effects of different BF extracts [18, 19, 20], few of them have evaluated the effects of BF leaf tea, as it is widely used in folk medicine.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of BF leaf tea (*B. forficata* Link subsp. *pruinosa* (Vogel) Fortunato & Wunderlin), over the biochemical and morphological changes in different tissues of mice intoxicated by STZ.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### ***2.1. Ethical approval***

Animals were maintained and used in accordance with guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Pampa, Brazil.

### ***2.2. Chemicals***

Reagents thiobarbituric acid (TBA), Ellman's reagent (DTNB), and STZ were supplied by Sigma–Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Other used reagents were obtained from local suppliers.

### ***2.3. Tea Preparation***

BF tea was prepared with naturally dried leafs. BF leaves were collected from *campus* of Federal University of Pampa, Uruguaiiana-RS, Brazil, in September (spring) of 2011. The botanical identification of BF leaves samples was confirmed and a voucher specimen (number ICN 167491; *B. forficata* Link subsp. *pruinosa* (Vogel) Fortunato & Wunderlin) was deposited at ICN Herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil. BF leaves were dried at room temperature for five days. Dried leaves were weighed and placed in infusion in water at 80 ° C for 15 minutes just before its use for the animal's treatment at a final concentration of 1mg/mL.

### ***2.4. Experimental animals***

Adult male swiss albino mice were obtained from our own breeding colony and maintained in an air-conditioned room (20–25 °C) under a 12h light/dark cycle, and with water and food *ad libitum*. Mice were divided in 5 different groups:

1. Control (n=10): Mice that received only vehicle Na-citrate buffer (0.05M; pH 4.5) injected intraperitoneally (*i.p*) and drank water during six weeks of treatment;

2. STZ (n=10): Mice that received a single dose of STZ (100mg/kg, *i.p.*) freshly dissolved in citrate buffer (0.05M; pH 4.5) and drank water during six weeks of treatment;

3. BF (n=10): Mice that received only the vehicle citrate buffer (0.05M; pH 4.5) and drank BF tea (1mg/mL), in drinking-water, during six weeks of treatment;

4. STZ+BF (n=10): Mice that received a single dose of STZ (100mg/kg, *i.p.*) freshly dissolved in citrate buffer (0.05M; pH 4.5) and drank BF tea (1mg/mL), in drinking-water, during six weeks of treatment;

5. BF+STZ (n=10): Mice that drank BF tea (1mg/mL), in drinking-water, during two weeks (pre-treatment), after received a single dose of STZ (100mg/kg, *i.p.*) freshly dissolved in citrate buffer (0.05M; pH 4.5) and drank BF tea, in drinking-water, during six weeks.

Before the STZ administration the animals were fasted for a period of four hours. Body weight was measured weekly. Food and drink intake were measured every time they were exchanged, generally three times for week. BF tea was replaced daily in order to avoid the lost of tea properties.

## **2.5. Biochemical Analysis**

### **2.5.1. Analysis in blood tissue**

Mice were killed by overdose of ethylic ether and whole blood was collected by cardiac puncture in heparinized tubes. Analyzes of blood glucose, triglycerides and total cholesterol levels were performed using commercial kits (Labtest, Minas Gerais/Brazil).

### **2.5.2. Tissue preparation**

Liver, kidney, brain and pancreas were quickly removed and placed on ice. A sample of these organs was collected for histological analysis and other pieces of the liver, kidney and brain were homogenized within 10 min in cold saline (NaCl 150mM). The homogenates were centrifuged at 2000×g at 4°C for 10 min to yield a low-speed supernatant fraction (S1) that was used for biochemical analysis.

### **2.5.3. Markers of oxidative damage**

***TBA-RS levels***

TBA-RS levels were determined in S1 samples according method described by Ohkawa et al. [21]. TBA-RS levels were measured spectrophotometrically (532 nm) using a standard curve of MDA and corrected by protein content.

***DCF-RS levels***

DCF-RS levels were determined in S1 samples according Puntel et al. [22]. DCF-RS levels were determined by fluorimetric analysis (Ex: 488nm; Em: 520nm) using a standard curve of DCF and the results were corrected by protein content.

 ***$\delta$ -ALA-D activity assay***

$\delta$ -ALA-D enzyme activity was assayed in S1 samples according Sassa [23], in a set of tubes with or without DTT (2mM) according Puntel et al.[24]. The enzyme activity was expressed according to its reactivation index calculated as follows:

$$\frac{\delta\text{-ALA-D activity with DTT} - \delta\text{-ALA-D activity without DTT} \times 100\%}{\delta\text{-ALA-D activity with DTT}}$$

***2.5.4. Antioxidant defenses******Non protein -SH levels (NPSH)***

NPSH levels were determined in S1 samples according Ellman [25] with some modifications like were described in Puntel et al. [22]. SH levels were determined spectrophotometrically (420nm) and the results were calculated in relation to a standard curve constructed with GSH at knew concentrations and also corrected by protein content.

***Ascorbic Acid (AA)***

AA levels were determined in S1 samples according Roe and Kuether [26]. AA levels were determined spectrophotometrically (520nm) and the results were calculated in relation to a standard curve constructed with AA at knew concentrations and also corrected by protein content.

### ***CAT activity***

CAT enzyme activity was determined in S1 according Aebi [27]. The kinetic analysis of CAT was measured at 240 nm and the results were expressed as nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg protein/min.

### ***SOD activity***

SOD enzyme activity was determined in S1 according Misra & Fridovich [28]. The kinetic analysis of SOD was measured at 480nm and the results were expressed as units/mg protein.

#### ***2.5.5. Protein determination***

Protein content was determined in S1 samples according Bradford [29] and measured spectrophotometrically (595nm) and bovine serum albumin was used to construct a standard curve.

#### ***2.5.6. Histological analysis***

One sample of liver, kidney, brain and pancreas was used for histopathological analysis in order to analyze the histological changes depicted by STZ and possible modulated by BF tea treatment. Summary, we analyzed the hepatocyte area in hepatic tissue, the islets of Langerhans area in pancreatic tissue, the corpuscular area in renal tissue, and the total number of cellular nucleus in brain tissue. After excised, the tissues were maintained in buffered formaldehyde solution (10%) until the microscopic preparation and staining with hematoxylin and eosin.

### ***2.6. Statistical analysis***

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan post hoc test in the biochemical analysis and by Tukey's multiple comparison test in the histological analysis, when appropriate. Differences between groups were considered significant when  $p \leq 0.05$ .

## **3. RESULTS**

### **Body weight gain, food and drink intake and glycemic and lipid profile**



Mice body weight gain during treatment is shown in Figure 1A. STZ-treated mice showed a significant weight loss ( $p < 0.05$ ), which was reduced by BF tea. Moreover, food and drink intake were not significantly different among treated groups (Figure 1B and 1C, respectively).

Blood glucose level of STZ as well as STZ post treated with BF tea mice were significantly higher than the control untreated levels ( $p < 0.05$ ). However, we observed that pre-treatment with BF tea reduced blood glucose levels to values similar to those observed in control untreated mice (Figure 2A). On the other hand, the lipid profile, measured through the analysis of total cholesterol and triglycerides levels, were not significantly different (Figure 2B and 2C, respectively). To note that mice treated only with the BF tea do not presented significant changes in glycemic and lipid profile.

### **Oxidative damage and antioxidant defenses**

STZ treatment increased TBA-RS and DCF-RS levels both in liver (Figure 3A and 3B, respectively) and in kidney (Figure 4A and 4B, respectively) ( $p < 0.05$ ). In these cases, both pre and post-treatment with BF tea reduced TBA-RS levels to control untreated values (Figure 3A and 4A, respectively), while control DCF-RS levels was only restored by pre-treatment with BF tea (Figure 3B and 4B, respectively). In brain, TBA-RS levels were significantly increased by STZ treatment and only post-treatment with BF tea reduced these levels to control untreated values, while pre-treatment increased them (Figure 5A). DCF-RS levels in brain were not significantly changed by anyone treatment (Figure 5B). Reactivation index of  $\delta$ -ALA-D enzyme was significantly decreased by STZ treatment in liver and in brain tissues (Figure 3C and 5C, respectively) ( $p < 0.05$ ), while no one difference was observed in kidney (Figure 4C). In liver only pre-treatment with BF tea increased the  $\delta$ -ALA-D enzyme activity to control untreated values (Figure 3C) ( $p < 0.05$ ), and in brain post-treatment was most effective to increased these levels (Figure 5C).

Liver NPSH and AA levels were significantly increased by STZ treatment and only pre-treatment with BF tea reduced NPSH levels (Figure 3D), while only post-treatment with BF tea reduced AA levels to control untreated values (Figure 3E) ( $p < 0.05$ ). In kidney NPSH levels were not significantly changes by anyone treatment (Figure 4D), while AA levels were significantly increased by STZ treatment and both

pre and post-treatment with BF tea reduced AA levels to control untreated values (Figure 4E) ( $p < 0.05$ ). In brain, NPSH levels were significantly increased by STZ treatment and post-treatment with BF tea reduced these levels to control untreated values (Figure 5D) ( $p < 0.05$ ). Furthermore, the brain AA levels were not significantly changed by anyone treatment (Figure 5E). Liver SOD enzyme activity was significantly increased in STZ-treated mice and both pre and post-treatment with BF tea reduced SOD activity to control untreated values (Figure 3F) ( $p < 0.05$ ). Kidney SOD enzyme activity (Figure 4F) as well as liver and kidney CAT enzyme activity (Figure 3G and 4G, respectively) were not significantly changed by anyone treatment. In brain, both SOD and CAT enzyme activities were significantly increased in STZ-treated mice (Figure 5F and 5G, respectively) ( $p < 0.05$ ). Only pre-treatment with BF tea reduced brain SOD activity to control untreated values (Figure 5F), while both pre and post-treatment with BF tea reduced brain CAT activity to control untreated values (Figure 5G).

It is an important note that mice treated only with BF tea do not show significant changes in biochemical markers of oxidative damage and/or antioxidant defenses.

### **Histological analysis**

Liver of STZ-treated animals presented a significant increase in hepatocyte area, which was decreased by BF tea treatment (Figure 6) ( $p < 0.05$ ). In kidney, STZ treatment determined a significant increase in both renal corpuscular and subcapsular space area, which were decreased by BF tea treatment (Figure 7E and 7F) ( $p < 0.05$ ). Although renal glomerular area was not significantly changed by STZ intoxication, the BF treatment alone decreased significantly the values observed in STZ-treated animals (Figure 7G) ( $p < 0.05$ ). Furthermore, the number of cellular nuclei were significantly decreased in brain tissue of STZ-treated animals, and only the pre-treatment with BF tea was effective in modulate this decrease (Figure 8) ( $p < 0.05$ ). In pancreas, the islets area was not significantly different among treated groups (data not shown). Moreover, the BF tea treatment without STZ intoxication did not determine any histological differences in comparison to untreated control.

#### 4. DISCUSSION

BF is one of medicinal plants mostly used as antidiabetic agent in folk medicine [16] and the present study showed that tea (infusion) of BF leaves reduced oxidative and morphological changes determined by STZ intoxication in different tissues of mice.

Our results showed that BF tea was well accepted as beverage for mice since there were no differences in liquid intake among groups that drank water or tea (Figure 1C). Furthermore, the mean body weight of STZ-treated mice was significant lower than those of control after 6 weeks of treatment, although no differences were observed in food and liquid intake (Figure 1B and 1C). We believe that a possible reduction in circulating insulin levels of STZ-treated mice could be linked to a constant increased catabolic state of these animals, leading to weight loss. This condition was already reported by Saltiel & Kahn [2] which described that the lack of insulin in humans leads to increases in lipolysis, glycogenolysis and protein breakdown. Furthermore, Wang et al. [11] reported that STZ-induced diabetes in mice is accompanied by a severe loss in body weight. In fact, STZ is a well known drug that destroys pancreatic islets leading to a reduction of insulin secretion to blood [12, 13]. However, we did not identify significant histological changes in pancreatic islets area among different treatments (data not show). Moreover we believe that the measurement of circulating insulin levels should be investigated in future studies to improve this hypothesis.

The increased glycemia observed in STZ-treated animals is in accordance with previous studies [8, 9, 10, 11, 30] (Figure 2). In BF pre-treated animals the blood glucose was significantly reduced comparing with STZ alone. This result could be related to a protection of pancreatic  $\beta$ -cells depicted by BF tea against the STZ toxicity, minimizing the lack of circulating insulin levels, or due to a possible insulin-like effect of the BF tea, increasing the glucose uptake by tissues. In line with this the hypoglycemic effect of isolated compounds of BF were already related to their possible insulin-like effect [19]. Moreover, the inhibition of glucose absorption in gut by BF was already related as a mechanism to decreases glycemia [31]. However, more studies are necessary to investigate this hypothesis since that we not found other study that have evaluated effects of medicinal plants pre-treatments over the toxicity determined by STZ in mice. On the other hand, the absence of significant effects of BF tea in post-

treated mice is in accordance with results observed by Volpato et al. [10] that used high dose of BF leaves.

Total cholesterol and triglycerides levels were not significantly different among treatments (Figure 2). In accordance with this Pepato et al. [30] also observed no differences in cholesterol and triglycerides levels in rats STZ-treated compared to controls. Contradictorily, Damasceno et al. [9] observed that STZ-treated rats showed increase in total cholesterol and triglycerides levels, although oral administration of BF aqueous extract was not effective in reducing these levels.

In general, an increase in TBA-RS levels in liver, kidney and brain and DCF-RS levels in liver and kidney, as well as a reduction in the  $\delta$ -ALA-D enzyme reactivation index in liver and brain were observed in STZ-treated animals. An increased ROS production determined by STZ intoxication was already related by Szkudelski [13]. Maritim et al. [7] pointed also that the STZ or alloxan intoxication results in a general increase in TBA-RS levels. The NPSH levels, glutathione (GSH) as a major compound, were increased by STZ treatment in liver and brain, and AA levels in liver and kidney. SOD activity was increased by STZ treatment in liver and brain, and CAT only in brain. These results could be explained by a compensatory response against the oxidative damage determined by STZ. In fact, an increase in GSH levels and SOD and CAT activity following STZ intoxication was already related by Maritim et al. [7] and Pieper et al. [32]. A similar condition was observed in blood vessels of rats with STZ-induced diabetes [32]. Moreover, Maritim et al. [7] reported that an increased GSH concentration was observed in kidney and lens of rats STZ-intoxicated.

It was observed that both pre-treatment and post-treatment with BF tea seems to minimize oxidative stress determined by STZ at certain and diverging degrees. In fact, animals treated with BF tea showed similar levels of oxidative damage markers and also antioxidant levels than control. Therefore, we believe that the BF tea was able to minimize the oxidative damage increase determined by STZ without increase the physiological rate of antioxidant defenses. Furthermore, these effects of BF tea could be attributed to its antioxidant potential, which is also currently being investigated by our research group *in vitro*.

Oxidative damage was accompanied by significant histological changes in liver, kidney and brain of STZ-treated mice. In general, these histological changes are related with the organ dysfunctions, and the BF tea was able to minimize such changes. Similar

to our results, Honjo et al. [33]; Shinde & Goyal [34] and Kamalakkannan & Prince [35] also described histological changes in organs of STZ-treated mice. Hepatic changes showed for Honjo et al. [33] were characterized by hypertrophy of hepatocytes due to an increase in intracytoplasmic eosinophilic granules. In kidney, a luminal dilatation was marked and attributed to be related with persistent hyperglycemia [33]. In pancreas, authors reported a decrease in the islets size and a decrease in  $\beta$  cells number [33]. Changes in pancreatic cells were not observed in our study and we believe that this could be due to reduced exposure time and/or the use of a single STZ dose. However, unlike our results, Kamalakkannan & Prince [35] do not observe changes in brain tissues of STZ-treated mice. We highlight that BF tea used by us do not determined hepatotoxic, nephrotoxic and/or neurotoxic effects. In fact, BF tea was able to protect against alterations triggered by STZ intoxication, an effect that could be assigned to the antioxidant effects of this medicinal plant previously demonstrated [19].

Protective effects of exogenously administered antioxidants have been extensively studied in animal models within recent years, thus providing some insight into the relationship between free radicals, diabetes, and its complications [7]. According Pan et al. [36] medicinal plant extracts and natural products are complex mixtures of hundreds of primary and secondary metabolites and multiple constituents are usually responsible for its therapeutic effects. These effects are based on the synergic response of its constituents, which can hardly be separated into active parts [37]. The therapeutic action of BF is related to its phenolic constituents [17, 37] According Brangoulo & Molan [38] phenolic compounds are widely distributed in plants and are well known to be powerful antioxidants through ROS scavenging. The antioxidant activity of BF is related to its components such as terpenes, steroids, aromatic acids, quinones, lactones and alkaloids [17].

Taken together, our results indicate that the BF tea can reduce blood glucose levels and oxidative damage in mice intoxicated by STZ. Furthermore, BF tea treatment normalized antioxidant response triggered by STZ. These data reinforce the importance of studies conducted to investigate *in vivo* effects of medicinal plants mostly used by population.

**Acknowledgments**

Authors are grateful to CAPES and CNPq. ACFS received fellowship from CAPES.

**Authors' contributions**

ACFS was involved in data research, data analysis, and writing of the manuscript. CQL, MB, IOP, FWL and MLV were involved in data research; RLP, VF and FS contributed to the planning of the research and writing of the manuscript; GOP contributed to the planning of the research, advised at all stages of the research, and contributed to the writing of the manuscript.

## 5. REFERENCES

- [1] IDF. International Diabetes Federation. URL: <http://www.idf.org/about-diabetes> (Accessed in 24/10/2012).
- [2] A.R. Saltiel, C.R. Kahn, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature* 414 (2001) 799-806.
- [3] M. Brownlee, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature* 414 (2001) 813-820.
- [4] M. Brownlee, The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism, *Diabetes* 54 (2005) 1615-1625.
- [5] A. Kassab, A. Piwowar, Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes, *Biochimie* 94 (2012) 1837-1848.
- [6] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed., Oxford University Press, New York, 2000.
- [7] A.C. Maritim, R.A. Sanders, J.B. Watkins III, Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 1 (2003) 24-38.
- [8] K.M. Ramkumar, P. Vanitha, C. Uma, N. Suganya, E. Bhakkiyalakshmi, J. Sujatha, Antidiabetic activity of alcoholic stem extract of *Gymnema montanum* in streptozotocin-induced diabetic rats, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 3390-3394.
- [9] D.C. Damasceno, G.T. Volpato, I.M.P. Calderon, R. Aguilar, M.V.C. Rudge, Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions, *Phytomedicine* 11 (2004) 196-201.
- [10] G.T. Volpato, D.C. Damasceno, M.V.C. Rudge, C.R. Padovani, I.M.P. Calderon, Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats, *J. Ethnopharmacol.* 116 (2008) 131-137.
- [11] L. Wang, X.T. Zhang, H.Y. Zhang, H.Y. Yao, H. Zhang, Effect of *Vaccinium bracteatum* Thunb. leaves extract on blood glucose and plasma lipid levels in streptozotocin-induced diabetic mice, *J. Ethnopharmacol.* 130 (2010) 465-469.
- [12] W.J. Schnedl, S. Ferber, J.H. Johnson, C.B. Newgard, STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT 2 – expressing cells, *Diabetes* 43 (1994) 1326-1333.

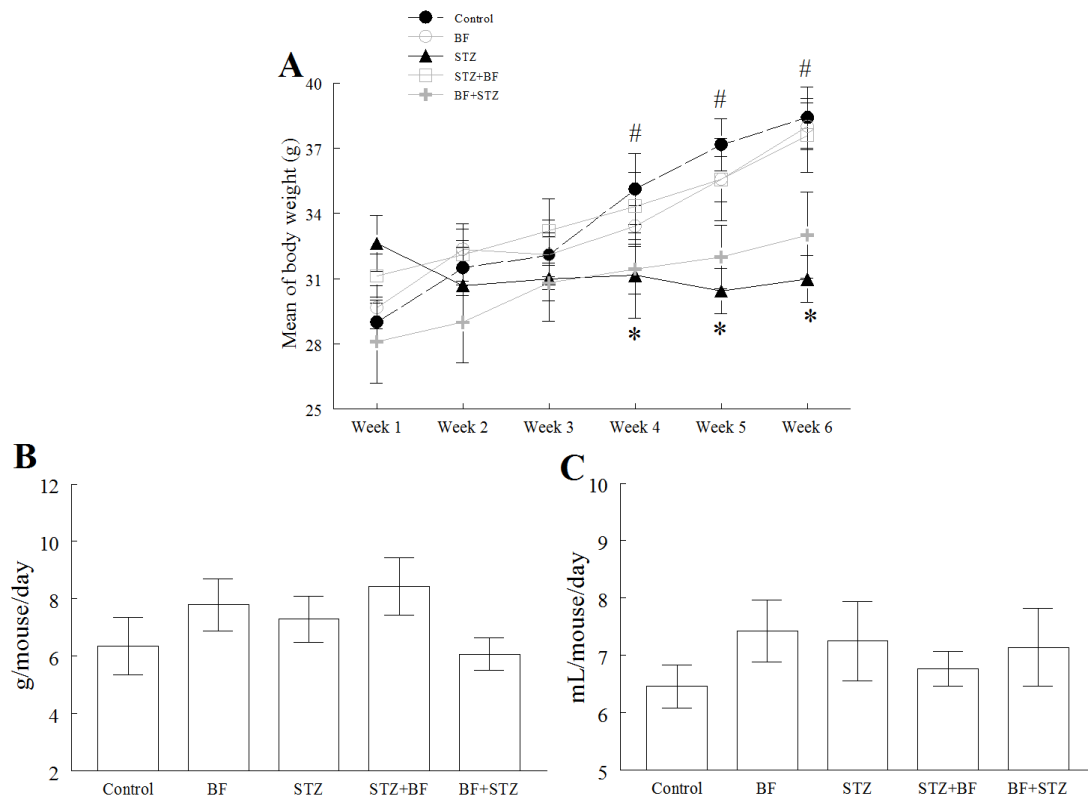
- [13] T. Szkudelski, The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas, *Physiol. Res.* 50 (2001) 536-546.
- [14] N.K. Rao, S. Nammi, Antidiabetic and renoprotective effects of the chloroform extract of *Terminalia chebula* Retz. seeds in streptozotocin-induced diabetic rats, *BMC Complement. Altern. Med.* 6 (2006) 1-6.
- [15] F. Comelli, I. Bettoni, M. Colleoni, G. Giagnoni, B. Costa, Beneficial Effects of a *Cannabis sativa* Extract Treatment on Diabetes-induced Neuropathy and Oxidative Stress, *Phytother. Res.* 23 (2009) 1678-1684.
- [16] M. Trojan-Rodrigues, T.L.S. Alves, G.L.G Soares, M.R. Ritter, Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil, *J. Ethnopharmacol.* 139 (2012) 155-163.
- [17] V. Cechinel Filho, Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*, *Phytother. Res.* 23 (2009) 1347-1354.
- [18] F.R. Silva, B. Szpoganicz, M.G. Pizzolatti, M.A. Willrich, E. de Sousa, Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats, *J. Ethnopharmacol.* 83 (2002) 33-37.
- [19] E. de Sousa, L. Zanatta, I. Seifriz, T.B. Creczynski-Pasa, M.G. Pizzolatti, B. Szpoganicz, F.R. Silva, Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3,7-O-(r)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves, *J. Nat. Prod.* 67 (2004) 829-832.
- [20] A.M. da Cunha, S. Menon, R. Menon, A.G. Couto, C. Bürger, M.W. Biavatti, Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link, *Phytomedicine* 17 (2010) 37-41.
- [21] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagy, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem* 95 (1979) 351-358.
- [22] G.O. Puntel, N.R. Carvalho, G.P. Amaral, L.D. Lobato, S.O. Silveira, M.F. Daubermann, N.V. Barbosa, J.B.T. Rocha, F.A. Soares FA, Therapeutic cold: An effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion, *Free Radic. Res.* 45 (2010) 125-138.
- [23] S. Sassa, Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay, *Enzyme* 28 (1982) 133-145.
- [24] G.O. Puntel, N.R. Carvalho, P. Gubert, A.S. Palma, C.L. Dalla Corte, D.S. Avila, M.E. Pereira, V.S. Carratu, L. Bresolin, J.B.T da Rocha, F.A. Soares, Butane-2,3-



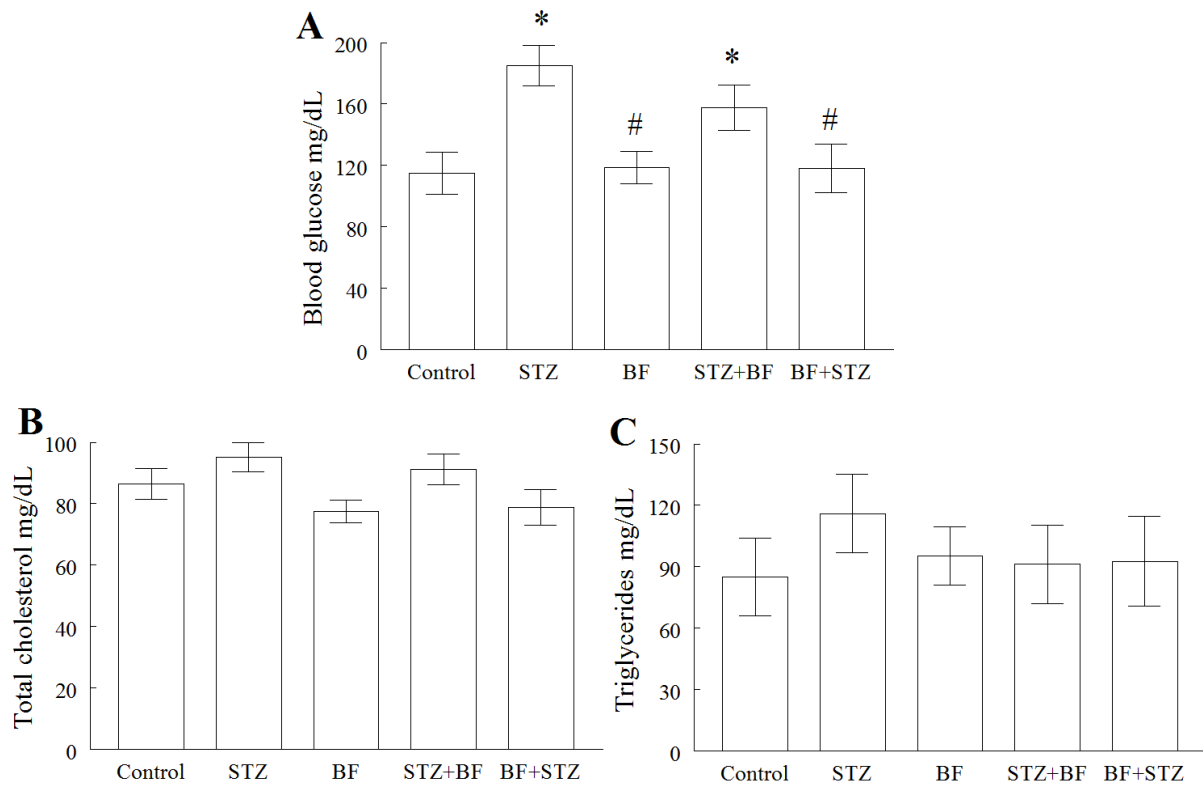
- dionethiosemicarbazone: an oxime with antioxidant properties, *Chem. Biol. Interact.* 177 (2009) 153-160.
- [25] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1952) 70-77.
- [26] J.H. Roe, C.A. Kuether, Detection of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2, 4 DNPH derivative of dehydro ascorbic acid, *J. Biol. Chem.* 147 (1943) 399-407.
- [27] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121-126.
- [28] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170-3175.
- [29] M.M. Bradford, Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [30] M.T. Pepato, E.H. Keller, A.M. Baviera, I.C. Kettelhut, R.C. Vendramini, I.L. Brunetti, Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats, *J. Ethnopharmacol.* 81 (2002) 191-197.
- [31] P. Rodríguez, F. González-Mujica, J. Bermúdez, M. Hasegawa, Inhibition of glucose intestinal absorption by kaempferol 3-O- $\alpha$ -rhamnoside purified from *Bauhinia megalandra* leaves, *Fitoterapia* 81 (2010) 1220-1223.
- [32] G.M. Pieper, M. Jordan, L.A. DondLinger, M.B. Adams, A.M. Roza, Peroxidative stress in diabetic blood vessels: Reversal by pancreatic islet transplantation, *Diabetes* 44 (1995) 884-889.
- [33] K. Honjo, K. Doi, C. Doi, T. Mitsuoka, Histopathology of streptozotocin-induced diabetic DBA/2N and CD-1 mice, *Lab. Anim.* 20 (1986) 298-303.
- [34] U.A. Shinde, R.K. Goyal, Effect of chromium picolinate on histopathological alterations in STZ and neonatal STZ diabetic rats, *J. Cell. Mol. Med.* 7 (2003) 322-329.
- [35] N. Kamalakkannan, P.S.M. Prince, Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues, *Mol. Cell. Biochem.* 293 (2006) 211-219.
- [36] Y. Pan, B.A. Abd-Rashid, Z. Ismail, R. Ismail, J.W. Mak, P.C Pook, H.M. Er, C.E. Ong, In vitro determination of the effect of *Andrographis paniculata* extracts and andrographolide on human hepatic cytochrome P450 activities, *J. Nat. Med.* 65 (2011) 440-447.

[37] T.S.D.B. Pinheiro, L.A.P. Johansson, M.G. Pizzolatti, M.W. Biavatti, Comparative assessment of kaempferitrin from medicinal extracts of *Bauhinia forficata* Link, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 431-436

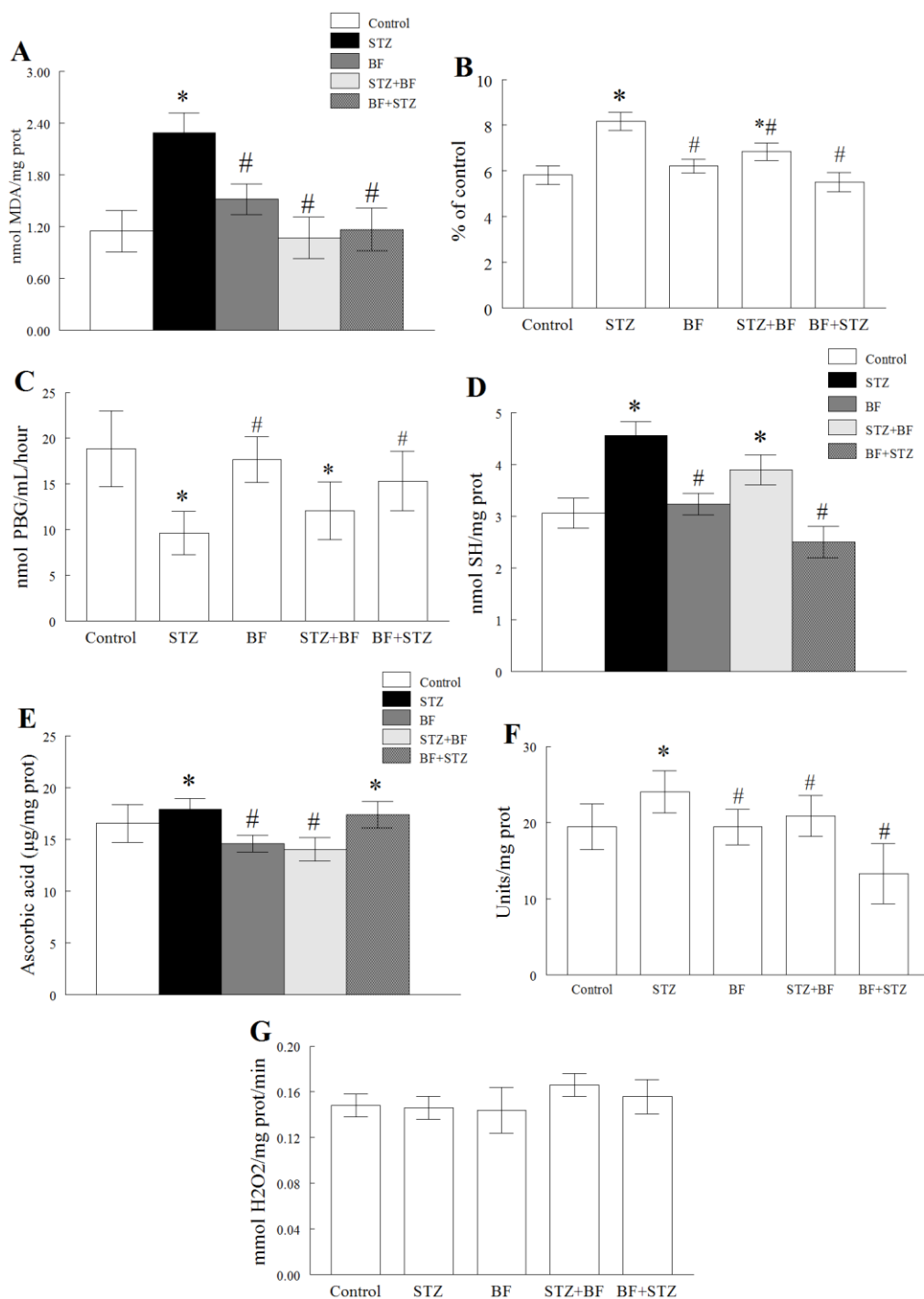
[38] H.L. Brangoulo, P.C. Molan, Assay of the antioxidant capacity of foods using an iron (II)-catalysed lipid peroxidation model for greater nutritional relevance, *Food Chem.* 125 (2011) 1126-1130.

**Figure 1**

**Figure 1:** Analysis of body weight gain (A), food (B) and liquid (C) intake during the six weeks of treatment. Results are expressed as means  $\pm$  standard error ( $n = 10$ ). The \* indicates significant difference in comparison to Control and # indicates significant difference in comparison to STZ ( $p < 0.05$ ).

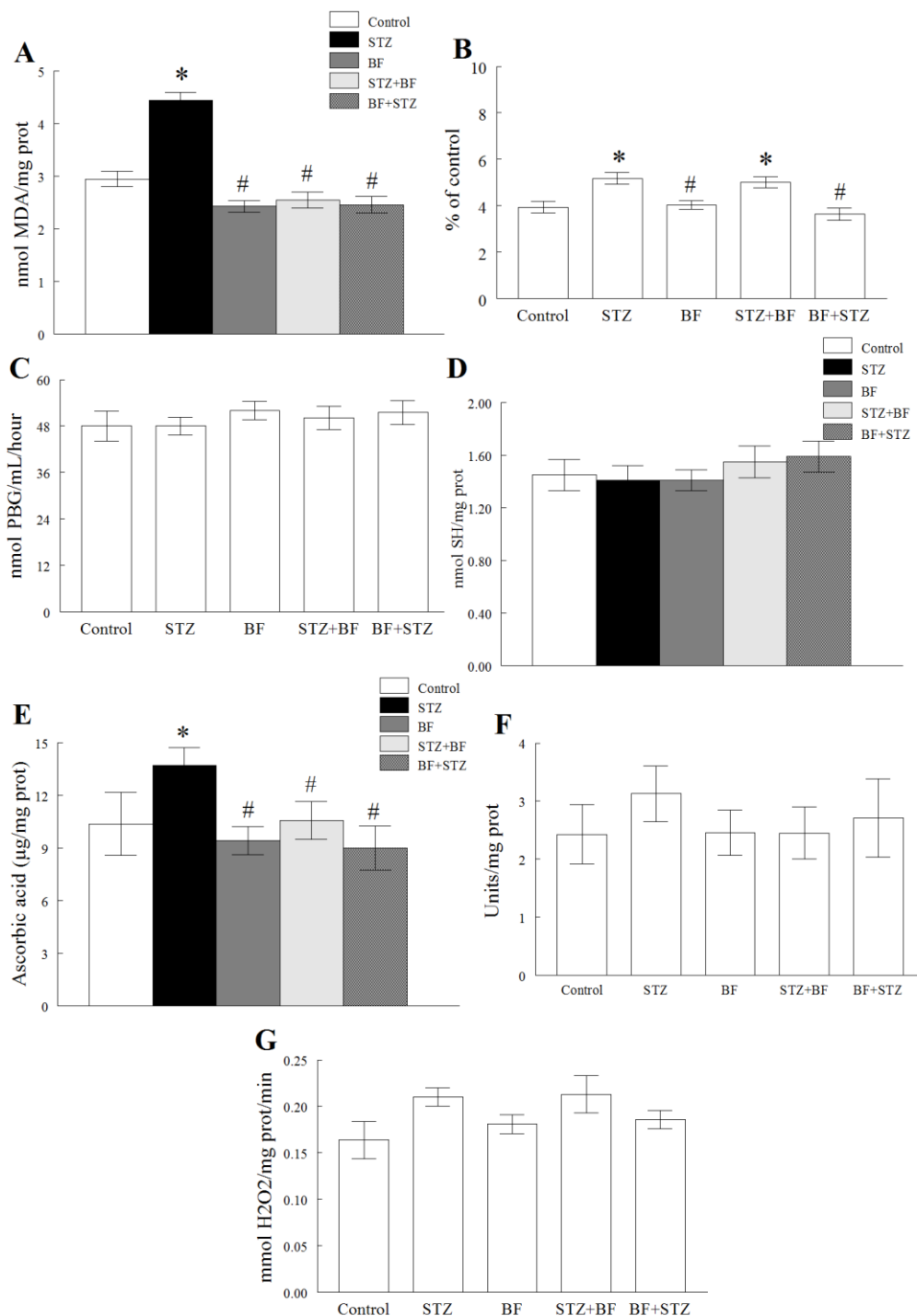
**Figure 2:**

**Figure 2:** Analysis of blood glucose (A), total cholesterol (B) and triglycerides (C) levels. Results are expressed as means  $\pm$  standard error (n = 10). The \* indicates significant difference in comparison to Control and # indicates significant difference in comparison to STZ ( $p < 0.05$ ).

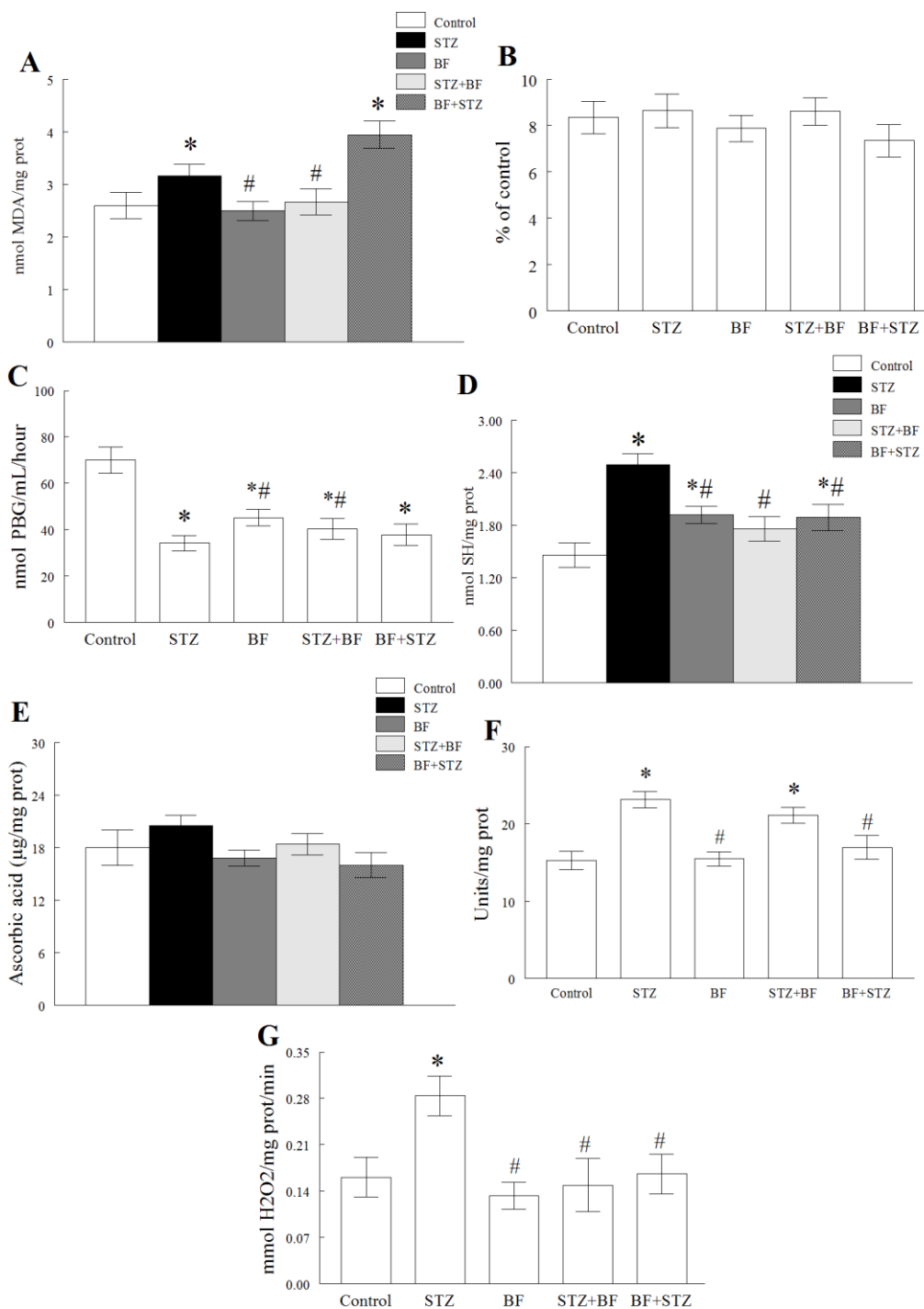
**Figure 3:**

**Figure 3:** Analysis of TBA-RS levels (A), DCF-RS levels (B)  $\delta$ -ALA-D enzyme reactivation index (C), NPSH levels (D), Ascorbic Acid levels (E), SOD activity (F) and CAT activity (G) in liver of mice. Results are expressed as means  $\pm$  standard error (n = 10). The \* indicates significant difference in comparison to Control and # indicates significant difference in comparison to STZ (p < 0.05).

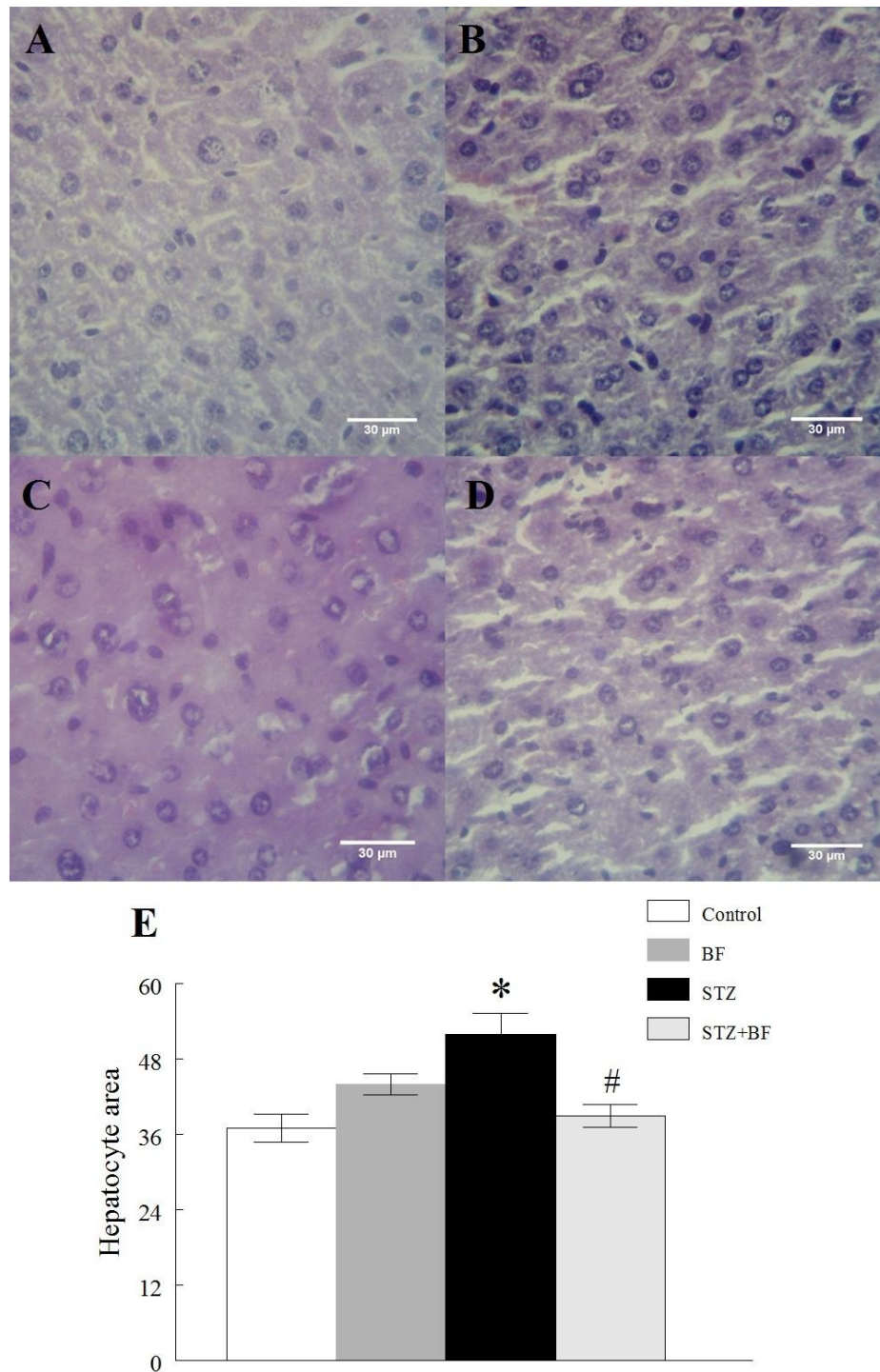
Figure 4:



**Figure 4:** Analysis of TBA-RS levels (A), DCF-RS levels (B)  $\delta$ -ALA-D enzyme reactivation index (C), NPSH levels (D), Ascorbic Acid levels (E), SOD activity (F) and CAT activity (G) in kidney of mice. Results are expressed as means  $\pm$  standard error (n = 10). The \* indicates significant difference in comparison to Control and # indicates significant difference in comparison to STZ (p < 0.05).

**Figure 5:**

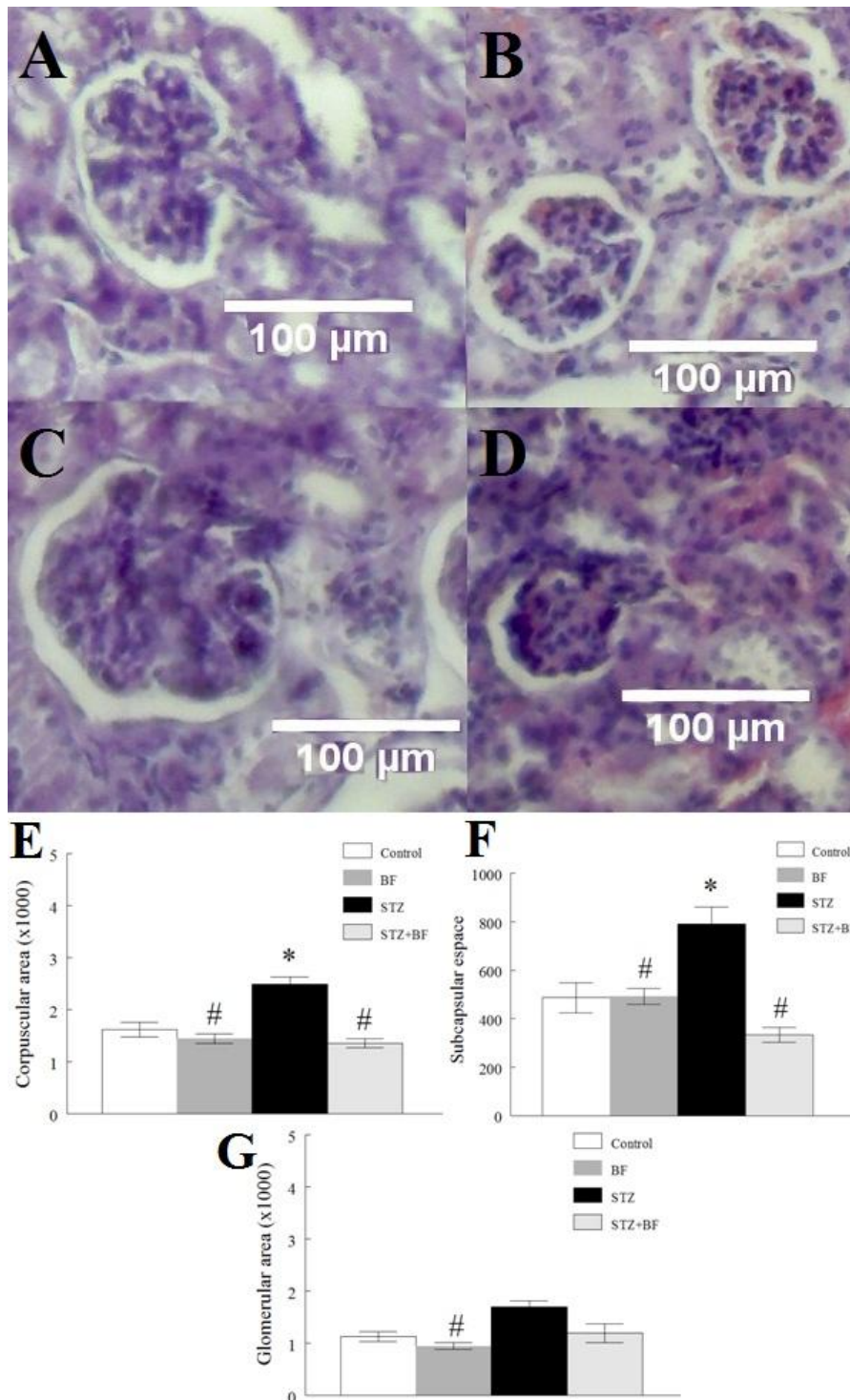
**Figure 5:** Analysis of TBARS levels (A), DCF-RS levels (B)  $\delta$ -ALA-D enzyme reactivation index (C), NPSH levels (D), Ascorbic Acid levels (E), SOD activity (F) and CAT activity (G) in brain of mice. Results are expressed as means  $\pm$  standard error (n = 10). The \* indicates significant difference in comparison to Control and # indicates significant difference in comparison to STZ (p < 0.05).

**Figure 6**

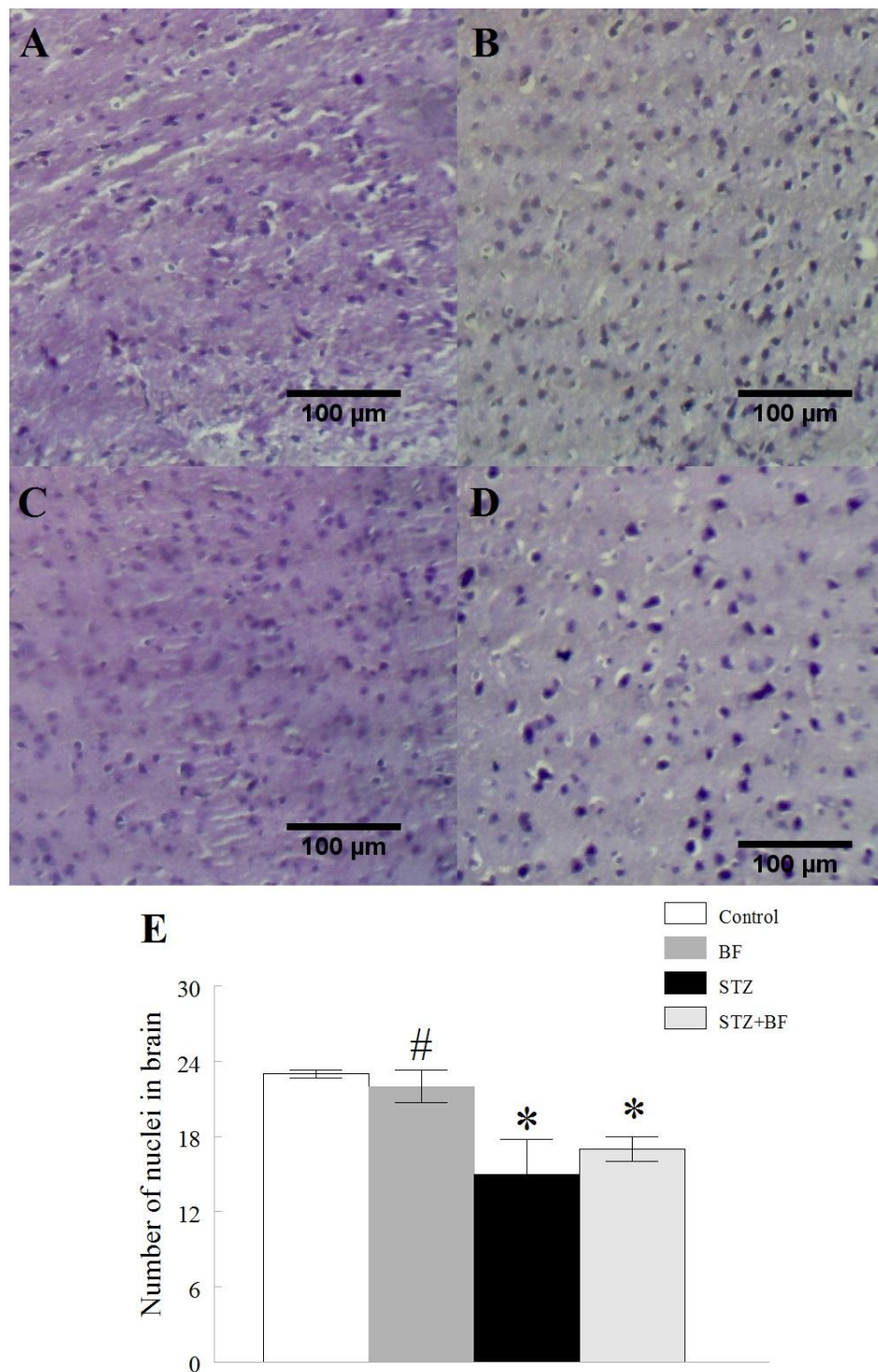
**Figure 6:** Representative light microscopic photographs of liver tissue of mice. Panel A: water control; Panel B: BF control; Panel C: STZ control; Panel D: STZ intoxicated mice treated with BF, and Panel E: graphical representation of histological findings.



Figure 7



**Figure 7:** Representative light microscopic photographs of kidney tissue of mice. Panel A: water control; Panel B: BF control; Panel C: STZ control; Panel D: STZ intoxicated mice treated with BF, and Panels E, F and G: graphical representation of histological findings.

**Figure 8**

**Figure 8:** Representative light microscopic photographs of brain tissue of mice. Panel A: water control; Panel B: BF control; Panel C: STZ control; Panel D: STZ intoxicated mice treated with BF, and Panel E: graphical representation of histological findings.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O propósito deste estudo foi investigar os efeitos *in vitro* do chá da BF sobre o dano oxidativo induzido por altas concentrações de glicose em eritrócitos humanos (**Manuscrito 1**), bem como seus efeitos *ex vivo* sobre o dano oxidativo induzido por ETZ em camundongos (**Manuscrito 2**). A fim de responder a estas questões centrais, foram realizados inicialmente os ensaios *in vitro* para investigar os efeitos antioxidantes, bem como os mecanismos de ação do chá de folhas de BF, e em seguida os ensaios *ex vivo* para investigação do seu potencial antioxidante em animais de experimentação.

No estudo apresentado no **Manuscrito 1** observamos que altas concentrações de glicose aumentaram os níveis de TBARS e reduziram os níveis de NPSH quando comparadas ao controle, tanto em 24 quanto em 48 horas de incubação (Figuras 4A, 4B, 5A e 5B, respectivamente). O chá de BF, em todas as concentrações testadas e especialmente na incubação de 24 horas, foi efetivo em reduzir o dano lipídico (Figuras 4A e 4B, respectivamente), bem como de aumentar os níveis de NPSH (Figuras 5A e 5B, respectivamente). Estes resultados indicam que, mesmo em baixas concentrações, o chá de folhas de BF apresenta um significativo potencial antioxidante. Esta ação antioxidante possivelmente está relacionada aos elevados níveis de polifenóis e flavonoides encontrados neste chá (Figura 1A e 1B, respectivamente).

Na tentativa de identificar o(s) mecanismo(s) de ação antioxidante do chá de BF observamos que o mesmo apresentou uma significativa atividade quelante de  $Fe^{2+}$  (Figura 2A). Da mesma forma, o chá de BF minimizou a elevação dos níveis de TBARS provocada por  $Fe^{2+}$  em lipídios isolados de ovos de galinha (Figura 3A). Assim, acreditamos que um dos mecanismos envolvidos na ação antioxidante do chá de BF

esteja relacionado a sua interação com íons ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ), os quais quando livres podem reagir com outras moléculas e gerar espécies altamente reativas, tais como os  $\text{OH}^\bullet$  via reação de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$ ) (Halliwell & Gutteridge, 2000). Além disso, o chá de BF neutralizou o radical  $\text{DPPH}^\bullet$  e reduziu a degradação da desoxirribose induzida pela reação de Fenton de modo significativo (Figura 2B e 3B, respectivamente). Desta forma, além de minimizar a reação de Fenton pela interação com os íons  $\text{Fe}^{2+}$  o chá teve efeito em neutralizar diretamente o radical  $\text{DPPH}^\bullet$ , o qual é comumente utilizado como uma forma estável de radical acceptor de hidrogênio de modo semelhante ao  $\text{OH}^\bullet$  (Braude et al. 1954). O resumo dos resultados apresentados no **Manuscrito 1** encontram-se no **Anexo II**.

Após evidenciarmos o efeito antioxidante *in vitro* do chá das folhas de BF, investigamos seus efeitos *in vivo* e *ex vivo* sobre o dano oxidativo induzido por ETZ em camundongos (**Manuscrito 2**). O resumo dos resultados do **Manuscrito 2** encontram-se no **Anexo III**. Os resultados apresentados neste estudo evidenciam os benefícios do chá de BF como agente hipoglicemiante e antioxidante. *In vivo*, tanto o pré-tratamento quanto o pós-tratamento com o chá de BF protegeu os camundongos da perda de massa corporal determinada pela ETZ (Figura 1A). Adicionalmente, o pré-tratamento com o chá de BF protegeu contra a hiperglicemia induzida por ETZ (Figura 2A). Os mecanismos pelos quais apenas o pré-tratamento com o chá de BF foi efetivo na redução da hiperglicemia e de outros parâmetros avaliados ainda precisa ser mais bem explorado, visto que não há outros trabalhos na literatura que tenham avaliado os efeitos do pré-tratamento com extratos vegetais contra a toxicidade induzida por ETZ. No entanto, acreditamos que o mecanismo de ação do chá de BF contra a perda de peso e a hiperglicemia esteja relacionado à proteção das células  $\beta$  pancreáticas contra a ação da ETZ.

Nossos resultados *ex vivo* indicam que a intoxicação com ETZ é potencialmente danosa a medida que acaba por desencadear danos oxidativos e morfológicos em tecidos de camundongos. Neste contexto, as principais alterações oxidativas foram relacionadas a um aumento de marcadores do dano oxidativo, tais como os níveis de TBARS e de DCF-RS e a redução do índice de reativação da enzima  $\delta$ -ALA-D em diferentes tecidos dos animais intoxicados com ETZ. As principais alterações oxidativas foram minimizadas pelos tratamentos com o chá de BF.

Adicionalmente, observamos alterações na atividade de importantes enzimas envolvidas nos sistemas de defesa antioxidante, além dos níveis de antioxidantes não enzimáticos nos animais intoxicados por ETZ. Observamos um aumento dos níveis de NPSH e de AA e também na atividade das enzimas SOD e CAT de modo diferenciado entre os diferentes órgãos dos camundongos tratados com ETZ. Acreditamos que este aumento das defesas antioxidantes esteja associado a uma resposta fisiológica compensatória ao aumento do EO, a qual já fora previamente descrita na literatura (Pieper et al, 1995; Maritim et al., 2003). De modo geral, os tratamentos com o chá de BF mantiveram os níveis das defesas antioxidantes próximos ao controle, sendo assim capaz de minimizar o aumento do dano oxidativo determinado pela ETZ sem aumentar a taxa fisiológica basal de defesas antioxidantes.

Por fim, as alterações oxidativas determinadas pela intoxicação com ETZ foram acompanhadas por alterações histológicas *ex vivo* significativas no fígado, cérebro e rim dos camundongos tratados. De modo geral estas alterações foram minimizadas pelos tratamentos com o chá de BF. Estes resultados nos permitem sugerir que além da atividade antioxidante os componentes do chá de folhas de BF exerceram uma ação citoprotetora contra a o dano induzido pela ETZ nestes órgãos.

Tomados em conjunto, nossos resultados indicam que os efeitos antioxidantes do chá de folhas de BF estejam possivelmente relacionados aos seus elevados níveis de compostos fenólicos e flavonoides. Estes compostos podem justificar a significativa neutralização das reações envolvendo íons  $\text{Fe}^{2+}$  ou outras espécies reativas, tais como o radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$ , observadas nos ensaios contendo o chá de BF. Acreditamos que estes mecanismos podem ser responsáveis pelos efeitos antioxidantes e citoprotetores observados *in vivo* e *ex vivo* em camundongos intoxicados por ETZ. Em geral, nossos resultados reforçam a importância de estudos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* para investigar os efeitos das plantas medicinais mais utilizadas popularmente para o tratamento de enfermidades.

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que:

- O chá de BF minimizou o dano oxidativo induzido *in vitro* por altas concentrações de glicose em eritrócitos humanos, e estes efeitos podem ser decorrentes de seu elevado nível de polifenóis e flavonoides;
- Os mecanismos relacionados ao efeito antioxidante do chá de BF parecem estar relacionados com a neutralização de radicais  $\text{OH}^{\bullet}$  e a quelatação de íons ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ), tendo em vista a significativa neutralização do radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$  e a redução da peroxidação lipídica e da degradação da desoxirribose via reação de Fenton;

- O chá de BF minimizou o dano oxidativo induzido por ETZ em diferentes órgãos de camundongos e reduziu a hiperglicemia e a perda de massa corporal destes animais;
- A redução determinada pelo chá de BF sobre o dano oxidativo induzido por ETZ foi acompanhada por uma redução das alterações histopatológicas nos mesmos órgãos dos animais tratados.

## 8. PERSPECTIVAS

A fim de melhor elucidar os mecanismos pelos quais o chá de BF exerce seus efeitos, temos como perspectivas:

- Determinar quais são os compostos fenólicos mais abundantes no chá de folhas de BF, bem como comparar estes resultados aos observados em outras formas de extração;
- Investigar os efeitos da BF em um modelo experimental de DM tipo II;
- Investigar os efeitos em longo prazo da intoxicação com ETZ sobre o desenvolvimento e consequências da hiperglicemia crônica, a exemplo do desenvolvimento da neuropatia diabética;
- Analisar os principais metabólitos do chá de BF presente nos diferentes órgãos e fluidos (sangue / plasma) de camundongos intoxicados ou não com ETZ;
- Averiguar os efeitos da intoxicação com ETZ e do chá de BF sobre a expressão gênica de marcadores de EO e de sinalizadores de necrose celular, assim como na expressão de transportadores de glicose.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbosa, J.H.P.; Oliveira, S.L.; Seara, L.T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 52, 940-946, 2008.

Bierhaus, A.; Hofmann, M.A.; Ziegler, R.; Nawroth, P.P. The AGE/RAGE pathway in vascular disease and diabetes mellitus. Part I. The AGE-concept. **Cardiovascular Res.** 37, 586-600, 1998.

Braude, B.A.; Brook, A.G.; Linstead, R.P. Hydrogen transfer. Part V. Dehydrogenation reactions with diphenylpicrylhydrazyl. **J. Chem. Soc.** 0, 3574-3578, 1954.

Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. **Diabetes.** 54, 1615-1625, 2005.

Carvalho, J.B.C.; Zecchin, H.G.; Saad, M. J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 46, 419-425, 2002.

Carvalho, A.C.B.; Diniz, M.F.F.M.; Mukherjee, R. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. **Rev. Bras. Farmacog.** 86, 11-16, 2005.

Cazarolli, L.H.; Folador, P.; Pizzolatti, M.G.; Silva, F.R.M.B. Signaling pathways of kaempferol-3-neohesperidoside in glycogen synthesis in rat soleus muscle. **Biochimie.** 91, 843-849, 2009.

Cechinel Filho, V. Chemical composition and biological potential of plants from the genus Bauhinia. **Phytother. Res.** 23, 1347-1354, 2009.

Comelli, F.; Bettoni, I.; Colleoni, M.; Giagnoni, G.; Costa, B. Beneficial Effects of a Cannabis sativa Extract Treatment on Diabetes-induced Neuropathy and Oxidative Stress. **Phytother. Res.** 23, 1678-1684, 2009.



Cos, P.; Calomme, M.; Sindambiwe, J.B.; De Bruyne, T.; Cimanga, K.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Vande Berghe, D. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. **Planta Med.** 67, 515-519, 2001.

Damasceno, D.C.; Volpato, G.T.; Calderon, I.M.; Aguilar, R.; Rudge, M.V. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. **Phytomedicine.** 11, 196-201, 2004.

Datasus. URL: <http://hiperdia.datasus.gov.br/releviodados.asp?sgUfEnviado=RS>. (Acesso em 09/12/2012).

Delfino, V.D.A.; Figueiredo, J.F.; Matsuo, T.; Favero, M.E.; Matni, A.M.; Mocelin, A.J. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J. Bras. Nefrol.** 24, 31-36, 2002.

Dornas; W.C.; Oliveira, T.T.; Dores, R.G.R.; Fabres, M.H.A.; Nagem, T.J. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.** 19, 488-500, 2009.

Farina, M.; Folmer, V.; Bolzan, R.C.; Andrade, L.H.; Zeni, G.; Braga, A.L.; Rocha J.B.T. Selenoxides inhibit d-aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicol. Lett.** 119, 27-37, 2001.

Folmer, V.; Soares, J.C.; Gabriel, D.; Rocha, J.B. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). **J. Nutr.** 133, 2165-70, 2003.

Folmer, V. Efeitos de dietas hiperglicídicas e hiperlipídicas sobre a peroxidação lipídica e a atividade da enzima delta aminolevulinato desidratase em camundongos. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica, 2004.

Giacco, F.; Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ. Res.** 107, 1058-1070, 2010.

Halliwell, B. Free Radicals and other reactive species in Disease. Encyclopedia of Life Sciences – **Nature**. 2001. URL: [http://web.sls.hw.ac.uk/teaching/level4/bcm1\\_2/reading/oxidative\\_stress/files/Oxidative\\_stress.pdf](http://web.sls.hw.ac.uk/teaching/level4/bcm1_2/reading/oxidative_stress/files/Oxidative_stress.pdf) (Acesso em 24/12/2012)

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., **Oxford University Press**: New York, 2000.

Hammes, H.P.; Du, X.; Edelstein, D.; Taguchi, T.; Matsumura, T.; Ju, Q.; Lin, J.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.; Hannak, D.; Neumaier, M.; Bergfeld, R.; Giardino, I.; Brownlee, M. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. **Nat. Med.** 9, 294-299, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. URL: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/tabelas\\_pdf/total\\_populacao\\_rio\\_grande\\_do\\_sul.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/tabelas_pdf/total_populacao_rio_grande_do_sul.pdf) (Acesso em 01/01/2011).

IDF (International Diabetes Federation). About diabetes. URL: <http://www.idf.org/about-diabetes> (Accessed 28.07.2012).

Kassab, A.; Piwowar, A. Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes. **Biochimie**. 94, 1837-1848, 2012.

Macedo, M.; Ferreira, A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.** 14, 45-47, 2004.

Machado, U.F.; Schaan, B.D.; Seraphin, P.M. Glucose transporters in the metabolic syndrome. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 50, 177-189, 2006.

Magalhães, A.S.; Silva, B.M.; Pereira, J.A.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Carvalho, M. Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. **Food Chem. Toxicol.** 47, 1372-1377, 2009.

Mali, R.G.; Mahajan, S.G.; Mehta, A.A. Rakta Kanchan (*Bauhinia variegata*): chemistry, traditional and medicinal uses – a review. **Phcog. Rev.** 1, 314-319, 2007.

Mallick, A.K.; Maradi, R.; Joshi, V.R.; Shorey, G.; Ahsan, M. Study on malondialdehyde as a marker of lipid peroxidation in male and female patients with type 2 Diabetes mellitus. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.** 8, 198-201, 2011.

Maritim, A.C.; Sanders, R.A.; Watkins, J.B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. **J. Biochem. Mol. Toxicol.** 17, 24-38, 2003.

Mohamed, A.K.; Bierhaus, A.; Schiekofer, S.; Tritschler, H.; Ziegler, R.; Nawroth, P.P. The role of oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation in late diabetic complications. **Biofactors.** 10, 157-167, 1999.

Nakamura, J.; Koh, N.; Sakakibara, F.S.; Hamada, Y. 2,3 diphosphoglycerate in erythrocytes and diabetic neuropathy in rats. **E. J. Pharmacol.** 294, 207-214, 1995.

Nguyen, S.; Pascariu, M.; Ghitescu, L. Early glycation products of endothelial plasma membrane proteins in experimental diabetes. **BBA**, 1762, 94-102, 2006.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** 95, 351-358, 1979.

Okoko, T.; Ere, D. Reduction of hydrogen peroxide–induced erythrocyte damage by Carica papaya leaf extract. **Asian. Pac. J. Trop. Biomed.** 2, 449-453, 2012.

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

Pieper, G.M.; Jordan, M.; DondLinger, L.A.; Adams, M.B.; Roza, A.M. Peroxidative stress in diabetic blood vessels. Reversal by pancreatic islet transplantation. **Diabetes.** 44, 884-889, 1995.

Ramkumar, K.M.; Vanitha, P.; Uma, C.; Suganya, N.; Bhakkiyalakshmi, E.; Sujatha, J. Antidiabetic activity of alcoholic stem extract of *Gymnema montanum* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food Chem. Toxicol.** 49, 3390-3394, 2011.

Reed, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Bio. Med.** 51, 1302-1319, 2011.

Reis, J.S.; Veloso, C.A.; Mattos, R.T.; Purish, S.; Nogueira-Machado, J.A. Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 52, 1096-1105, 2008.

Rodríguez, P.; González-Mujica, F.; Bermúdez, J.; Hasegawa, M. Inhibition of glucose intestinal absorption by kaempferol 3-O- $\alpha$ -rhamnoside purified from *Bauhinia megalandra* leaves. **Fitoterapia.** 81, 1220-1223, 2010.

Rosen, G.M.; Britigan, B.E.; Halpern, H.J.; Pou, S. Free Radicals Biology and Detection by Spin Trapping. Chapter 4: Methods for free radicals detection. **Oxford University Press**, USA. 1999.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009 / Sociedade brasileira de diabetes. - [3.ed.]. - Itapevi, SP: 2009. URL: [http://www.diabetes.org.br/attachments/diretrizes09\\_final.pdf](http://www.diabetes.org.br/attachments/diretrizes09_final.pdf) (Acesso em 02/12/2012).

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. URL: <http://www.diabetes.org.br/> (Acesso em 02/12/2012).

Schnedl, W.J; Ferber, S.; Johnson, J.H.; Newgard, C.B. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT 2 – expressing cells. **Diabetes.** 43, 1326-1333, 1994.

SES/RS. Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul. URL: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=noticias&cod=16092> (Acesso em 08/02/2011).

Shaw, J.E.; Sicree, R.A.; Zimmet, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res. Clin. Pr.** 87, 4-14, 2010.

Sies H. Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants. **Academic Press**, New York: 1991.

Silva, F.R.M.B.; Szpoganicz, B.; Pizzolatti, M.G.; Willrich, M.A.V.; Sousa, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.** 83, 33-37, 2002.

Silva, K.L.; Cechinel Filho V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Quim. Nova.** 25, 449-454, 2002.

Silva, J.P.A.; Sampaio, L.S.; Oliveira, L.S.; Reis, L.A. Plantas medicinais utilizadas por portadores de diabetes mellitus tipo 2 para provável controle glicêmico no município de Jequié-BA. **Rev. Saúde.Com.** 4, 10-18, 2008.

Simões, C.M.O. (ORG). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Florianópolis. **Editora UFSC**, 2001.

Soares, J.C.M.; Gabriel, D.; Folmer, V.; Augusti, G.R.; Rocha, J.B.T. High concentrations of glucose can activate or inhibit human erythrocyte aminolevulinatase *in vitro* depending exposure time. **Am. J. Biochem. Biotechnol.** 2, 180-185, 2006.

Sousa, E.; Zanatta, L.; Seifriz, I.; Creczynski-Pasa, T.B.; Pizzolatti, M.G.; Szpoganicz, B.; Silva, F.R.M.B. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3,7-O-(*r*)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. **J. Nat. Prod.** 67, 829-832, 2004.

Souza, V.H.; Barbosa, A.P.O.; Cardoso, G.C.; Marreto, R.N.; Barreto-Filho, J.A.S.; Antonioli, A.R.; Santos, M.R.V. Avaliação do Potencial Antidiabético de Cinco Plantas Medicinais em Ratos. **Lat. Am. J. Pharm.** 28, 609-612, 2009.

Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.** 50, 536-546, 2001.

Timper, K.; Donath, M.Y. Diabetes mellitus Type 2 – the new face of an old lady. **Swiss Med. Wkly.**142:w13635, 2012.

Toledo, A.C.O.; Hirata, L.L.; Buffon, M.C.M.; Miguel, M.D.; Miguel, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Rev. Lecta.** 21, 07-13, 2003.

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. **J. Ethnopharmacol.** 139, 155-163, 2012.

Tzeng, Y.M.; Chen, K.; Rao, Y.K.; Lee, M.J. Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. **Eur. J. Pharmacol.** 607, 27-34, 2009.

Vertuani, S.; Angusti, A.; Manfredini, S. The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. **Curr. Pharm. Des.** 10, 1677-1694, 2004.

Volpato, G.T.; Damasceno, D.C.; Calderon, I.M.P.; Rudge, M.V.C. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. **Rev. Bras. Pl. Med.** 4, 35-45, 2002.

Volpato, G.T.; Damasceno, D.C.; Rudge, M.V.; Padovani, C.R.; Calderon, I.M. Effect of Bauhinia forficata aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.** 116, 131-137, 2008.

Wajchenberg, B.L. Disfunção endotelial no diabetes tipo 2. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 46, 514-519, 2002.

Wang, L.; Zhang, X.T.; Zhang, H.Y.; Yao, H.Y.; Zhang, H. Effect of Vaccinium bracteatum Thunb. leaves extract on blood glucose and plasma lipid levels in streptozotocin-induced diabetic mice. **J. Ethnopharmacol.** 130, 465-469, 2010.

WHO. World Health Organization. URL: [http://www.who.int/diabetes/action\\_online/basics/en/index.html](http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/index.html) (Accessed on 02/02/2012)

Yang, H.; Chen, S.; Chang, N.; Chang, J.; Lee, M.; Tsai, P.; Fu, H.; Kao, W.; Chiang, H.; Wang, H.; Hseu, Y. Protection from oxidative damage using Bidens pilosa extracts in normal human erythrocytes. **Food Chem. Toxicol.** 44, 1513-1521, 2006.

Zimmet, P.; Alberti, K.G.; Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature.** 414, 782-787, 2001.

**ANEXO I: Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: [ceua@unipampa.edu.br](mailto:ceua@unipampa.edu.br)

---

**PROTOCOLO N° 001/2012**

**Titulo:** : Análise bioquímica dos efeitos de plantas do gênero *Bauhinia* em um modelo experimental de hiperglicemia induzida por estreptozotocina em camundongos

**Pesquisador:** Gustavo Orione Puntel

**Campus:** Uruguaiana

**Telefone:** 55 91194886

**E-mail:** [gustavopuntel@unipampa.edu.br](mailto:gustavopuntel@unipampa.edu.br)/ [gustavopuntel@yahoo.com.br](mailto:gustavopuntel@yahoo.com.br)

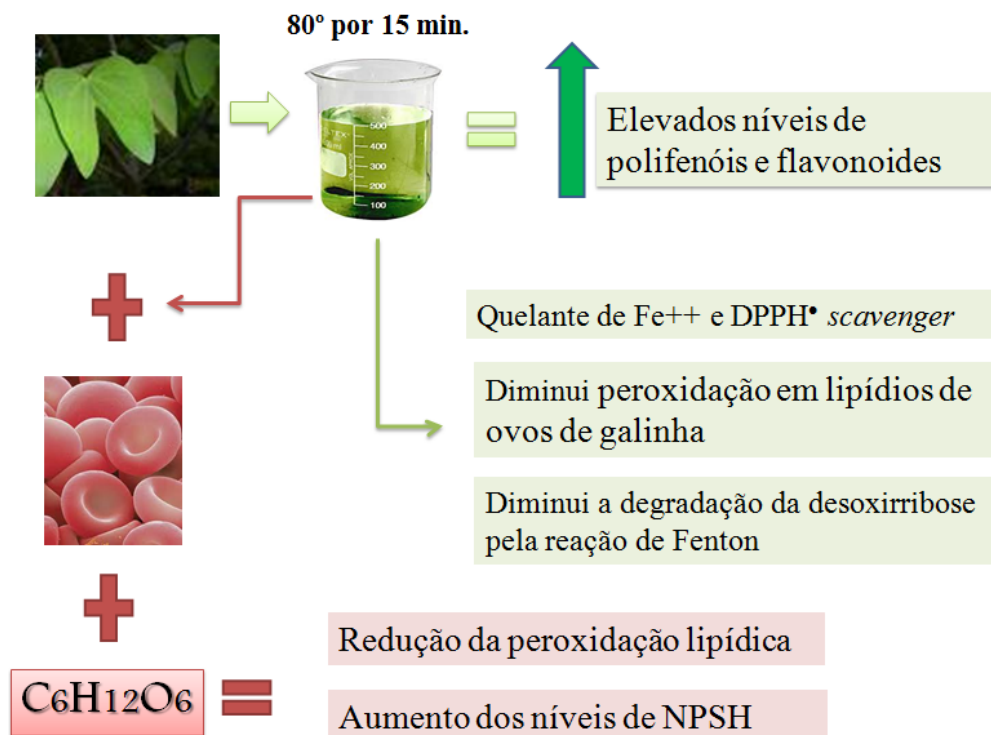
Após a análise detalhada do projeto de pesquisa a relatoria do CEUA-Unipampa emite parecer **FAVORÁVEL** para o cadastro do protocolo e execução do referido projeto.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Luiz E. Henkes'.

Luiz E. Henkes  
Professor Adjunto  
Coordenador do CEUA/Unipampa



## ANEXO II: Figura resumo dos resultados do Manuscrito 1



**ANEXO III: Figura resumo dos resultados do Manuscrito 2**