



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA

ENAIDE SOARES SANTOS

**ANÁLISE DO EFEITO HIPOGLICEMIANTE DE
MONOTERPENOS ISÔMEROS (α e β PINENO) – EM MODELO DE DIABETES
EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ALOXANO**

CRATO - CE

2022

ENAIDE SOARES SANTOS

**ANÁLISE DO EFEITO HIPOGLICEMIANTE DE
MONOTERPENOS ISÔMEROS (α e β PINENO) – EM MODELO DE DIABETES
EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ALOXANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Química Biológica.

Orientador (a): Dra. Marta Regina Kerntopf
Co-orientador(a): Dra. Samya de Araújo Neves
Co-orientador: Dr. Cícero F. Bezerra Felipe

CRATO - CE

2022

Ficha Catalográfica elaborada pelo autor através do sistema
de geração automático da Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri - URCA

Santos, Enaide Soares

S237a Análise do efeito hipoglicemiante de monoterpenos isômeros (α e β pineno) – em modelo de diabetes experimental induzido por aloxano / Enaide Soares Santos. Crato - CE, 2022.

82p. il.

Tese. Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri - URCA.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Marta Regina Kerntopf

Coorientador(a): Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

1.A-pineno, 2.B-pineno, 3.Diabetes, 4.Hipoglicemia, 5.Dislipidemia; I.Título.

CDD: 570

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações Eletrônicas

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação abaixo identificada, autorizo à Universidade Regional do Cariri – URCA, a disponibilizar por tempo indeterminado ao alcance do público a obra abaixo citada, através do site <http://bdt.d.ibict.br/bdt.d/>, bem como da rede mundial de computadores – Internet, sem pagamento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, conforme permissões assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data, atendendo à Portaria Nº 13 de 15/02/2006 da CAPES.

Identificação do Material Bibliográfico:		<input type="checkbox"/> Dissertação	<input checked="" type="checkbox"/> Tese
Autor: Enaide Soares Santos			
CPF:		RG:	
Nacionalidade:		Estado Civil:	
Endereço Completo:			
CEP:		Cidade:	Estado:
Fone/Celular:		E-mail	
Título: ANÁLISE DO EFEITO HIPOGLICEMIANTE DE MONOTERPENOS ISÔMEROS(α e β PINENO) - EM MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ALOXANO			
Orientador: Marta Regina Kerntopf			
Coorientador: Samya de Araújo Neves; Cícero F. Bezerra Felipe			
Membros da Banca: Henrique Douglas Melo Coutinho			
Alexandre Magno Rodrigues Teixeira			
Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro			
Álefe Brito Monteiro			
Data da Defesa: 29/07/2022		Curso: Química Biológica	
Área do Conhecimento: Ciências Biológicas II			
Palavras-Chave: β -pinene. α - pineno. Diabetes. Inflamação. Dislipidemia.			
3. Agência de Fomento: Funcap			
Informações de Acesso ao Documento: Para publicação		<input checked="" type="checkbox"/> Acesso Total	<input type="checkbox"/> Acesso Parcial
Em caso de publicação parcial, especifique o(s) arquivo(s) e/ou capítulo(s) restrito(s):			

Crato, 29 de Julho de 2022

Havendo concordância com a publicação eletrônica enviamos o(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação gerada a partir da versão final corrigida e aprovada pelo Orientador. A restrição (parcial ou total) poderá ser mantida por até dois anos a partir da data de autorização da publicação sob responsabilidade do Programa. A extensão deste prazo demandará justificativa formal apresentada será comunicada a CAPES

Assinatura do Autor:



Assinatura do Orientador:



**ANÁLISE DO EFEITO HIPOGLICEMIANTE DE
MONOTERPENOS ISÔMEROS (α e β PINENO) – EM MODELO DE DIABETES
EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ALOXANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Química Biológica.

Tese defendida e aprovada em: 29/07/2022.

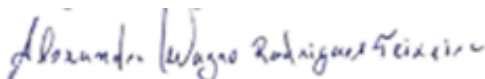
Banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Marta Regina Kerntopf
Orientadora
Universidade Regional do Cariri



Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Universidade Regional do Cariri
Examinador Interno



Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira
Universidade Regional do Cariri
Examinador Interno



Prof^a. Dr^a. Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro
Universidade Federal do Cariri
Examinador Externo



Prof. Dr. Álefe Brito Monteiro
Faculdade Três Marias
Examinador Externo

Ao meu esposo, amigo e companheiro, **Ildo Santos**, que sempre me aconselhou, torceu por mim e me ajudou durante toda minha caminhada acadêmica. Seu apoio e amor foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Ao meu filho amado, **Guilherme Santos**, que alegra o meu viver. Que me incentiva a conquistar o mundo, quando diz “mamãe, a senhora é meu orgulho”.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela vida que me oferece, por sempre está comigo nas horas das dificuldades e tribulações, por ter me dado forças para prosseguir nos meus estudos e, hoje, por sua vontade, estar concluindo meu doutorado. Todo louvor, honra e glória seja para Deus. Ao meu esposo, **Francisco Ildo Furtado dos Santos**, por seu amor, atenção, dedicação e companheirismo e a meu filho **Guilherme Soares Santos**, que enche a nossa vida de alegria e me ajuda a enxergar a vida de uma maneira mais simples e alegre. Aos meus pais, **Francisco Félix de Carvalho** e **Cícera Soares de Carvalho**, pela essência de vida pela qual me criaram, passando por todas as dificuldades para que eu tivesse estudo e, muitas vezes, abrindo mão de seus sonhos para que pudesse realizar os meus. À minha orientadora **Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf**, pelo apoio e incentivo a pesquisa, pela confiança depositada em mim, pelos conselhos e ensinamentos que me tem passado, os quais me ajudaram a crescer. Além disso, por lutar com toda braveza pelo sucesso de seus alunos. Como costuma dizer “Eu me rejubilo com o sucesso de meus alunos”. E hoje só tenho a agradecer por tudo que fez por mim. Obrigada!

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe**, por toda ajuda, pelo conhecimento que me transmitiu, por ter me incentivado a chegar até o fim, sem nunca largar a minha mão. À minha coorientadora, **Dra. Samya de Araújo Neves**, por ter me aceitado como orientanda e ter aberto os caminhos para a realização dos experimentos, conduzindo o trabalho de maneira exemplar. Além disso, nunca faltou alegria, motivação e compreensão na execução de todo o processo de construção da tese. À **Profa. Dra. Francisca Adilfa de Oliveira Garcia**, pelos conhecimentos transmitidos, cuja distância não foi obstáculo. Por muitos conselhos prestados e dedicação que teve comigo. Por sua amizade e carinho. Por estar comigo desde a minha graduação em Farmácia. Por várias oportunidades que me mostrou e que proporcionaram grandes coisas, e estas, conseqüentemente, geraram grandes conquistas. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Henrique Douglas**, pelo modo que sempre me acolheu, ajudou e me direcionou aos passos certos. Aos professores Programa de Pós-graduação em Química Biológica, por todos os conhecimentos que repassaram para mim durante o doutorado.

À minha amiga, **Dra. Norma Fernandes**, que é um exemplo de pessoa pacífica e perseverante, amiga de todas as horas, companheira, fiel e bondosa. Agradeço por toda compreensão, parceria e ensinamentos!

Obrigada aos doutores Saulo Relison Tintino e Luiz Marivando Barros, que aceitaram

o convite de serem suplentes na minha banca. Gratidão!

Agradeço às pessoas que encontrei pelo caminho e que se tornaram bons amigos, Sara Tavares de Sousa Machado e Cícero Damon Carvalho de Alencar. Aos meus queridos alunos de Iniciação Científica Geraldo Lucas Abrantes **Coelho**, **Bárbara Lourenço Saraiva Landim** e **Yan Kauê Saraiva Fontes Loula**, que estiveram comigo nos primeiros anos de experimento, e à segunda turma do grupo de pesquisa, a saber, **Francisco Beethoven Rodrigues**, **Yasmim Almeida da Silva** e **Luiz Carlos Xavier Matias**. Passamos por muitas dificuldades e aprendizados. Obrigada a todo o grupo de pesquisa deste trabalho.

Agradeço a **Francisco Rolim**, empresário da Rede de Farmácias Santa Cecília, que sempre me deu apoio para estudar e crescer profissionalmente. Como dizia “Deus não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos”. Sempre me deu maior força e incentivou minha caminhada; fez mais do que eu imaginava. Obrigada por existir na minha caminhada. A **Virgínia Maria**, minha grande amiga. Obrigada por acreditar em mim, me incentivar e falar de mim com tanto orgulho. Como você diz “minha doutora”, hoje está virando realidade. Já posso dizer, sim, Virgínia, sou Doutora. Obrigada, minha amiga-irmã.

Agradeço a minha colega de sala, **Nadghia Figueiredo Leite**, por ser minha companheira na minha primeira graduação (Biologia) e agora no doutorado. Agradeço a **Maria Janice Pereira Lopes**, que proporcionou toda abertura na Estácio/FMJ, para que eu pudesse realizar os testes e que esteve comigo até o fim da produção deste trabalho. À secretária do Mestrado, **Manuela Martins Fernandes**, por ser solícita e estar sempre à disposição para atender e ajudar aos alunos. À Funcap pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa. À Estácio/FMJ, pelo apoio na realização de todos os experimentos. À Universidade Regional do Cariri (Urca), que me acolheu, e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho,

... meus sinceros agradecimentos.

*“O meu combustível pra continuar é
Jesus, a calma, o aconchego dos meus dias. O meu alicerce pra não desistir”.*

Jessé Aguiar

LISTA DE FIGURAS, FLUXOGRAMA E QUADRO

Figura 1 - Estrutura do pâncreas.....	26
Figura 2 - Esquema do processo de regulação da secreção de insulina na célula Beta.....	27
Figura 3 - Perfis de ação das diferentes insulinas e análogas de insulinas.....	28
Figura 4 - Mecanismo de ação das Sulfanilureias – Glibenclamida. Droga referencia para presente estudo.....	31
Figura 5 - Unidades isoprênicas, ligada na ordem m “cabeça-a-cauda”.....	32
Figura 6 - Biossíntese dos Terpenos.....	33
Figura 7 - Estrutura Química dos Enantiômeros α e β -pineno.....	35
Figura 8 - Estrutura química do β -pineno.....	35
Figura 9 - Estrutura química do α -pineno.....	36
Fluxograma 1 - Estrutura da Tese.....	20
Quadro 1 - Lista dos representantes das classe de medicamentos dos hipoglicemiantes orais e seus respectivos mecanismos de ação.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1C	Hemoglobina Glicada
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ADA	Associação Americana de Diabetes
ADP	Adenosina Difosfato
AMV	Ácido Mevalônico
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes Mellitus
DMAPP	Dimetilalil Difosfato
FADH ₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FMJ	Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte
FPP	Farnesil Difosfato
G-6-P	Glicose 6 Fosfato
Glut 2	Transportador de Glicose Tipo 2
GPP	Geranyl Difosfato
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermediária
IP ₃	Inositol Trifosfato
IPP	Isopenil Difosfato
K ⁺	Potássio
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MEP	Metileritritol Fosfato
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
OECD	Diretrizes para o Teste de Produtos Químicos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDH	Piruvato Desidrogenase
PKC	Proteína Quinase
PLC	Fosfolipase C
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
VLDL	Lipoproteína de Densidade Baixa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 ESTRATÉGIA DA PESQUISA.....	16
1.2 ESTRUTURA DA TESE	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2.3 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS	21
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
3.1 DIABETES E SUAS COMPLICAÇÕES	24
3.2 TRATAMENTO.....	25
3.2.1 <i>Insulinoterapia</i>	25
3.2.2 <i>Hipoglicemiantes Oraís</i>	28
3.3 TERPENOS.....	31
3.4 ESTRUTURA QUÍMICA DO α E β -PINENO.....	33
3.5 RELAÇÃO DE ESTRUTURA E ATIVIDADE DOS ISÔMEROS CONSTITUCIONAIS ATIVOS (α E β -PINENO).....	36
3.6 AÇÃO FARMACOLÓGICA DOS ISÔMEROS A E B-PINENO NA REDUÇÃO DO DIABETES, DISLIPIDEMIA E INFLAMAÇÃO.	37
4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	39
4.1 ARTIGO 1	39
4.2 ARTIGO 2	48
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
5.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	67
5.2 CONCLUSÕES GERAIS	74
5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS	75
REFERÊNCIAS.....	76

RESUMO

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada por promover uma hiperglicemia plasmática, apresentando uma alteração no catabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. A hiperglicemia é resultante da menor secreção de insulina e/ou resistência a sua ação periférica. A busca por plantas medicinais para tratar essas doenças despertou os pesquisadores e a indústria farmacêutica a investirem mais nas pesquisas de novos fármacos e investigarem substâncias envolvidas em sua ação terapêutica. Dentre as classes de metabólitos secundários usados na terapia tradicional, está a classe de terpenos. Esse grupo é amplamente reconhecido na literatura por seus efeitos antibacterianos, efeitos miorreaxantes e anti-inflamatórios. O (-)- α -pineno e (-)- β pineno são monoterpenos frequentemente encontrados nos óleos essenciais das plantas. Desse modo, buscamos intensificar os estudos destes compostos na busca pelas evidências de seu efeito hipoglicemiante, hipolipidêmico e anti-inflamatório. Método: utilizamos ratos *Wistar* (200-250 g) tratados por via oral com os isômeros nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, ou com glibenclamida (5 mg/Kg), durante sete dias consecutivos. O diabetes foi induzido através da administração de aloxano por via peniana. O efeito anti-inflamatório foi avaliado através do modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos diabéticos, além de analisar a resposta celular dos compostos na inflamação a partir do modelo de peritonite. Resultados: O (-)- β pineno mostrou ter um efeito significativo na redução da hiperglicemia (mg/dL) causada pelo aloxano, reduzindo os índices glicêmicos de forma significativa, nas doses 50 mg/Kg, na (62,2%), e 100 mg/Kg (57,9%). Não apresentou efetividade na redução do colesterol total e nem nas enzimas hepáticas, mas obteve uma efetividade na redução dos triglicerídeos nas doses de 50 mg/Kg (52,7%) e 100 mg/Kg (58,8%). Já o (-)- α -pineno apresentou redução da glicemia em todas as doses testadas 25 (33,6%), 50 (69,1) e 100 mg/Kg (71,2%). Reduziu o colesterol total na dose de 100 mg/Kg (26,2%) e frações, triglicerídeos em todas as doses, com um percentual maior em 100 mg/Kg (57,1%). Além disso, reduziu as enzimas hepáticas AST e ALT na dose de 100 mg/Kg 68,9% e 70,3%, respectivamente. A administração oral da associação dos isômeros (10 mg/Kg) + GLB (2 mg/Kg), causou redução significativa na redução da glicemia em curto prazo, o que nos leva a pensar que o mecanismo de ação do beta pineno pode ser explicado via canais de K^+ ATP-dependentes. Além disso, foi investigado o efeito anti-inflamatório do (-)- α -pineno e (-)- β pineno em ratos diabético. Os resultados mostram que ambos os isômeros foram capazes de reduzir o edema induzido pela carragenina 1% a partir da 2ª hora, além apresentar uma redução dos polímeros nucleares no modelo de peritonite ao participar na quimiotaxia das células imunológicas para o local da inflamação e desempenhar uma redução do processo inflamatório. Conclusões: Os estudos nos leva a relacionar uma relação hipoglicemiante dos isômeros (-)- α -pineno e (-)- β pineno semelhantemente ao mecanismo da glibenclamida e que também participa na redução das lipoproteínas, demonstrando uma atuação na dislipidemia e importante atividade anti-inflamatória. No entanto, são necessários dados mais específicos para elucidar o mecanismo de ação envolvido com as substâncias em estudo.

Palavras-chave: α -pineno. β -pineno. Diabetes. Hipoglicemia. Dislipidemia.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by promoting plasma hyperglycemia, with deficient metabolism of carbohydrates, fats and proteins. Hyperglycemia results from reduced insulin secretion and/or resistance to its peripheral action. The worldwide concern with chronic diseases, and especially diabetes, has stimulated research on its pathophysiology, in order to improve the detection, prevention and treatment of associated complications. The worldwide concern with chronic diseases, especially diabetes, has stimulated research on its pathophysiology, in order to improve the detection, prevention and treatment of associated complications. The search for medicinal plants to treat these diseases has awakened researchers and the pharmaceutical industry to invest more in research into new drugs and investigate substances involved in their therapeutic action. This action is related to the presence of some of its constituents, such as flavonoids, alkaloids, terpenes, tannins, among others, which through preclinical tests, their pharmacological actions can be proven. Among the classes of secondary metabolites used in traditional therapy is the terpene class. Group classified according to the number of isoprene, such as monoterpenes. This group is widely recognized in the literature for its antibacterial, myorelaxant and anti-inflammatory effects. This (-)- α -pinene e (-)- β pinene belongs to this chemical group and is often found in essential oils in plants. Thus, we seek to intensify the studies of the isolated compound of monoterpenes (beta pinene), in the search for evidence of its hypoglycemic effect and a possible participation in the control of dyslipidemias. Method: we used Wistar rats (200-250 g) treated orally with the isomers at doses of 25, 50 and 100 mg/Kg, or with glibenclamide (5 mg/Kg), for seven consecutive days. The anti-inflammatory effect was evaluated through the carrageenan-induced paw edema model in diabetic rats, in addition to analyzing the cellular response of the compounds in inflammation from the peritonitis model. Results: (-)- β pinene was shown to have a significant effect in reducing hyperglycemia (mg/dL) caused by alloxan, significantly reducing glycemic indices at doses of 50 mg/Kg, na (62.2%), and 100 mg/Kg (57.9%). It was not effective in reducing total cholesterol or liver enzymes, but it was effective in reducing triglycerides at doses of 50 mg/Kg (52.7%) and 100 mg/Kg (58.8%). On the other hand, (-)- α -pinene showed a reduction in blood glucose at all doses tested 25 (33.6%), 50 (69.1) and 100 mg/Kg (71.2%). It reduced total cholesterol at a dose of 100 mg/Kg (26.2%) and fractions, triglycerides at all doses, with a higher percentage at 100 mg/Kg (57.1%). In addition, it reduced liver enzymes AST and ALT at the dose of 100 mg/Kg by 68.9% and 70.3%, respectively. Diabetes was induced through the penile administration of alloxan, a very common substance for inducing diabetes by acting specifically by destroying the β cells of the islets of Langerhans. Oral administration of the combination of isomers (10 mg/Kg) + GLB (2 mg/Kg) caused a significant reduction in blood glucose in the short term, which leads us to think that the mechanism of action of beta pinene can be explained. via K⁺ATP-dependent channels. In addition, the anti-inflammatory effect of (-)- α -pinene and (-)- β pinene in diabetic rats was investigated. The results show that both isomers were able to reduce the edema induced by 1% carrageenan from the 2nd hour, in addition to showing a reduction of polymorphonuclear cells in the peritonitis model by participating in the chemotaxis of immune cells to the site of inflammation and playing a reduction of the inflammatory process. Conclusions: The studies lead us to relate a hypoglycemic relationship between (-)- α -pinene and (-)- β pinene isomers similarly to the mechanism of glibenclamide and which also participates in the reduction of lipoproteins, demonstrating an action in dyslipidemia and important anti-inflammatory activity. However, more specific data are needed to elucidate the mechanism of action involved with the substances under study.

Keywords: α -pineno; β -pinene; Diabetes; hypoglycemia; Dyslipidemia.

IMPORTÂNCIA/RELEVÂNCIA PARA A SOCIEDADE

Como encontrar um só fármaco que tenha efeito na redução dos níveis de açúcar no sangue e, ao mesmo tempo, promova uma melhora na dislipidemia e reduza a inflamação?

De que maneira uma pequena mudança na ligação dos compostos orgânicos isômeros, podem impactar diretamente no efeito terapêutico da substância?

A pesquisa em questão mostrou que a busca por medicamentos fitoterápicos ainda é comum e constante pelas indústrias farmacêutica e que os pinenos (classe dos monoterpenos) estão sendo, cada vez mais, estudados pelas evidências demonstradas em alguns trabalhos sobre sua atuação terapêutica na redução da inflamação e na atividade antibacteriana. O princípio ativo encontrado nas plantas medicinais podem ser encontrados distribuídos na natureza na forma de enantiômeros. Esses compostos possuem propriedades físicas e químicas iguais, porém diferem em propriedade de rotação específica, o que lhes conferem singularidade quanto ao efeito terapêutico.

O estudo de compostos isolados de plantas é de extrema importância para os avanços na medicina, como também para qualidade de vida da sociedade. Desse modo, busca-se intensificar os estudos do composto isolado dos monoterpenos (β -pineno e α -pineno), na busca pelas evidências de seu efeito hipoglicemiante e uma possível participação no controle das dislipidemias. Ressalta-se que o estudo de produtos naturais, biologicamente ativos, mostra grandes vantagens na busca por novos fármacos, por apresentarem eficiência na farmacoterapia do diabetes, menos efeitos adversos, menor custo no processo de aquisição e ser amplamente encontrado em plantas medicinais.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ESTRATÉGIA DA PESQUISA

Baseado nos questionamentos e objetivos do trabalho busca-se desenvolver uma pesquisa de caráter científico, de natureza aplicada, com abordagem quantitativa, procedimento experimental e com objetivo de estudo explicativo.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Biofisiologia da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da própria instituição, sob parecer de processo nº 2018.01.018.

Para os experimentos, foram utilizados ratos *Wistar* albinos, machos, adultos, pesando entre 200 a 250 g, mantidos em repouso por no mínimo 24 h em caixas plásticas e forradas com serragem. Os animais receberam água e ração ad libitum e foram mantidos em ambiente controlado com ciclo de 12h claro/escuro, bem como temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (70%). Foram divididos em grupos de 10 animais e distribuídos cinco em cada caixa, conforme as drogas em estudo.

Primeiramente, fez-se a estimativa da dose letal média (DL_{50}) do β -pineno e α -pinene, que ocorreu de acordo com a metodologia adaptada da OECD 423, adaptada da (OECD, 2001). Os ratos foram separados aleatoriamente em grupos ($n=3$), em que o grupo controle recebeu salina (0,9%), e os demais grupos foram tratados com os isômeros na dose de (2000 mg/Kg), com administração de substância por via oral. Em seguida, os animais foram observados em 10, 20, 30 minutos e a cada 1, 2, 3 e 4 horas, após o tratamento. Posteriormente, passou-se a serem observados diariamente, durante 14 dias, para verificar o número de mortes e ocorrência de parâmetros presentes na tabela de Malone (1983).

O β -pineno apresentou uma redução dos níveis séricos de glicose, triglicerídeos e uma redução do processo inflamatório, já o α -pinene reduziu os índices elevados de glicose no sangue dos animais diabéticos, além de reduzir as taxas de colesterol total e frações e triglicerídeos. Também, mostrou atividade efetiva na diminuição das taxas enzimáticas do fígado (AST e ALT) e uma redução do processo inflamatório.

Foi administrado aloxano (40 mg/Kg), através da veia peniana em animais previamente anestesiados com ketamina com 100 mg/kg (i.p), associada com cloreto de xilazina a 2% na dose de 9 mg/Kg (i.p). Após 48 h, foi coletado do plexo retro-orbital 1 mL de sangue em tubos com gel separador (Vacuette, Brasil), novamente, com os animais sob anestesia inalatória. Somente os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 250 mg/dL foram

submetidos a administração diária via oral de β -pineno e α -pinene (25, 50, 100, 200 mg/Kg), e, do hipoglicemiante oral glibenclamida (Gli) (5 mg/Kg) durante uma semana.

A leitura dos parâmetros bioquímicos foi determinada pela glicose oxidase peroxidase. Análises bioquímicas foram centrifugadas a 3000rpm por 10min para obter o soro, que foi usado para determinar glicose, colesterol total (TC), HDL, LDL e triglicérides (TG) e atividades AST e ALT por métodos colorimétricos enzimáticos padrão, de acordo com as instruções do fabricante (Labtest®, Brasil).

O uso de aloxano é bastante comum para indução de diabetes, por agir destruindo especificamente as células β das ilhotas de Langerhans. A citotoxicidade que promove é condicionada pela grande capacidade da célula β em acumular a droga, aliada ao fato desta célula demonstrar uma maior sensibilidade aos radicais peróxidos, quando comparada a outros tecidos (SILVA; NOGUEIRA, 2015).

A ação diabetogênica do aloxano pode ser conferida através de sua administração parenteral: intravenosa, intraperitoneal e subcutânea. A dose a ser utilizada depende da espécie do animal, forma de administração e status nutricional (LENZEN, 2008). Existem diversos mecanismos para produção do diabetes. Os principais são: estresse, infecções, toxinas, ou manipulações, incluindo a pancreatectomia; lesões do sistema nervoso central; uso de hormônios anti-insulínicos; exposição à hidrocortisona ou ACTH; indução por vírus e o uso de agentes químicos betacitotóxicos. Aloxana e estreptozotocina são os dois agentes químicos responsáveis pela citotoxicidade específica para as células beta, também são consideradas substâncias mais estudadas para esta finalidade. Tratam-se de drogas que causam insuficiência insulínica primária do pâncreas, provocando uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas da administração, seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 h subsequentes (LERCO et al., 2003).

Uma desvantagem desse método é o elevado índice de mortalidade relativa, devido à toxicidade das substâncias. A estreptozotocina possui uma maior especificidade sobre as células beta e menor toxicidade geral que o aloxano, segundo relatos de estudos primários, que já observavam essa diferença entre as drogas (SILVA et al., 2011). No entanto, a escolha pelo aloxano deu-se, primeiramente, pela questão econômica e disponibilidade desta substância em nossos laboratórios e pelo fato do aloxano ser amplamente difundido no modelo de diabetes experimental. Além disso, tem a vantagem de estar padronizado em nosso laboratório experimental.

Após a escolha da droga diabetogênica e o modelo experimental, foram utilizados as doses do β -pineno e α -pineno, conforme a margem de segurança obtida com a avaliação da

DL₅₀. Fez-se, inicialmente, testes de triagem para saber o efeito hipoglicemiante da droga de acordo com os parâmetros bioquímicos observados, e, em seguida, com as doses de (25, 50, 100 mg/Kg). As doses menores do β -pineno e α -pinene não apresentaram efeito terapêutico, assim como a dose de 2 mg/Kg da glibenclamida, que já é utilizada amplamente no mercado como hipoglicemiante oral na dose de 5 mg/Kg. A partir destes dados, foi investigado possíveis efeitos potencializadores dos isômeros. Para obtenção deste resultado, foi induzido o diabetes com uma única injeção de aloxano (40 mg/Kg) por via intravenosa nos animais. Após 48 h, os ratos diabéticos (glicemia ≥ 250 mg/dL) foram selecionados para estudo. Antes de se iniciarem os estudos de potencialização, foi feito o tratamento dos animais com as seguintes doses: β -pineno (10 mg/Kg), glibenclamida (2 mg/Kg) e a associação de β -pineno (10 mg/Kg) + glibenclamida (2 mg/Kg). No último dia (o 7º), o sangue foi coletado para determinação da glicemia. O mesmo procedimento e doses foram realizados com o α -pinene.

Além do efeito hipoglicemiante, dislipidêmico e potencializador dos isômeros, buscou-se avaliar o efeito anti-inflamatório das substâncias em ratos previamente diabéticos. Após a indução do diabetes e a coleta do sangue do animal, os ratos considerados diabéticos foram tratados por via oral (v.o) com β -pineno e α -pinene na dose (50 mg/Kg), por ser considerada a dose menor efetiva, glibenclamida (5 mg/Kg) e soro fisiológico por 7 (sete) dias. Posteriormente, seguiu-se com a avaliação dos possíveis efeitos anti-inflamatórios da droga, através do modelo convencional de edema de pata induzido por carragenina, segundo o método Winter et al. (1962). Passados 7 dias da indução do diabetes e da continuidade do tratamento destes animais com o (β -pineno e α -pineno) e a droga hipoglicemiante de referência, seguiu-se com a experimentação para avaliação do edema de pata. Inicialmente, suas patas traseiras foram medidas no pletismógrafo para obtenção de resultados basais, tempo zero (T zero). As patas foram estendidas e imersas no aparelho até a borda póstero-proximal da proeminência do calcâneo. Após 1h do último tratamento, foi realizada uma injeção intraplantar de 40 μ L/pata de uma solução de carragenina a 1% p/v, na pata traseira direita. O volume das patas foi medido nos intervalos 1, 2, 3, 4 e 24 h (tempos padrões), para avaliação progressiva atípica do edema, que ocorre com ratos diabéticos. O volume do edema (VE), decorrente de uma reação inflamatória aguda, foi determinado pela diferença entre o volume final (VF) e o volume inicial (VI) das patas.

Além dessa análise, também foi investigado a participação das células durante o processo inflamatório, pelo modelo de peritonite induzido por carragenina. No último dia de tratamento, 1 h após a administração das drogas, cada animal recebeu uma injeção intraperitoneal de 1% de carragenina. Decorridas 4 h, foram administrados 3 mL de PBS

heparinizado na cavidade peritoneal dos animais, seguida de uma massagem suave na região abdominal do camundongo para coleta do fluido peritoneal, o qual foi utilizado para a contagem de leucócitos pelo dispositivo ABX Micros 60.

Depois de todas as experimentações, os resultados foram alcançados e expressos pelo programa “*Software GraphPad Prism*”, versão 5.0. Os dados que apresentaram distribuição normal foram representados como média \pm erro padrão da média (SEM), analisados através da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados que obtiveram $p < 0,05$.

1.2 ESTRUTURA DA TESE

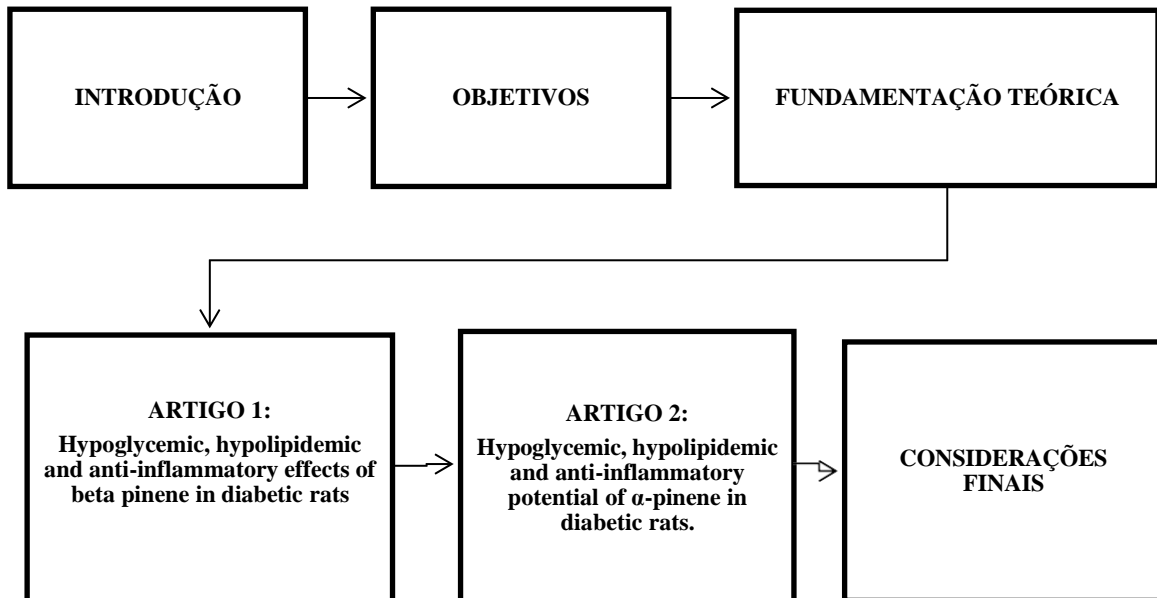
A pesquisa mostra que os compostos isômeros (β -pineno e α -pineno) apresentam uma ação hipoglicemiante, em ratos diabéticos induzidos com aloxano. O α -pineno apresenta efeito terapêutico na redução e controle do colesterol total e frações, além de reduzir as gorduras hepáticas AST e ALT. O β -pineno apresenta um efeito mais discreto no controle da dislipidemia reduzindo as taxas de triglicérides e não tendo participação efetiva no colesterol total. As substâncias testadas apresentam também um importante sinergismo com a glibenclamida, droga da classe das sulfanilureia, mostrando-se um mecanismo de ação semelhante à droga padrão. Ambos apresentam efeito estatisticamente efetivo na redução da inflamação e nas respostas inflamatórias evidenciadas no teste de peritonite, necessitando de mais estudos para elucidar o mecanismo envolvido nesta ação.

A tese foi organizada em 4 capítulos: o Capítulo I trata da fundamentação teórica; o Capítulo II apresenta o objetivo geral e específicos, como também os questionamentos, mostrando a motivação para realização da tese e contextualizando com a literatura científica. No capítulo III, apresenta o artigo publicado, que mostra a ação do β -pineno na redução de diabetes, dislipidemias e inflamação, intitulado: *Hypoglycemic, hypolipidemic and anti-inflammatory effects of beta pinene in diabetic rats*. Foi publicado na Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (IF=3,7), Qualis B2 na área de Ciências Biológicas II. No Capítulo IV, há o artigo submetido, com o título: *Hypoglycemic, hypolipidemic and anti-inflammatory potential of α -pinene in diabetic rats*. E, no capítulo V, as Considerações finais, em que é apresentada a discussão geral, que dá sentido ao conjunto de evidências e achados da tese. As conclusões gerais, envolvendo os monoterpenos, são apresentadas nessa secção. A fundamentação teórica, apresentada no Capítulo I, está dividida em tópicos que norteiam a elucidadação do presente estudo. Além disso, permite analisar dados, compará-los com outros trabalhos e discutir os resultados ora encontrados. Os tópicos foram divididos em: Diabetes e

suas complicações; e Tratamento, subdividido em Insulinoterapia, hipoglicemiantes orais, Terpenos, Monoterpenos (α e β -pineno), Relação de estrutura e Atividade dos compostos constitucionais ativos (α e β -pineno) e Ação farmacológica dos isômeros (α e β -pineno), na redução do diabetes, dislipidemia e inflamação. As referências da introdução e da fundamentação teórica encontram-se ao final deste capítulo.

Fluxograma 1 - Estrutura da Tese

**ANÁLISE COMPARATIVA DO EFEITO HIPOGLICEMIANTE DE
MONOTERPENOS ISÔMEROS (α e β PINENO) – EM MODELO DE DIABETES
EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ALOXANO**



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar de modo comparativo os monoterpenos (-) - α -pineno e (-) - β pineno nos efeitos hipoglicemiantes, hipolipidêmico e anti-inflamatório, em ratos diabéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito hipoglicemiante dos compostos isômeros (-) - α -pineno e (-) - β pineno em ratos diabéticos induzidos com aloxano;
- Investigar os eventos celulares envolvidos na resposta inflamatória dos isômeros;
- Descrever a relação de estrutura e atividade dos isômeros constitucionais ativos (α e β -pineno) na redução do diabetes, dislipidemia e inflamação.

2.3 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

O diabetes melito (DM) é uma doença crônica caracterizada por altos níveis de glicose no sangue, decorrente de uma deficiência relativa ou absoluta na ação da insulina. Em 2017, cerca de 425 milhões de pessoas no mundo foram diagnosticadas com DM e estimativas apontam que esse número subirá para 629 milhões até 2045 (FEDERATION, 2017), tornando-se uma das doenças mais letais da humanidade, juntamente com o câncer, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (CHAUHAN et al., 2010).

O termo tipo 1 indica destruição das células β , que eventualmente leva ao estágio de deficiência absoluta de insulina, quando a administração de insulina é necessária para prevenir cetoacidose, coma e morte. A destruição das células β é geralmente causada por processo autoimune, que pode ser detectado por autoanticorpos circulantes, como anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD), anti-ilhotas e anti-insulina, e, algumas vezes, está associado a outras doenças autoimunes, como a tireoidite de Hashimoto, a doença de Addison e a miastenia gravis (OLIVEIRA, 2015).

O diabetes mellitus tipo 2 é caracterizado por uma deficiência ou falha na manutenção da homeostase da glicose, resulta de defeitos na secreção e ação da insulina, associada ao estilo de vida, que pode desencadear a obesidade. A insulina que é produzida no DM2 não é suficiente para controlar a produção de glicose pelo fígado ou promover capacitação de glicose pelo músculo esquelético (PEREIRA, 2011). O histórico familiar de diabetes é um fator de risco para complicações microvasculares, insuficiência renal, cegueira, doença cardiovascular e

dislipidemia (DISTEFANO; WATANABE, 2010). O diabetes gestacional é diagnosticado durante a gestação (COUSTAN, 2013).

Semelhante ao DM tipo 2, o diabetes mellitus gestacional associa-se tanto a resistência à insulina quanto a diminuição da função das células beta pancreáticas. Outros tipos específicos de DM constituem uma quarta classificação do DM e pode ser reportado por uma gama de fatores, dentre os quais relacionados a defeitos genéticos na função das células β , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, induzido por medicamentos ou agentes químicos e infecções (OLIVEIRA; VENCIO, 2013).

O diabetes é uma das principais questões de saúde e afeta muitas pessoas de diferentes idades em quase todos os países do mundo (ROGLIC; UNWIN, 2010). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, há aproximadamente 415 milhões de adultos portadores de diabetes mundialmente (FIOCRUZ, 2016). Já no Brasil, a porcentagem chega a 8,9% dos adultos diagnosticados com a doença. Constitui, atualmente, um sério problema de saúde pública (BRASIL, 2016). O agravante para essa doença são as complicações, uma vez que surgem pela associação de um desequilíbrio dos níveis de glicose, tempo de duração da doença, junto a sua descompensação, o que resulta no aumento dos riscos para adquirir problemas micro e macrovasculares (OLIVEIRA; VENCIO, 2014). Entre as complicações relacionadas ao DM, a dislipidemia e as alterações vasculares, que envolvem danos oxidativo renais e hepáticos, são evidenciados como a principal causa de morbimortalidade nos países desenvolvidos e constituem preocupação crescente para as autoridades de saúde (SILVA et al., 2019).

O Ministério da Saúde criou um plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis, enfatizando ações populacionais para controlar essas doenças, entre elas, o diabetes. Visa educar e conscientizar a população sobre a importância da alimentação adequada e os prejuízos ocasionados pelo fumo e álcool (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

O diagnóstico correto e precoce do diabetes e das alterações da tolerância à glicose é essencial para que sejam adotadas medidas terapêuticas de modo que possam evitar o aparecimento de diabetes nos indivíduos com tolerância diminuída e retardar o aparecimento das complicações crônicas nos pacientes diagnosticados. Os critérios diagnósticos baseiam-se na glicose plasmática de jejum (8 horas), nos pontos de jejum e de 2 horas após sobrecarga oral de 75g de glicose (Teste Oral de Tolerância à Glicose – TOTG) e na medida da glicose plasmática casual (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

A preocupação mundial com doenças crônicas, em especial o diabetes, tem estimulado pesquisas sobre sua fisiopatologia, a fim de que haja melhora na detecção, na prevenção e no

tratamento das complicações associadas (FILHO et al., 2020). A busca por plantas medicinais para tratar essas doenças despertou os pesquisadores e a indústria farmacêutica a investirem mais nas pesquisas de novos fármacos e investigarem substâncias envolvidas em sua ação terapêutica (BÁRBARA et al., 2019). Esta ação está relacionada à presença de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, entre outros, que, por meio de testes pré-clínicos, suas ações farmacológicas podem ser comprovadas. Por esse motivo, essas substâncias têm sido objeto de incessantes estudos envolvendo áreas multidisciplinares, e isso enriquece os conhecimentos sobre a fonte medicinal natural e suas substâncias produzidas oriundas dos metabólitos secundários (ROBERT et al., 2014).

Dentre as classes de metabólitos secundários usados na terapia tradicional está a classe de terpenos. Eles são substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas, originados do isopreno, que, por sua vez, origina-se do ácido mevalônico na via do mevalonato. São classificados quanto ao número de múltiplos de sua unidade estrutural básica formada por cinco carbonos, o isopreno (C_5H_8). Pode ser classificados como: isoprenos ou hemiterpenos (5 C), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C), diterpenos (20 C), sesterpenos (25 C), triterpenos (30 C), tetraterpenos (35 C) e polisoprenóides, quando possuem mais de 35 carbonos (ARBO et al., 2009; BAKKALI et al., 2008).

Os pinenos são da classe dos monoterpenos, comumente encontrados em óleos essenciais, e são utilizados na medicina popular para o tratamento de distúrbios intestinais e respiratórios. O α e β -pineno são representantes dessa classe. São classificados como isômeros constitucionais ativos e possuem ações miorelaxantes, anti-inflamatória e hipoglicemiante (PEREIRA et al., 2021).

O estudo de produtos naturais, biologicamente ativos, é vantajoso na busca por novos fármacos, visto apresentarem eficiência na farmacoterapia do diabetes, menos efeitos adversos, menor custo e ser amplamente encontrado nas plantas medicinais. Assim, pretende-se intensificar os estudos dos compostos isômeros dos monoterpenos (α e β -pineno), na busca pelas evidências de seu efeito hipoglicemiante e uma possível participação no controle das dislipidemias e inflamação, além de analisar a relação estrutura atividade entre eles.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 DIABETES E SUAS COMPLICAÇÕES

O diabetes (DM) é classificado como uma das doenças que mais desencadeia o aumento nos índices de morbidade e mortalidade, em diferentes grupos populacionais, devido às suas complicações crônicas, macro e microvasculares. Os efeitos macrovasculares podem se manifestar como doença coronariana, ou eventos microvasculares, como comprometimento dos vasos de membros inferiores (MORRIS, 2001). O DM descompensado leva a inúmeras complicações crônicas, como cegueira, insuficiência cardíaca e/ou renal, neuropatia e retinopatia (OLIVEIRA; VENCIO, 2018). Os sintomas clássicos de diabetes classificados como os 4P, a saber, **p**oliúria, **p**olidipsia, **p**olifagia e **p**erda involuntária de peso. Outros sintomas de natureza clínica são: fadiga, fraqueza, letargia, prurido cutâneo e vulvar, balanopostite e infecções de repetição (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Entre as complicações relacionadas ao DM, a dislipidemia é responsável pelas principais alterações que envolvem danos oxidativo renais e hepáticos, levando ao agravamento do caso clínico e aumentando as taxas de mortalidade (SILVA et al., 2016). Sabe-se, ainda, que a interação da hiperglicemia com dislipidemias e outras patologias determinam o curso clínico para as complicações vasculares (OLIVEIRA; VENCIO, 2014).

Dislipidemias são anomalias dos lipídeos no sangue (BARBOSA et al., 2017). Elas, muitas vezes, ocorrem de forma silenciosa na infância e só se desenvolvem na vida adulta (FARIA; DALPINO; TAKATA, 2008). Etiologicamente, é classificada como dislipidemia primária e dislipidemia secundária. A primeira está relacionada à origem genética, que é causada pela desordem da síntese e degradação de lipídios, e a dislipidemia secundária é causada por outras doenças ou uso de medicamento. O DM 2 e a obesidade são classificados como dislipidemia secundária. Este fato dá-se devido a uma elevação das taxas de lipídios e de lipoproteínas apresentadas na corrente sanguínea de pacientes com DM 2 (SCHAAN et al., 2004).

Lipoproteínas são estruturas macromoleculares que facilitam o metabolismo lipídico e seu transporte na circulação sanguínea. Elas são classificadas como: lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), e quilomícrons (LIMA, 2007).

No DM 2, os níveis de triglicerídeos elevam e os níveis de HDL diminuem. Isso é devido à resistência a insulina e a obesidade. Esta resistência acontece devido ao excesso de ácidos

graxos circulantes derivados do tecido adiposo encontrado no fígado. Devido à produção excessiva de ácidos graxos, ocorre a redução da sensibilidade à insulina no tecido muscular e uma redução na produção de interleucinas, fatores de crescimento e outras citosinas pelo tecido adiposo (PEREIRA, 2011).

A insulina, que é produzida nos DM 2, não é suficiente para controlar a produção de glicose pelo fígado ou promover capacitação de glicose pelo músculo esquelético (GLEW; CRABB, 2007). Consequentemente, o DM 2 promove uma descompensação, caracterizada pelo aumento na produção de glicose, hipertrigliceridemia e VLDL, associada a redução na HDL e elevação na LDL, além de resultar no decréscimo da lipólise destas gorduras presentes nas partículas de VLDL (BRASIL, 2006).

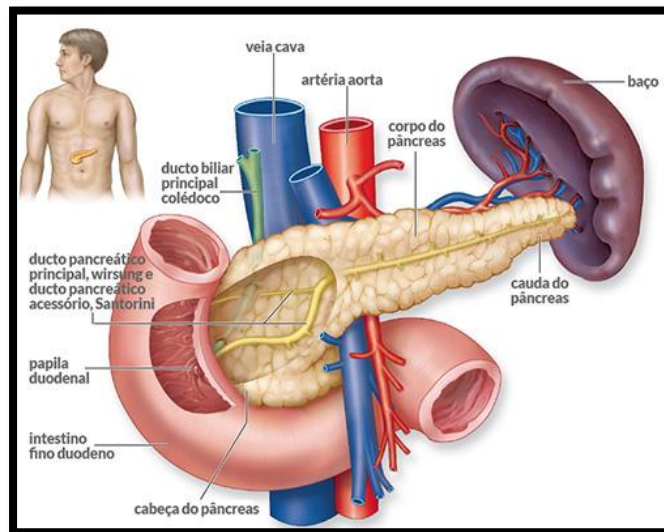
3.2 TRATAMENTO

Um dos fatores relacionados ao aumento da glicemia é a absorção intestinal de glicose. A hiperglicemia contribui para o desequilíbrio de lipídios circulantes, já que a resistência à insulina permite um metabolismo inadequado na produção desses lipídios. O controle glicêmico em indivíduos com DM é imprescindível para que haja uma compensação das taxas lipídicas evitando a complicação da doença. Além disso, os maus hábitos alimentares, sedentarismo e história familiar influenciam nas alterações das lipoproteínas plasmáticas circulantes no sangue. O Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença endócrina mais comum na infância e adolescência, em que a secreção de insulina é defeituosa, o que resulta na dependência exógena desse hormônio (SCHOFIELD et al., 2016).

3.2.1 *Insulinoterapia*

No DM 1, há uma incapacidade em produzir insulina devido as células beta pancreáticas serem destruídas previamente por um processo autoimune. Logo, quando pouca ou nenhuma insulina vem do pâncreas, o corpo não consegue absorver a glicose do sangue e as células ficam sem insulina, resultando na hiperglicemia (GROSSI et al., 2003). A insulina é sintetizada e secretada no pâncreas pelas células Beta das ilhotas de Langerhans (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura do pâncreas

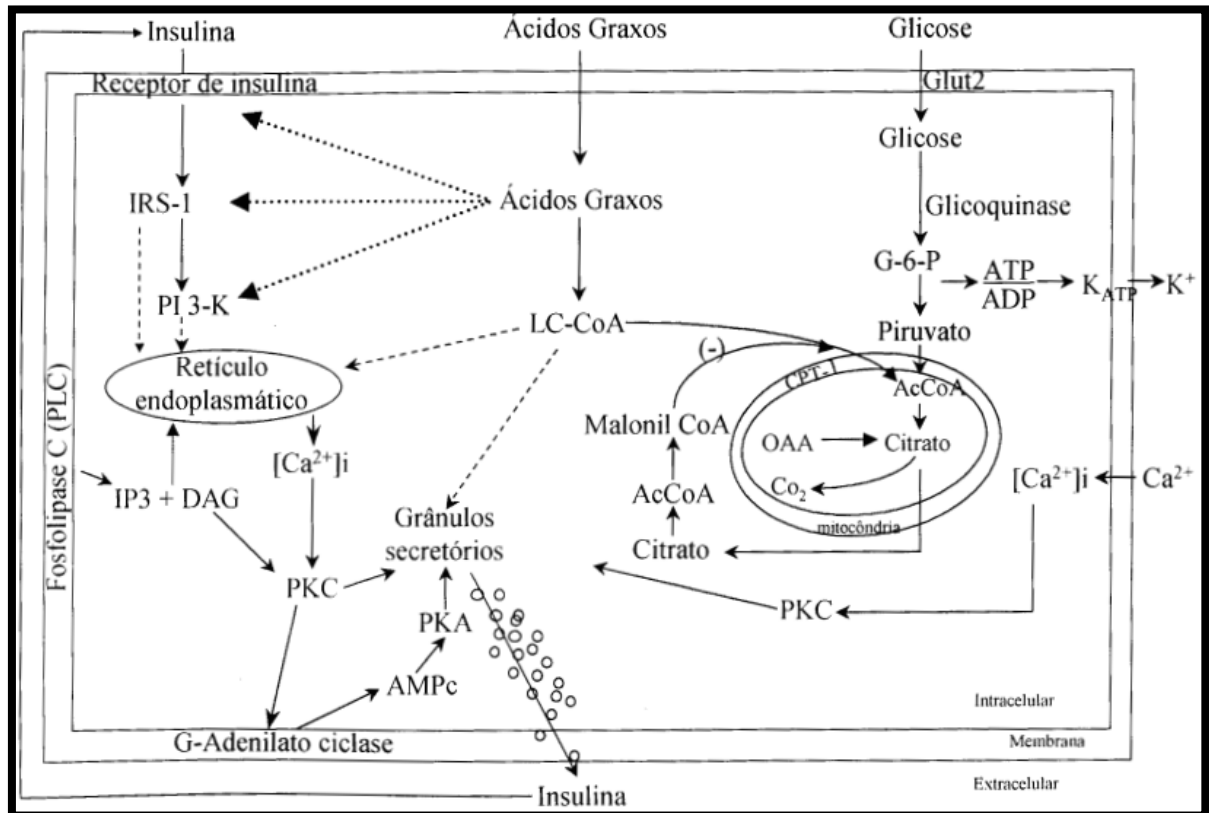


Fonte: Cirurgia de Pâncreas Brasília (2016)

A glicose é transportada para o interior da célula B por uma proteína integral de membrana, denominada Glut-2. Após entrar na célula B, a glicose é fosforilada pela enzima glicocinase à glicose-6-fosfato (G-6-P). O destino preferencial da G-6-P na célula B é a glicólise. O piruvato formado no citoplasma é transportado à mitocôndria, onde é convertido a acetil-CoA pela piruvato desidrogenase (PDH). Em seguida, acetil-CoA entra no ciclo de Krebs, levando a um aumento de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂). O metabolismo de glicose gera ATP e a fração ATP/ADP aumenta no citoplasma. Essa relação ATP/ADP aumentada provoca o fechamento dos canais de potássio e a consequente despolarização da membrana celular que abre canais de cálcio, sensíveis à voltagem.

O aumento do influxo de cálcio para a célula B resulta em despolarização suplementar da membrana plasmática e desencadeamento do processo excitatório. A estimulação das células B pela glicose leva à ativação de isoformas da fosfolipase C (PLC), promovendo a hidrólise de fosfolípidos de membrana e gerando inositol 1-4-5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol(DAG). O IP₃ ativa os canais de cálcio localizados na membrana do retículo endoplasmático com a saída de cálcio da organela e aumento da concentração desse íon no citossol. O DAG, por sua vez, também produz o mesmo efeito sobre a concentração de cálcio intracelular, ao ativar os canais de cálcio sensíveis à voltagem da membrana plasmática, permitindo a passagem do cátion do meio extracelular para o intracelular. O DAG também ativa a proteína quinase C (PKC), que ativa proteínas dos grânulos secretórios de insulina que, juntamente com o Ca²⁺, promoverão a ativação do sistema de microtúbulos e microfilamentos, responsável pela translocação desses grânulos para as proximidades da membrana plasmática e consequente exocitose (Figura 2).

Figura 2 - Esquema do processo de regulação da secreção de insulina na célula Beta.

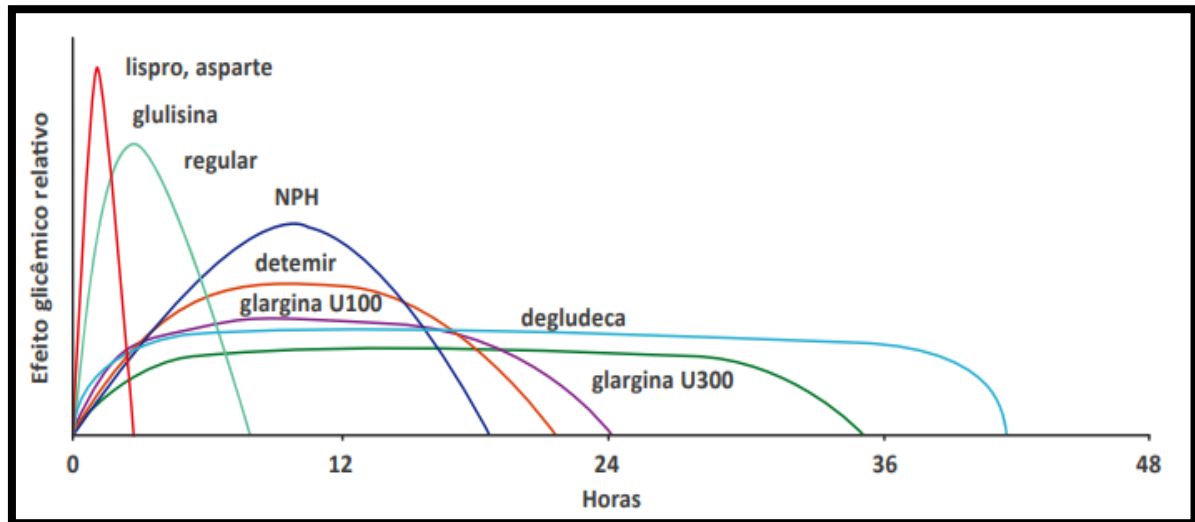


Esquemáticação dos principais eventos no processo de regulação da secreção de insulina na célula B. Insulina exógena ou liberada dos grânulos secretórios interage com o receptor de insulina, que ativa IRS-1/PI 3-K, levando à liberação de Ca^{2+} intracelular do retículo endoplasmático por mecanismo desconhecido. A concentração aumentada de Ca^{2+} intracelular leva à secreção de insulina, intermediada pela PKC que promove a ativação e translocação desses grânulos para o processo de exocitose. (HABER, 2001).

A ação da insulina na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor de membrana plasmática. O mecanismo de ação da insulina não está bem esclarecido, mas se sabe que ela induz a autofosforilação do receptor, aumentando a sua capacidade de fosforilar um ou mais substratos protéicos intracelulares. A fosforilação de seus substratos dá início a uma série de eventos que regula os seus efeitos metabólicos e o estímulo ao crescimento celular (HABER, 2001).

Em situações normais, a glicemia é mantida dentro limites estreitos pelo equilíbrio entre a entrada de glicose no sangue para o fígado e, como resultado, há absorção intestinal após as refeições e absorção de glicose por tecidos periféricos, como o músculo. Ocorre um perfil basal de insulina variável 24h por dia, e a sensibilidade maior ou menor de insulina, vai depender na necessidade da insulina basal (SEMEDO et al., 2021). Essa observação é essencial para classificar a dose e tipo de insulina será necessária para usar durante as 24 h. A insulina de ação rápida pode ser usada para reduzir os níveis de glicemia para valores menores quando há um pico nos seus níveis de hiperglicemia (GUIMARÃES et al., 2018). Vide Figura 3.

Figura 3 - Perfis de ação das diferentes insulinas e análogos de insulinas.



Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes (2017).

Posteriormente, foram criadas as insulinas de ação prolongada. Essas insulinas foram desenhadas para terem um tempo maior de ação e uma posologia cômoda de apenas uma aplicação por dia. Estas insulinas apresentam uma menor variabilidade que a insulina NPH e um menor risco de hipoglicemia, notadamente, a hipoglicemia noturna (SEMEDO et al., 2021).

3.2.2 Hipoglicemiantes Orais

No DM 2, a insulina produzida não é suficiente para controlar a produção de glicose pelo fígado nem promover a captação de glicose pelo músculo esquelético (GLEW; CRABB, 2007). Portanto, é necessário fazer o uso dos hipoglicemiantes orais. Esses medicamentos têm o objetivo de manter os índices glicêmicos normais na corrente sanguínea.

O mecanismo de ação dessa classe é separado da seguinte forma:

- Medicamentos que incrementam a secreção de insulina pelo pâncreas – sulfanilureias e glinidas; Diminuir a produção hepática de glicose – biguanidas;
- Reduzir a velocidade de absorção de glicídeos – inibidores das alfa-glicosidases;
- Aumentam a utilização periférica de glicose – glitazonas;
- Fármacos incretinomiméticos.

Quadro 1 - Lista dos representantes das classe de medicamentos dos hipoglicemiantes orais e seus respectivos mecanismos de ação

MEDICAMENTO	MECANISMO DE AÇÃO
SULFONILUREIAS	
<p>Glimeperida Glibenclamida Clorpropamida Glicazida</p>	<p>Atuam estimulando a produção endógena da insulina através das células betas do pâncreas. Duração de 8-24 horas. Utilizadas para controle glicêmico em jejum e glicemia de 24 h. É potente na redução da HbA1C - 2%. Podem causar hipoglicemia. Desta classe, a clorpropamida e glibenclamida são as mais propensas a causarem hipoglicemia.</p>
GLINIDAS	
<p>Repaglinida Neteglinida</p>	<p>Assim como a classe anterior, atuam estimulando a produção endógena de insulina, com duração rápida para ação de 1-3 horas. Utilizadas para controle da glicemia pós-prandial. Possui um potencial médio na redução da HbA1C de 1-1,5%. Promovem hipoglicemia e aumento de peso.</p>
BIGUANIDAS	
<p>Metformina</p>	<p>Atua reduzindo inicialmente a produção hepática de glicose e no combate a resistência insulínica. Possui um potencial de redução da HbA1C alto - 2%. Promove uma intolerância gastrointestinal, mas não causa hipoglicemia como as classes anteriores citadas. Promove uma perda de peso discreta e é contraindicado para disfunções hepáticas, renal, pulmonar e cardíaca.</p>

INIBIDORES DA ALFAGLICOSIDADE	
Arcabose	Atua retardando absorção intestinal da glicose. Tem um baixo potencial na redução da HbA1C – 0,5 a 0,8%. Promove uma intolerância gastrointestinal. Utilizada para prevenção pré-prandial
GLITAZONA	
Pioglitazona	Inicialmente atua na resistência a insulina e também na redução da produção de glicose no fígado. Aumenta a sensibilidade à insulina nos músculos, tecido gorduroso e fígado. Reduz a HbA1C com potência intermediária 0,5-1,4%. Promove aumento de peso, fator que o torna propenso a causar insuficiência cardíaca.
INCRETINOMIMÉTICOS E INIBIDORES DE DPP-4	
Sitagliptina Vildagliptina Liraglutida Exenatida Saxagliptina Linagliptina	Considerados uma nova classe de hipoglicemiantes orais, cujo mecanismo é estimular as células betas para aumentar a síntese de insulina, além de agir nas células alfas para a redução da produção de glucagon. Potencial médio para redução da HbA1C* 0,5-0,8%.
INIBIDORES DA SGLT2	
Canagliflozin Empagliflozina Dapagliflozina	Bloqueiam o SGLT-2, reduzindo a reabsorção tubular da glicose pelo rim, provocando um aumento da glicosúria e, assim, promove uma diminuição da glicemia tanto de jejum quanto a pós-prandial, de modo totalmente independente da ação da insulina.

Fonte: Do Autor.

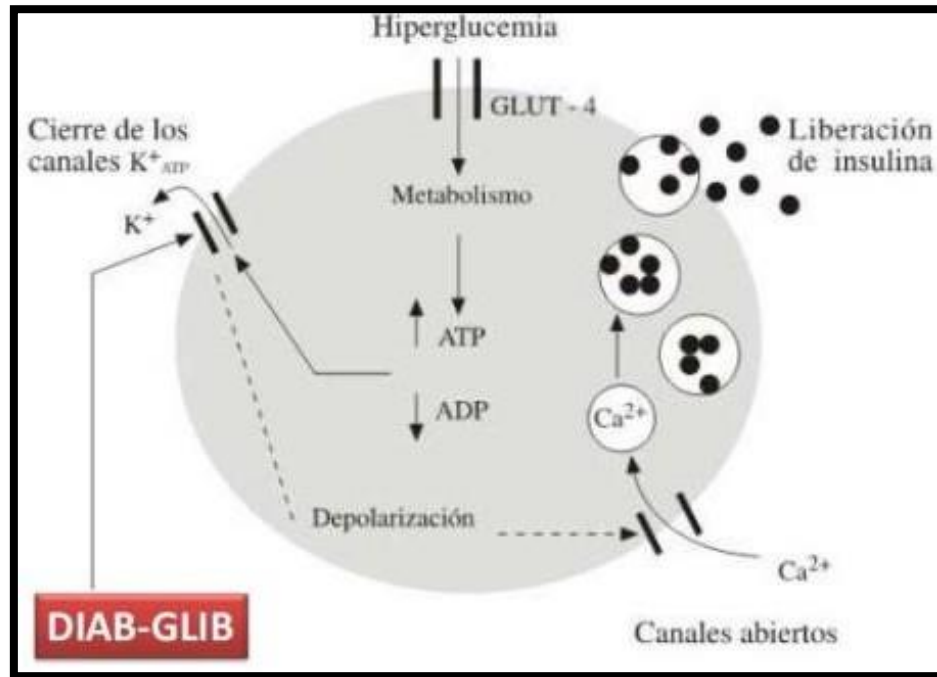
* HbA1C: hemoglobina glicada

Modificado das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019.

O DM 2 é considerado como não insulino dependente e caracterizado por uma resistência tecidual à insulina e com uma deficiência na secreção do hormônio pelas células betas pancreáticas (VERICEL, 2004). A resistência à insulina vem sendo associada hipertriglicéidemia, hiperlipidemia, hiperuricemia e hipertensão (MORO, 2003). Ela é observada inicialmente no tecido muscular e pode ser influenciada por fatores como obesidade, inatividade física e genética. Ocorre com mais frequência quando associada à aterosclerose, dislipidemia e hipertensão arterial (GUIMARÃES et al., 2018).

A droga padrão utilizada neste estudo foi a glibenclamida. Como já citado anteriormente, pertence à classe das sulfonilureias e estimulam a secreção de insulina pelo bloqueio dos canais de K^+ - ATP dependentes das membranas das células beta pancreáticas, causando uma despolarização e influxo de Ca^{2+} (DAVIS, 2006).

Figura 4 - Mecanismo de ação das Sulfanilureias – Glibenclamida. Droga referencia para o presente estudo.



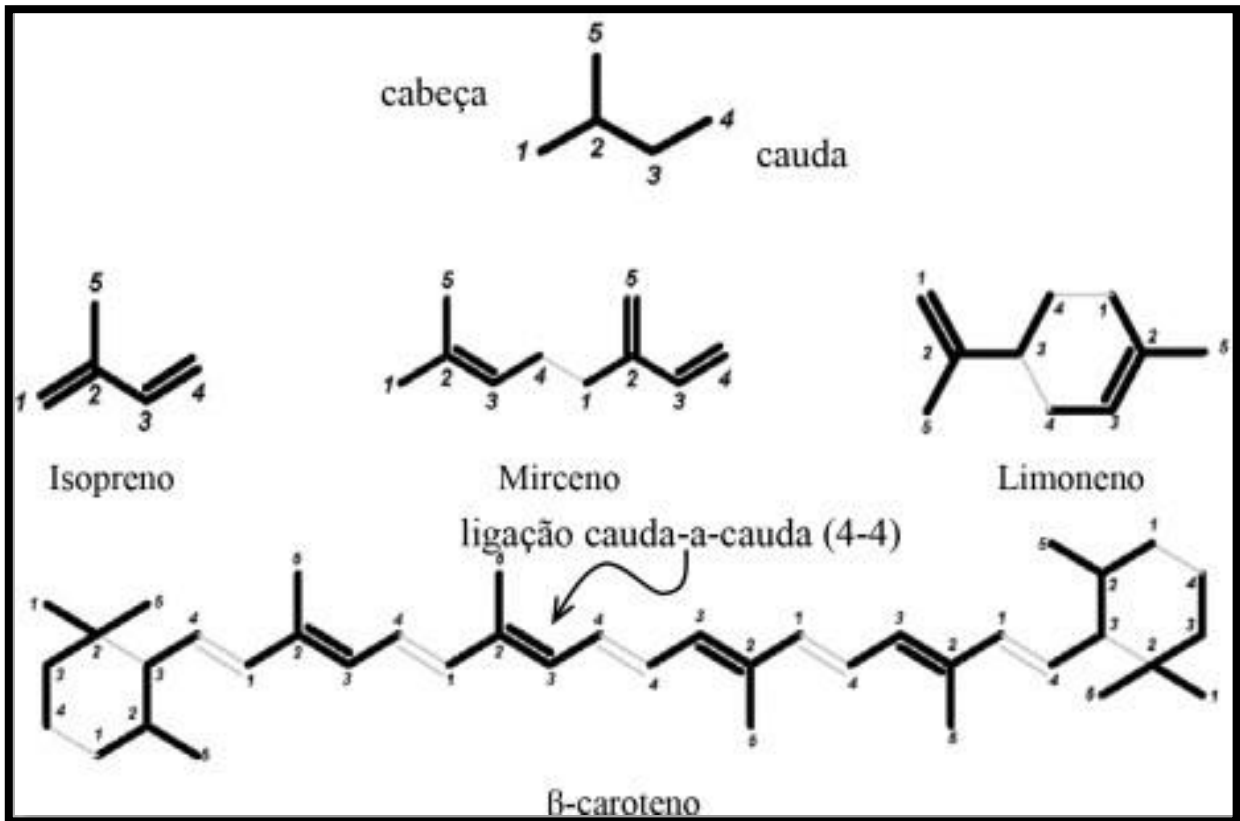
Fonte: Mecanismo de ação das Sulfanilureias (2021).

3.3 TERPENOS

Uma grande diversidade de compostos químicos podem ser sintetizados pelas plantas. Isso ocorre por meio de diversas vias bioquímicas, ao produzirem os metabólitos secundários (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011). Os terpenos constituem a maior classe de produtos naturais, com mais de 55.000 compostos já divulgados (CHANG et al., 2010; JORGETTO et al., 2011; SANTOS et al., 2017). Quimicamente, possuem apenas hidrogênio e carbono em sua estrutura e são definidos como “alcenos naturais”, isso devido a apresentarem uma dupla ligação carbono-carbono, sendo caracterizado como um hidrocarboneto insaturado (MC MURRY, 2011). Quando um terpeno apresenta um oxigênio, o mesmo é denominado de terpenoide e, assim, apresenta diferentes funções químicas, entre as quais: ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos. Possuem a fórmula molecular ($C_{5}H_{8}$) e unidades isoprênicas, ligada na ordem m “cabeça-a-cauda” (LOMMIS; CROTEAU, 2014). Observe Figura 5.

Os terpenos podem ser classificados de acordo com a quantidade de resíduos de isopreno que existem em sua estrutura química (KRIVORUCHKO; NIELSEN, 2014). Também são classificados como Hemiterpenos, Monoterpenos, Sesquiterpenos, Diterpenos, Triterpenos, Tetraterpenos, Politerpenos (FELIPE; BICAS, 2017).

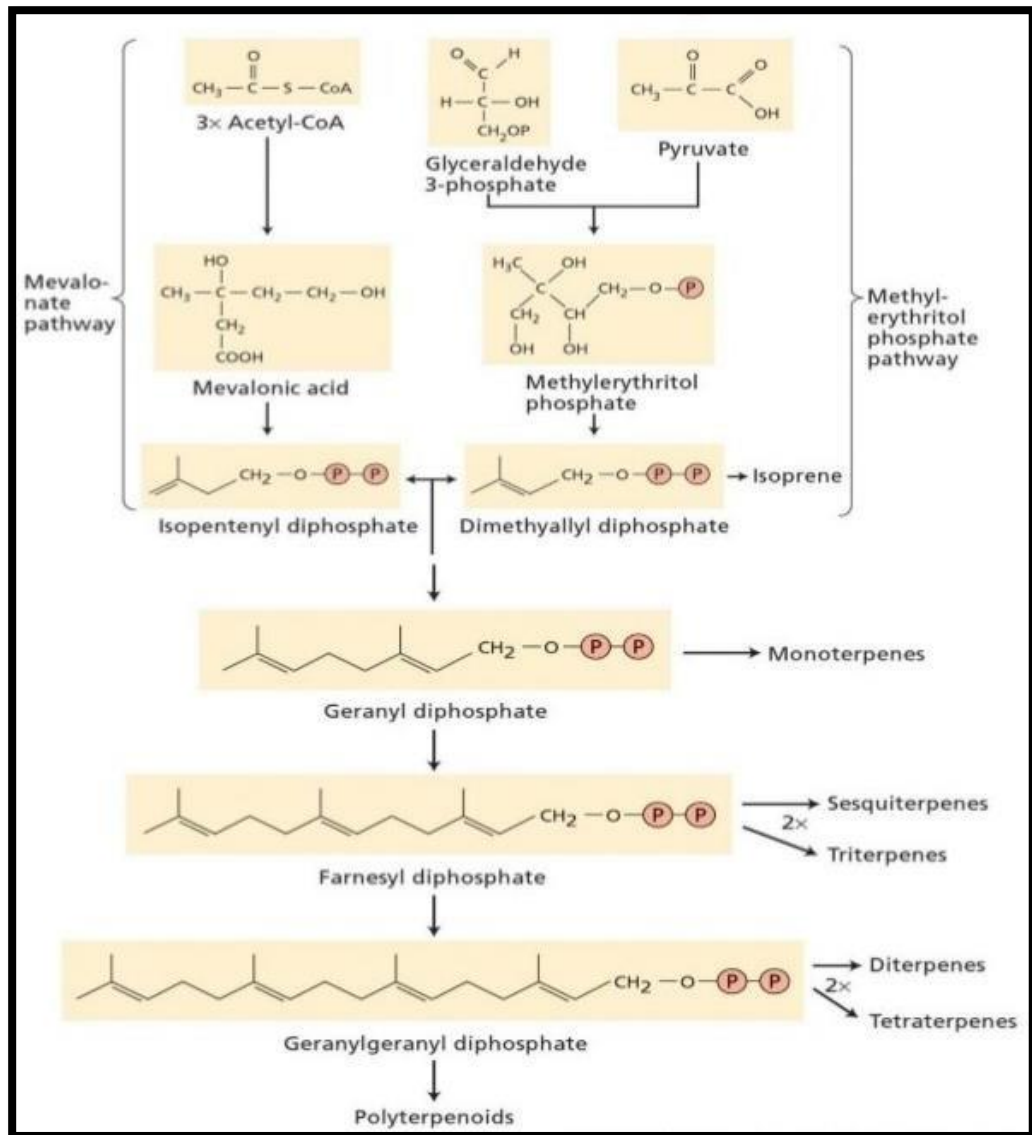
Figura 5 - Unidades isoprênicas, ligada na ordem m “cabeça-a-cauda”



Fonte: Felipe e Bicas (2017).

Os terpenos são sintetizados por duas rotas biossintéticas distintas: a primeira é a rota ácido mevalônico (AMV), e a segunda, a rota metileritritol fosfato (MEP). Na rota do (AMV), o ácido mevalônico é o intermediário chave, formado a partir de três moléculas de Acetil-Coa, é pirofosforilado, descarboxilado e desidratado, para formar o isopentil difosfato (IPP), que possivelmente é convertido em seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). Na segunda rota, do MEP, dois átomos de carbonosos derivados do piruvato se combinam com uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato, formando o intermediário DMAPP. Isopentil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) são as unidades básicas de C5 da biossíntese de terpenos. Estes reagem para formar o geranyl difosfato (GPP), o C10 precursor de quase todos monoterpenos (Figura 6). Adiante, GPP pode se unir com outra molécula de IPP para formar o precursor dos sesquiterpenos, o C15 farnesil difosfato (FPP) (DEWICK, 2009).

Figura 6 - Biossíntese dos Terpenos



Fonte: Biossíntese dos terpenos (2021).

Os compostos terpênicos tem despertado, cada vez mais, o interesse nas pesquisas por sua abundância na natureza, participação em resíduos agroindustriais e seu evidente potencial bioativo. Acrescente-se a disso, o estudo dos monoterpênicos são bastante evidenciados por esse grupo apresentar estruturas semelhantes, com possíveis características distintas. (SILVA et al., 2020). Dentre esses compostos destacam-se os isômeros (-) - α -pineno e (-) - β pineno.

3.4 ESTRUTURA QUÍMICA DO A E B-PINENO

Os monoterpênicos são encontrados de forma majoritária nos óleos essenciais, tendo estruturas terpênicas de menor massa molecular, com apenas duas unidades de isopreno ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}$) e com uma característica peculiar dessa classe, que é a volatilidade acentuada (KIM et

al., 2015). Tal característica, por sua vez, apresenta grande importância para o aroma dos produtos naturais, como frutas cítricas, ervas aromáticas, especiarias e condimentos, além de serem encontrados em perfumes finos, xampus e outros produtos de higiene e cosméticos (FARKAS; MOHÁCSI-FARKAS, 2014). Possuem isômeros constitucionais ativos α e β -pineno. Os dois, apresentam compostos amplamente encontrados na natureza (SILVA et al., 2012). Isômeros são compostos que possuem a mesma forma molecular, no entanto, possuem fórmula estrutural ou organização espacial diferente, enquanto um enantiômero desvia a luz polarizada para esquerda, e o outro, desvia para direita. A isomeria pode ser plana, dependendo da distribuição atômica, ou isomeria espacial, classificada pela distribuição dos átomos no espaço (SOLOMONS; FRYHLE, 2006).

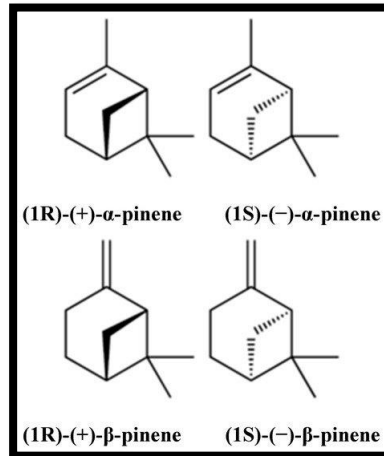
Os enantiômeros são moléculas que apresentam apenas um elemento de quiralidade. Centros quirais são evidenciados nos esteroisômeros, determinando sua atividade óptica a partir destes centros. Essa característica tem grande importância biológica devido à maioria dos receptores endógenos dos fármacos, como as proteínas ou enzimas. Também são compostos quirais (KIM et al., 2015). Este é encontrado na natureza com dois pares de isômeros não sobreponíveis, simétricos ao plano e desvios polarimétricos opostos, mas com a mesma propriedade física (SEKHON, 2013; SOLOMONS et al., 2014).

Outra forma encontrada na natureza é a mistura racêmica, caracterizada pela forma positiva e negativa juntas, sendo opticamente inativa (SILVA et al., 2012). A mistura racêmica destes compostos são bastante encontrados no óleo extraído do *Eucalyptus* (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

A singularidade que a direção da luz polarizada remete a cada substância é notória pelas suas distintas atividades e características terapêuticas. Um exemplo simples é o monoterpene limoneno, que, quando está na forma (+) limoneno, é responsável pelo odor das laranjas; na forma (-) limoneno, é responsável pelo odor dos limões (OLIVEIRA, 2011).

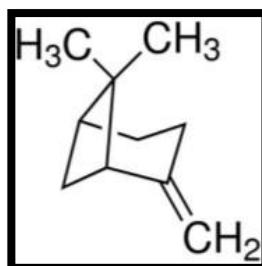
Os isômeros podem apresentar na nomenclatura (+) ou (-). Paster (1948), em seu estudo clássico, já afirmava que se baseava no desvio de luz polarizada. Quando a luz polarizada atravessa de forma linear e interage com uma amostra de enantiômero, ocorre uma “rotação óptica”. Nesse caso, gira-se o plano de luz polarizada para a direita e é denominado destro-rotatório (+), se, do contrário, gira para esquerda, e é denominado levo-rotatório (-) (ORLANDO et al., 2011).

O presente estudo avaliou de modo comparativo as duas substâncias em sua forma levo-rotatória para possíveis efeitos terapêuticos na redução da glicose, controle da dislipidemia e do processo inflamatório.

Figura 7 - Estrutura Química dos Enantiômeros α e β -pineno

Fonte: Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature (2019).

O β -pineno pertence ao grupo químico terpenoides, mais especificamente, à classe de monoterpenos. Seu nome químico é 6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptane (PORTE et al., 2014). Possuem enantiômeros conhecidos na natureza (+) - β -pineno e (-) - β -pineno. Sua presença é comum em óleos essenciais e outras substâncias químicas e pode ser encontrada, ainda, de forma isolada e comercializados, como sintética heptano (LETIZIA et al., 2003). É um líquido incolor e insolúvel em água. Possui aroma agradável amadeirado, como do pinheiro, largamente encontrado na natureza, e com várias propriedades farmacológicas. Por esse motivo, sua busca é constante na obtenção de fragâncias. Quimicamente, possui 10 carbonos e duas unidades isoprênicas ($C_{10}H_{16}$) e uma ligação dupla (SALEHI et al., 2019). É um monoterpene bicíclico (figura 8), que pode ser isolado dos óleos essenciais de várias plantas medicinais aromáticas (LETIZIA et al., 2003). Possuem propriedades biológicas descritas na literatura como miorelaxante, antimicrobiana, antidepressiva, antiespasmódica, anti-inflamatória, ansiolítica, anticonvulsivante e hipotensora (SILVA et al., 2012). Há relatos que podem atuar como hipoglicemiantes por terem uma atividade de regeneração das células β do pâncreas (MERCIER et al., 2009). O efeito antidiabético é demonstrado pela ação da fitoterapia de compostos isolados de plantas medicinais ricas em terpenos (TENG et al., 2018).

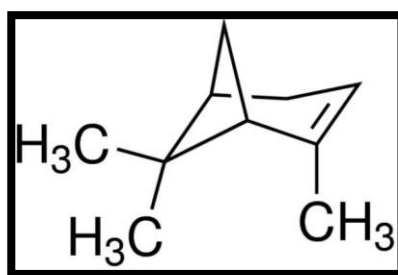
Figura 8 - Estrutura química do β -pineno.

Fonte: Sigma-Aldrich (2018).

O α -pineno também pertence ao grupo químico terpenoides, e é isômero do β -pineno, cujo nome químico é trimetil-2,6,6-biciclo [3.1.1] hept-2-eno (PORTE et al., 2014). É um líquido incolor, com gosto característico intenso, silvestre e de pinho, com aroma cítrico, picante e de alecrim (BURDOCK, 2010). É, também, o principal constituinte químico dos óleos essenciais de alecrim, olíbano, cipreste, baga de zimbro e helichrysum, encontrado até na laranja selvagem.

A presença do α -pineno já foi reportada em pelo menos 400 óleos essenciais e sua produção pode ser realizada pela extração dos óleos (BERGER, 2007). O α -pineno é um alceno que possui um anel de quatro carbonos bastante reativo. Existe na natureza sob a forma de dois enantiômeros: o (1S,5S)- α -pineno, ou (-)- α -pineno, presente nos pinheiros da Europa; e o (1R,5R)- α -pineno, ou (+)- α -pineno, presente nos pinheiros da América do Norte.

Figura 9 - Estrutura química do α -pineno.



Fonte: Sigma-Aldrich (2018).

3.5 RELAÇÃO DE ESTRUTURA E ATIVIDADE DOS ISÔMEROS CONSTITUCIONAISATIVOS (α E β -PINENO)

Compostos que possuem a mesma forma molecular com organização espacial distinta são denominados isômeros (SECA, 2015). O α e β -pineno são isômeros, pertencentes à classe dos terpenos e estão amplamente distribuídos na natureza (SILVA et al, 2012). Ambos apresentam massa molar de 136,24 g/mol e com 88,16% de carbono e 11,84% de hidrogênio, termicamente instáveis, inflamáveis e podem ser obtidos, por biossíntese, a partir do geranyl pirofosfato, um precursor dos terpenos (AZAMBUJA, 2009). Possuem enantiômeros conhecidos na natureza como (-) α -pinene (mais comum em pinheiros europeus), (+) α -pinene, (-) β -pineno e (+) β -pineno, além de serem encontrados também com ambas as formas (mistura racêmica) (YANG et al., 2011). Diferenças químicas sutis, como isomerismo óptico, apresentam grande influência nas propriedades farmacológicas de um determinado composto (BICAS, 2016). Os enantiômeros apresentam propriedades físicas idênticas, mas um comportamento

diferente em ambientes quirais e impacta diretamente na função biológica dos receptores endógenos dos fármacos, como, por exemplo, as proteínas e enzimas, que também são moléculas quirais.

Diversos fármacos possuem diferença em sua atividade biológica devido a sua estereoquímica, impactando em uma atividade biologicamente ativa ou inativa (GRIVENNIKOV et al., 2010). Ressalta-se, ainda, que a especificidade entre fármaco-receptor podem resultar na alteração da absorção, distribuição e eliminação (TECHIO; BELO, 2012).

3.6 AÇÃO FARMACOLÓGICA DOS ISÔMEROS α e β -PINENO NA REDUÇÃO DO DIABETES, DISLIPIDEMIA E INFLAMAÇÃO.

A procura por produtos de origem natural está cada vez mais intensificada. As plantas medicinais e suas substâncias químicas isoladas estão sendo estudadas com mais frequência, sendo utilizadas como possíveis alternativas no tratamento de diversas patologias. Nesse contexto, os óleos essenciais oriundos de material vegetal estão se destacando pelos seus diversos efeitos terapêuticos (analgésia, miorelaxante, anti-inflamatória e hipoglicemiante). Sua ação farmacológica é decorrente das diferentes substâncias químicas encontradas no material vegetal (SILVA et al., 2012). Os flavonoides e terpenos, por exemplo, têm a capacidade de manter o desempenho das células β e diminuir a hiperglicemia plasmática, além de diversas atividades biológicas que apresenta (KALEKAR et al., 2013).

Os isômeros α e β -pineno tem despertado grande interesse pela comunidade científica devido a suas ações farmacológicas promissoras no efeito anti-inflamatório, antitumoral e antimicrobiano (NAM et al., 2014). Além disso, são componentes de drogas renais e hepáticas e utilizados como antibacterianos, devido aos seus efeitos tóxicos nas membranas e antitumoral, em decorrência de seus efeitos inibitórios no câncer de mama e leucemia (ZHOU JY et al., 2004; SALEHI et al., 2019).

Podem ser facilmente encontrados nas coníferas como, por exemplo, *Eucalyptus* (Eucalipto), *Rosmarinus officinalis* (árvores de alecrim), além de *lavandula officinalis* (Lavanda). Também podem ser encontrados em sua forma isolada e comercializados de forma sintética (MIYAZAWA; YAMAFUJI, 2005; KIM et al., 2015; KHALIFAEV et al., 2017).

Extratos de plantas medicinais ricas em monoterpenos são utilizados na medicina popular para tratamento de problemas gástricos, como: *Zingiber roseum* Rosc, *Plectranthus barbatus* Andrews e *Ferula gummosa* Boiss (CÂMERA et al., 2003; PRAKASH et al., 2006). Além de serem utilizados de forma in natura ou preparações farmacêuticas para efeito calmante,

fungicida e antioxidante (LIMA et al., 2016).

Os óleos essenciais, ricos em monoterpenos, recentemente tem despertado ainda mais o interesse farmacêutico nas descobertas do seu efeito terapêutico no tratamento de dor neuropática e fibromialgia (PINA et al., 2017; SANTOS et al., 2021).

Rufino et al. (2014) estudou os isômeros α e β -pineno e percebeu que o enantiômero (+) - α -pineno demonstrou efeito anti-inflamatório e analgésicos e que o (-) - β -pineno mostra-se mais ativo na modulação da inflamação nos condrócitos.

Em virtude de estudos escassos com o enantiômero na forma (-) - α e β -pineno e evidências sobre a ação anti-inflamatória, hipoglicemiante e miorelaxante do grupo de pinenos, além da constatação de Rufino et al. (2014) sobre o efeito inativo do (+) - α e β -pineno em seus estudos. Busca-se, aqui, verificar e elucidar a ação antidiabética dos isômeros, sua participação na redução dos lipídios e seus efeitos na resposta inflamatória de ratos diabéticos.

4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

4.1 ARTIGO 1

Article 1. Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Anti-Inflammatory Effects of Beta-Pinene in Diabetic Rats.



Autores: Enaide Soares Santos, Geraldo Lucas Abrantes Coelho, Yan Kauê Saraiva Fontes Loula, Bárbara Lourenço Saraiva Landim, Cícera Norma Fernandes Lima, Sara Tavares de Sousa Machado, Maria Janice Pereira Lopes, Acléssia Damiana Soares Gomes, José Galberto Martins da Costa¹, Irwin Rose Alencar de Menezes, Henrique Douglas Melo Coutinho, Bonglee Kim, Cícero Francisco Bezerra Felipe, Samya de Araújo Neves e Marta Regina Kerntopf¹

Publicado na Revista Hindawi (Qualis B2 em Ciências Biológicas II)

Link: <https://doi.org/10.1155/2022/8173307>

Research Article

Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Anti-Inflammatory Effects of Beta-Pinene in Diabetic Rats

Enaide Soares Santos,¹ Geraldo Lucas Abrantes Coelho,² Yan Kauê Saraiva Fontes Loula,² Bárbara Lourenço Saraiva Landim,² Cícera Norma Fernandes Lima,¹ Sara Tavares de Sousa Machado,¹ Maria Janice Pereira Lopes,² Acléssia Damiana Soares Gomes,² José Galberto Martins da Costa,¹ Irwin Rose Alencar de Menezes,¹ Henrique Douglas Melo Coutinho ,¹ Bonglee Kim ,³ Cícero Francisco Bezerra Felipe,⁴ Samya de Araújo Neves,² and Marta Regina Kerntopf¹

¹Regional University of Cariri, URCA, Crato, Brazil

²Faculty of Medicine Estacio of Juazeiro do Norte, FMJ, Juazeiro do Norte, Brazil

³Department of Pathology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul 02447, Republic of Korea

⁴Federal University of Paraíba, UFPB, João Pessoa, Brazil

Correspondence should be addressed to Henrique Douglas Melo Coutinho; hdmcoutinho@gmail.com

Received 13 March 2022; Revised 11 April 2022; Accepted 25 April 2022; Published 17 May 2022

Academic Editor: Fernanda Tonelli

Copyright © 2022 Enaide Soares Santos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. Diabetes is a metabolic disease linked to multiple comorbidities, such as low-grade inflammation. β -pinene, a monoterpene commonly found in aromatic plants, is endowed with anti-inflammatory effect and this fact lead us to investigate the possible hypoglycemic, hypolipidemic and anti-inflammatory effects of the monoterpene in the alloxan-induced diabetes experimental model. **Methods.** Male Wistar rats (200–250 g) were treated orally with β -pinene (25, 50, 100, and 200 mg/kg) or glibenclamide (5 mg/kg), for seven consecutive days. Diabetes was induced by alloxan (40 mg/kg) through the penile vein. On the seventh day of treatment, blood samples were collected for biochemical analysis. The anti-inflammatory effect of β -pinene was evaluated using the carrageenan-induced paw edema model, followed by the carrageenan-induced peritonitis. **Results.** The treatment with β -pinene decreased plasma glucose, triglyceride, VLDL, LDL, and HDL levels, when compared to those of the control group. In addition, the association β -pinene 10 mg/kg + glibenclamide 2 mg/kg significantly decreased blood glucose, total cholesterol, and triglyceride level. Finally, oral treatment with β -pinene reduced carrageenan-induced paw edema and leukocyte migration in the peritoneum. Taken together, our results indicate that β -pinene shows hypoglycemic and hypolipemic effects, which may involve some common mechanisms of glibenclamide. Besides, the monoterpene presented an anti-inflammatory action in diabetic rats that needs further investigation in order to clarify such effect and its correlation with the alterations observed in plasma parameters of β -pinene-treated diabetic rats.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease that promotes plasma hyperglycemia, secondary to reduced insulin secretion and/or resistance to its peripheral action [1]. According to the World Health Organization (WHO) [2], the classification of DM falls into 3 clinical classes: type 1 DM (DM1), type 2 DM (DM2), gestational DM, and other

specific types of DM [3]. DM1 is characterized by the destruction of beta cells that eventually leads to the stage of absolute insulin deficiency. The destruction of beta cells is usually triggered by an autoimmune process, which can be detected by circulating autoantibodies, such as anti-glutamic acid decarboxylase (anti-GAD) and anti-islets and anti-insulin autoantibodies. Moreover, this type of DM is sometimes linked to other autoimmune diseases, such as

Hashimoto's thyroiditis, Addison's disease, and myasthenia gravis [4]. On the other hand, DM2 is characterized by a deficiency or failure in maintaining glucose homeostasis, resulting from defects in insulin secretion and action, associated with a sedentary lifestyle and poor dietary habits. A family history of DM is also a risk factor for microvascular complications, kidney insufficiency, blindness, and cardiovascular disease [1]. Gestational DM is another type of DM, diagnosed during pregnancy [5], which similarly to DM2, is associated with both insulin resistance and decreased pancreatic beta-cell function. Lastly, other specific types of DM constitute a 4th classification of DM that can be reported for a range of factors, including genetic defects in beta cell function and genetic defects in the insulin action as well as exocrine pancreas diseases, induced by drugs, chemical agents, or infections [3].

Currently, DM still remains a serious public health problem. It is associated worldwide with high rates of morbidity and mortality due to complications related to DM and dyslipidemia and to alterations that involve renal and hepatic oxidative damage and that worsen the clinical picture and increase mortality rates [6]. One way to avoid such complications is to maintain healthy lifestyle habits such as adequate nutrition, regular physical exercise, and new therapeutic alternatives that can control blood glucose [7].

The search for medicinal plants capable of treating diseases has awakened researchers and the pharmaceutical industry to invest more in new drugs endowed with relevant therapeutic action [8]. Indeed, the therapeutic action attributed to the presence of some biologically active molecules, such as flavonoids, alkaloids, terpenes, and tannins, can be proved through preclinical tests. For this reason, these substances have been the subject of incessant studies in multidisciplinary areas, with the aim of enriching the knowledge surrounding natural products as effective and safer sources of drugs derived from secondary metabolites [9].

Terpenes are substances derived from a plant's secondary metabolism and are classified based on the number of a five-carbon molecule, the isoprene unit, as follows: hemiterpenes (5C), monoterpenes (10C), sesquiterpenes (15C), diterpenes (20C), sesterterpenes (25C), triterpenes (30C), tetraterpenes (35C), and polyisoprenoids (>35 carbons). β -pinene is a cyclic monoterpene commonly found in essential oils from various aromatic medicinal plants [10] and presents important biological properties, such as myorelaxant, antimicrobial, antidepressant, antispasmodic, anti-inflammatory, anxiolytic, anticonvulsant, and hypotensive effects [11]. In addition, it has been reported that β -pinene may act as a hypoglycemic agent given its regenerating capacity in pancreatic beta cells [12]. Thus, in view of the reported β -pinene-mediated anti-inflammatory effects and the involvement of inflammation in DM, we sought to investigate the possible hypoglycemic, hypolipidemic, and anti-inflammatory effects of β -pinene in diabetic rats.

2. Methods

2.1. Drugs and Dose of Treatments. Beta-pinene (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), batch: MKBP3888V,

was sponsored by the Regional University of Cariri-URCA (Figure 1). In the present work, we tested doses of the terpene that corresponded to values lower than 4% of its LD₅₀ (LD₅₀ > 5000 mg/kg, according to the provider). Glibenclamide (5 mg/kg) was purchased from Biosynthetic Laboratory (São Paulo, SP, Brazil) and used as control. Alloxan (40 mg/kg) and Tween-80 (2% v/v) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other substances were donated by the Faculty of Medicine of Juazeiro do Norte.

2.2. Animals, Treatments, and Ethical Aspects. This study was carried out in the Laboratory of Biophysiology of the Faculty of Medicine of Juazeiro do Norte, and it was approved by the Faculty's Ethics Committee on the Use of Animals, under the process no. 2018.01.018. A total of 150 adult male Wistar rats (200 to 250 g) were donated from the vivarium of The Faculty of Medicine of Juazeiro do Norte. The animals were housed in groups of five, for at least 24 h prior to the experiments, in plastic boxes, receiving water and food ad libitum in a controlled environment with a 12 h light/dark cycle and regulated temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity (70%).

Alloxan (40 mg/kg, iv) was injected in male Wistar rats (250 g) and after 48 h, animals were subjected to blood collection for measurements of blood glucose (mg/dL). Only those showing glycemia levels higher than 250 mg/dL were submitted to the study. After this period, the animals were administered daily doses of 25, 50 and 100 mg/kg of β -pinene (BP) and glibenclamide (Glib 5 mg/kg) orally for 7 days. Untreated diabetic controls (DC) received vehicle. After this period, the animals underwent fasting and blood collection for biochemical analysis. At the end of the experiment, the animals were euthanized with sodium thiopental. A lethal dose of thiopental (150 mg/kg) and lidocaine (10 mg/mL) was used intraperitoneally [13].

2.3. Biochemical Analysis. Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min to obtain the serum, which was used to determine glucose, total cholesterol (TC), HDL, LDL, and triglycerides (TG) levels and AST and ALT activities by standard enzymatic colorimetric methods, according to the manufacturer's instructions (Labtest®, Brazil).

2.4. Drug Association Studies. To investigate the possible mechanism of action of β -pinene, rats were treated for seven consecutive days with vehicle or β -pinene (10 mg/kg) or glibenclamide (2 mg/kg) or the association of β -pinene (10 mg/kg) plus glibenclamide (2 mg/kg). On the last day (7th day), blood samples were collected to determine the blood glucose, cholesterol, and triglyceride levels.

2.5. Evaluation of the Anti-Inflammatory Effects of β -Pinene in Diabetic Rats. On the last day of treatment, 1 h after the drug's administration, an intraplantar injection of 40 μL /paw of a 1% w/v carrageenan solution was given to the right hind paw. Paw volumes were then measured at intervals of 1,

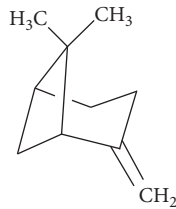


FIGURE 1: Chemical structure of β -pinene (Sigma-Aldrich, 2018).

2, 3, 4, and 24 h (standard times), for atypical progressive edema evaluation, which occurs in diabetic rats. The edema volume (EV) resulting from an acute inflammatory reaction was determined by the difference between the final (FV) and initial (IV) paw volumes [14].

2.6. Carrageenan-Induced Peritonitis. Diabetic rats were orally treated with vehicle, glibenclamide (5 mg/kg), dexamethasone (5 mg/kg), and β -pinene (50 mg/kg). After 60 min of treatment, each rodent received a 1% intraperitoneal injection of carrageenan. The fifth group consisted of healthy animals that did not receive any substance. After 4 h, a 3 mL volume of heparinized PBS was administered into the peritoneal cavity of the animals. Then, a gentle massage was performed in the abdominal region of the mouse and the peritoneal fluid was collected for a subsequent leukocyte count, which was performed by using the ABX Micros 60 device [15].

2.7. Statistical Analysis. The results that presented a normal distribution were represented as mean \pm standard error of the mean (SEM) and analyzed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test. The results were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Evaluation of Biochemical Parameters. Oral administration of β -pinene significantly decreased blood glucose, VLDL, HDL, and LDL levels (Table 1). On the other hand, no significant alterations were seen in the blood level of TC or in ALT and AST activities.

3.2. Drug Association Study: Evaluation of Acute Treatment Effects on Plasma Glycemic, Cholesterol, and Triglyceride Levels of Diabetic Rats. The association of glibenclamide (2 mg/kg) plus β -pinene (10 mg/kg), when administered for 7 days, significantly decreased the blood glucose level by 41.6% (215.9 ± 38.37 , $p < 0.0001$), when compared to the vehicle (365.1 ± 27.51). On the other hand, such effect was not observed in groups that were treated with β -pinene alone, at 10 mg/kg (323.3 ± 41.11) and glibenclamide alone, at 2 mg/kg (347.6 ± 48.5), when compared to the vehicle (Figure 2).

The drug combination also promoted a significant reduction in cholesterol and triglyceride levels by 16.1% (105.8 ± 4.3 , $p < 0.001$) and 29.1% (132.3 ± 34.96 , $p < 0.0001$),

respectively, when compared to the respective control groups (105.9 ± 2.7), and (338.1 ± 47.86) (Figures 3 and 4).

3.3. Acute Anti-Inflammatory Activity Evaluation in Rats with Alloxan-Induced Diabetes: Paw Edema. The seven day consecutive oral treatment with β -pinene (50 mg/kg) and glibenclamide (5 mg/kg) significantly reduced the edema at the 3rd h of evaluation, by 29.6% ($p < 0.001$) and 38.4% ($p < 0.001$), respectively, when compared to the diabetic group (91.66 ± 4.3). In addition, β -pinene at 50 significantly reduced the edema at the 4th h of evaluation by 36% ($p < 0.001$) and 26.8% ($p < 0.001$) when compared to the diabetic (80.8 ± 6.1) and normal control (25.3 ± 4.5) groups. Glibenclamide at 5 mg/kg also reduced paw edema by 68.6% ($p < 0.001$). After 24 h of edema induction, β -pinene at 50 reduced paw edema by 32.7% ($p < 0.001$) and 43.9% ($p < 0.001$), respectively, when compared to the diabetic (49.2 ± 5.3) and normal control (9.2 ± 1.3) groups. It should be noted that this time point (T24), represents the 7th and last day of experiments. During this period, the normal control group presented a regression in the animal's paw edema, returning to a volume similar to that observed during the 1st h of edema induction (Figure 5).

3.4. Carrageenan-Induced Peritonitis. According to Figure 6, β -pinene significantly reduced leukocyte migration. It reduced granulocytes by 50.1% compared to the control group (86.6 ± 1.57). Similarly, it significantly reduced monocyte migration by 44.4% and lymphocyte migration by 37.9% compared to the control group (6.12 ± 0.3) and (60.8 ± 3.1), respectively (Figures 7 and 8).

Dexamethasone used as the standard drug in the anti-inflammatory effect significantly reduced the migration of granulocytes, monocytes, and lymphocytes in 75.3%, 77.7%, and 96.7%, respectively, in relation to the vehicle-treated group. The oral hypoglycemic (Glib 5 mg/kg), also showed a significant reduction of leukocyte migration in 18.5% in granulocytes, 71.8% in monocytes, and 61.3% in lymphocytes in the control group.

4. Discussion

β -pinene is a monoterpene that is found in essential oils as the enantiomers (+)- β -pinene and (-)- β -pinene [12]. It is known that some terpenes have the ability to maintain β cell performance and to decrease plasma hyperglycemia, in addition to other biological effects [16]. Such effects are particularly useful for the management of DM, which is a complex disease, as it involves interactions between genetic and environmental factors [17, 18]. The worldwide concern with chronic diseases, and in particular with DM, has stimulated an intensive search on aspects associated with its pathophysiology, aiming to improve early detection, prevention, and even treatment of associated complications [6]. Alloxan is an animal model for the study of experimental diabetes in rats [19, 20] as well as potential antidiabetic drugs. According to Sociedade Portuguesa de Diabetologia [21], alloxan does not destroy all pancreatic β cells despite

TABLE 1: Evaluation of biochemical parameters in rat sera after oral (v.o.) treatment with β -pinene for 7 days.

Parameters	Vehicle	Glib (5 mg/kg, v.o.)	Beta-pinene (mg/kg, v.o.)		
	—		25	50	100
Glucose (mg/dL)	334.1 ± 27.23	77.57 ± 21 **** (76.7%)	393.9 ± 12.21	126.3 ± 18.62 **** (62.2%)	140.4 ± 27.25 **** (57.9%)
CT (mg/dL)	88.07 ± 8.791	65.88 ± 5.721 ***	78.82 ± 6.616	86.57 ± 5.694	82.17 ± 11.2
HDL (mg/dL)	182.6 ± 8.049	26.79 ± 6.284 **** (85.3%)	178.5 ± 18.68	64.57 ± 3.867 **** (64.6%)	46 ± 7.326 **** (74.8%)
LDL (mg/dL)	64.57 ± 3.867	12.93 ± 1.902 **** (79.9%)	58 ± 7.849	15.69 ± 2.948 **** (75.7%)	14.9 ± 2.241 **** (76.9%)
VLDL (mg/dL)	112.5 ± 17.31	14.72 ± 1.224 **** (86.9%)	85.82 ± 7.535 *** (23.7%)	15.92 ± 2.54 **** (85.8%)	17.08 ± 0.8871 **** (84.8%)
TG (mg/dL)	354 ± 22.88	65.88 ± 5.721 **** (81.3%)	422 ± 33.73	168.4 ± 26.02 **** (52.7%)	145.6 ± 23.96 **** (58.8%)
AST (UI/L)	88.68 ± 2.88	52.4 ± 6.54 *	67.08 ± 3.9	61.48 ± 4.39	61.6 ± 5.68
ALT (UI/L)	70.8 ± 5.01	38.6 ± 3.911 *	63.86 ± 4.17	52.7 ± 10.42	63.98 ± 11.18

Values represent mean ± standard error of the mean (S.E.P.M), ($n = 10$). The values were considered significant at ** $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$ vs. vehicle. Analyzed through two-way ANOVA and followed by Bonferroni ($n = 10$ mice per group).

causing DM2, it rather triggers a reduction in these cells. Thus, in the present study, we decided to use this method of inducing DM to test the hypoglycemic and hypolipidemic activities of β -pinene in rats.

Our results showed that β -pinene reduced glycemic levels in alloxan-induced diabetes in rats. Kahn et al. [22] report that some terpenes β -pinene and α -pinene have hypoglycemic effects in streptozotocin-treated mice. In addition, D'Adamo and Caprio [23] showed that two triterpenes led to a marked reduction in glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats. Salehi et al. [24] also showed that *Origanum vulgare* L. has hypoglycemic effects in streptozotocin-induced diabetic rats, possibly by the presence of α -pinene, a β -pinene isomer in the composition of the plant. Although the authors used a distinct diabetogenic agent, these findings contribute to the statement that chemical components present in plants are responsible for their pharmacological action. The data obtained from these authors also reinforces the fact that the isolated terpenic substances have similar effects on the glycemic level.

Menezes et al. [25] reported that species from the Fabaceae family contain several chemical substances in their composition, including α - and β -pinene, which caused a significant reduction in serum TG, TC, and high-density lipoprotein (HDL) levels in hyperglycemic rats treated with aqueous, ethanolic, and hexane leaf extracts from species belonging to this family. According to Menezes et al. [26], diabetes promotes changes in plasma lipid concentration. Hypertriglyceridemia is a common feature in patients with diabetes, as a result of both overproduction of VLDL by the liver, and diminished removal of triglyceride-rich lipoprotein, caused by reduced lipoprotein lipase (PLP) activity, the rate-limiting enzyme in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. Deficiencies in LPL play an important role in the pathophysiology of hyperlipidemia in diabetes [27] and the treatment with insulin increases PLP activity thus causing a fall in plasma triglycerides [28]. In the present study, alloxan

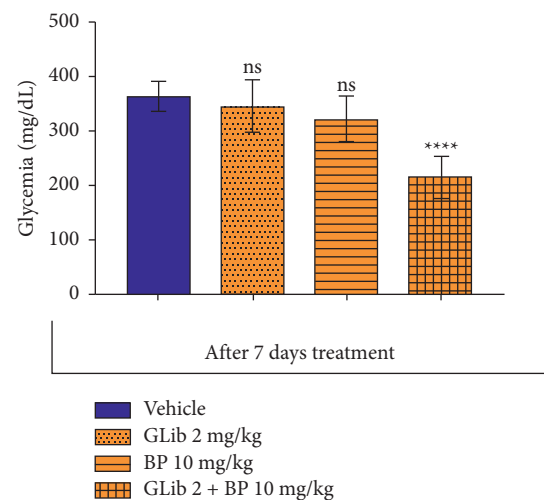


FIGURE 2: Effect of β -pinene plus glibenclamide 7-day oral treatment on the blood glucose level in diabetic rats. The columns represent the mean ± standard error of the mean (SEM), analyzed through two-way ANOVA and followed by Bonferroni ($n = 10$ mice per group). The values were considered significant at ** $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. vehicle.

administration caused an increase in serum triglycerides and VLDL levels and the treatment with β -pinene reduced such biochemical parameters (Table 1), with the latter effect possibly involving an increase in the activity of LPL on hepatic and adipose tissues. Lucchesian et al. [29] attribute the reduction in the blood lipid profile of animals treated with *Syzygium cumini* L., to the plant's chemical constituents, including triterpenes.

Changes in the metabolism of plasma lipoproteins in patients with diabetes mellitus are quite common [30]. Valdes et al. [31] report that the *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract has terpenic compounds, including β -pinene, which promoted a reduction of abdominal fat in mice by acting on

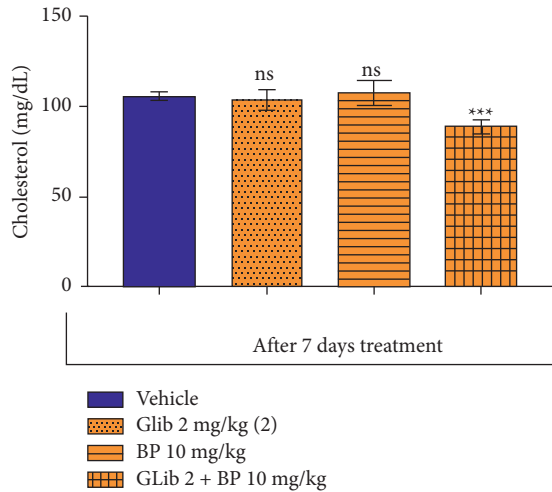


FIGURE 3: Effect of β -pinene plus glibenclamide 7-day oral treatment on the blood cholesterol level in diabetic rats. The columns represent the mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed through two-way ANOVA followed by Bonferroni ($n = 10$ mice per group). The values were considered significant at ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. vehicle.

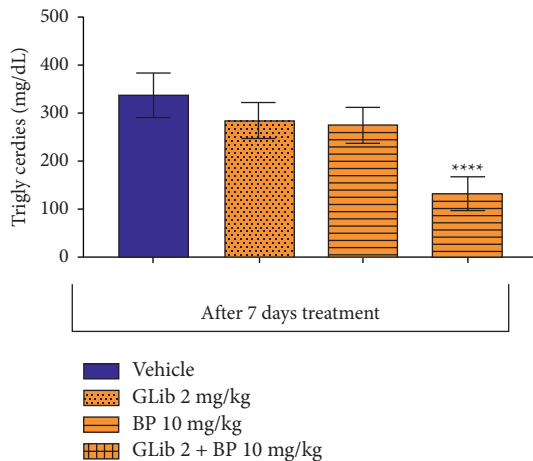


FIGURE 4: Effect of β -pinene plus glibenclamide 7-day oral treatment on the blood triglycerides level in diabetic rats. The columns represent the mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed through two-way ANOVA followed by Bonferroni ($n = 10$ mice per group). The values were considered significant when ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. vehicle.

a lipase, which breaks down fat, possibly due to the action of its chemical constituents, facilitating the reduction of total cholesterol levels. In our study, β -pinene showed no reduction in TC levels. As β -pinene presented some effects that resemble those of glibenclamide, we investigated whether the monoterpene shares the same mechanism of action as the sulfonylurea. Thus, lower doses of glibenclamide (2 mg/kg) and β -pinene (10 mg/kg) were tested alone and then in combination. The association of the two substances led to a reduction in glucose, cholesterol, and triglyceride levels in the blood of diabetic rats, while the use of both substances alone did not modify such biochemical parameters. Briefly, glibenclamide stimulates insulin secretion by blocking ATP-

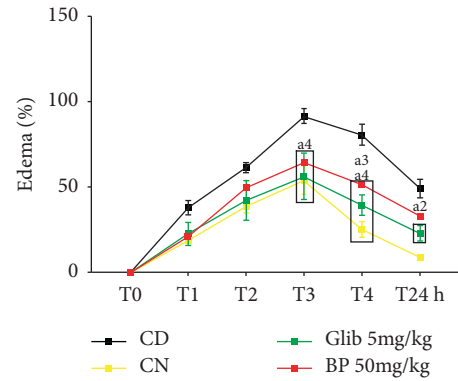


FIGURE 5: Effect of β -pinene on diabetic rats subjected to carrageenan-induced paw edema. Glib: glibenclamide; BP: β -pinene; CD: diabetic control; CN: normal control. The comparison of procedure value between diabetic groups and the normal group is considered significant at ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. CD.

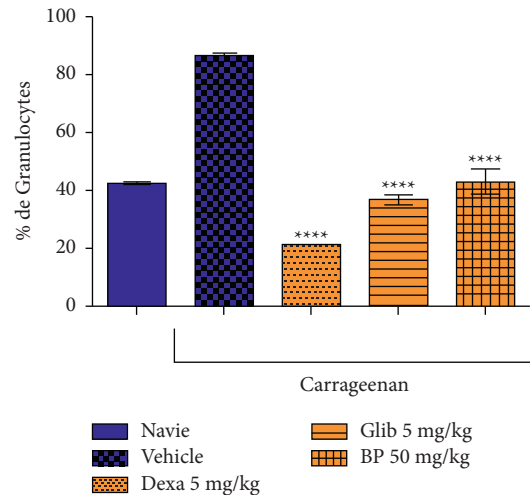


FIGURE 6: Effect of β -pinene on granulocyte migration in the carrageenan-induced peritonitis test. Columns represent the mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni ($n = 10$ rats per group). Values were considered significant when ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. vehicle.

dependent K^+ channels in pancreatic β cell membranes, causing depolarization and Ca^{2+} influx [32]. The results indicate that a possible synergism may be occurring between the two compounds and that the hypoglycemic action of β -pinene may present a mechanism like that of glibenclamide.

Based on the involvement of inflammation with diabetes and with strong evidence that β -pinene has anti-inflammatory effects, we investigated the anti-inflammatory effect of β -pinene in diabetic animals. Carrageenan is a sulfated polysaccharide obtained from some red algae species that promotes different inflammatory stimuli and recruits several inflammatory mediators to the injured site [33]. Briefly, carrageenan stimulates the release of vasoactive amines and promotes the latter release of cytokines (IL-1 and TNF- α)

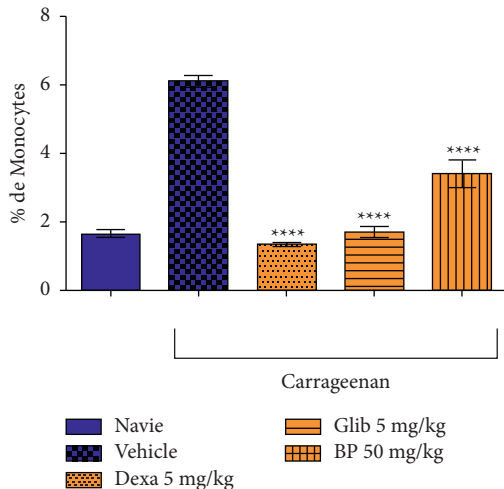


FIGURE 7: Effect of β -pinene on monocytes migration in the carrageenan-induced peritonitis test. Columns represent the mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni ($n = 10$ rats per group). Values were considered significant when ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. vehicle.

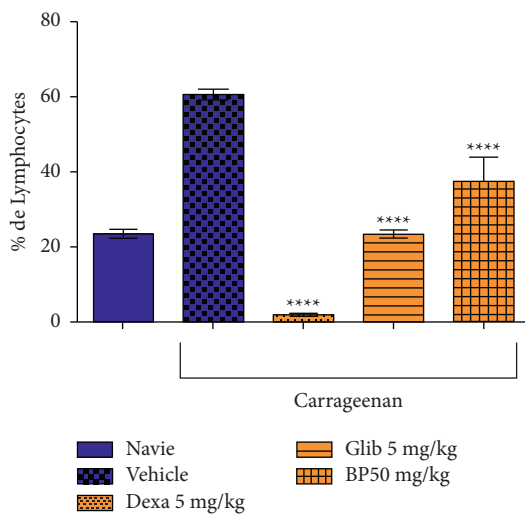


FIGURE 8: Effect of β -pinene on lymphocyte migration in the carrageenan-induced peritonitis test. Columns represent the mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni ($n = 10$ rats per group). Values were considered significant when ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. vehicle.

and prostaglandins PGE2 [24], followed by cell migration and plasma exudation [34]. This edema is proportional to the intensity of the inflammatory response and constitutes a useful parameter to determine the anti-inflammatory potential of a drug [35]. Carrageenan-induced paw edema was assessed in our study to evaluate the anti-inflammatory effect of β -pinene in diabetic rats. Our results showed that non-diabetic animal animals presented an edema elevation peak in the 3rd h of inflammation, which later regressed to baseline levels within 24 h. This can be explained through

studies by Wold [36] that show that inflammation reaches a peak in the first 3 h of edema induction, with this edema later decreasing to baseline levels when there are no new stimuli. However, diabetic rats have a different pattern from the normal ones.

As DM is a chronic disease, the entire inflammatory process has a longer time period. This is observed in the results presented in this study, in which untreated diabetic rats showed that edema lasted longer, until the 24th h of the experiment. On the other hand, β -pinene reduced edema volume by up to 29.6% in the 3rd h, when used at 50 mg/kg. Moreover, after 24 h, β -pinene also reduced edema by 32.7% at 50 mg/kg. Pioneering studies by Di Rosa [31] have previously shown that biogenic amines, responsible for vascular events, participate in the first phase of inflammation. In the 2nd phase, evidenced only after 3 h of induction, cytokines, prostaglandins, and NO participate in the inflammatory process, further increasing the inflammatory reaction. Thus, β -pinene may possibly act by inhibiting inflammatory mediators that participate in the 2nd phase of the process; however, more studies are necessary to test such a hypothesis.

Carrageenan-induced peritonitis is a model that involves cell migration and plasma exudation into the peritoneal cavity during an inflammatory process [37]. Neutrophils (polymorphonuclear), as well as macrophages, are the major phagocytic cells of the immune system. During the inflammatory process, the neutrophils are recruited to the inflammatory focus playing a defensive role to the organism. This model evaluates an acute inflammation, allowing quantification of leukocytes that migrate to the peritoneal cavity. This event is determined by the action of chemotactic mediators as cytokines (TNF- α , interleukin (IL)-1 β , and IL-6), nitric oxide, peptide fragments of the complement system (C3a, C4a, and C5a), histamine, leukotrienes, prostaglandins, thromboxane, and PAF52 [38].

De Carvalho et al. [39] indicated that the activity of phenolic compounds is involved in the inhibition of inflammatory mediators, as well as the study in question that presents these compounds and shows a possible reduction in the expression of these cells evidenced in the peritonitis model. Some authors have also shown that medicinal plants rich in diterpenes, sesquiterpenes, and monoterpenes have anti-inflammatory and hypoglycemic effects [40]. Moller [41] attributed the analgesic and anti-inflammatory effects of ginger to the presence of gingerol. Carvalho et al. [40] evaluated the anti-inflammatory effect of *Bumelia sartorum* Mart. The aqueous extract, which is rich in terpenes, used the carrageenan-induced paw edema method in diabetic rats and reported a significant reduction in edema. This finding is similar to those obtained in our study, as the authors used a substance belonging to the terpene class and analyzed its anti-inflammatory activity using the same method. Nonetheless, although the considerations reported in this experiment show that there is an increase in the inflammatory process in diabetic rats when compared to normal ones, these findings cannot elucidate the exact mechanism by which β -pinene reduces edema in this model and further studies in this field are needed.

5. Conclusions

The oral administration of β -pinene, for seven consecutive days, presented hypoglycemic and hypolipidemic effects, which seems to involve, at least in part, the blocking of ATP-dependent K^+ channels and the activation of LPL, respectively. The treatment with β -pinene also revealed an important anti-inflammatory effect, possibly by inhibiting inflammatory mediators that participate in the 2nd phase of the process, possibly by decreasing leukocyte migration, indicating that its action may be linked to the inhibition of cytokine production. It is important to stress that other studies are necessary to provide more information about the mechanisms underlying the hypoglycemic, hypolipidemic and anti-inflammatory effects of beta-pinene in diabetic rats.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available on request.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF2020R1I1A2066868) and the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korean government (MSIT) (no. 2020R1A5A2019413).

References

- [1] F. V. Garcia, L. B. Coutinho, and M. C. Oliveira, "Biochemical and Immunological interaction between diabetes mellitus and periodontal diseases in orthodontics," *Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia*, vol. 51, no. 1, pp. 75–88, 2021.
- [2] Organização Mundial da Saúde, "Rastreamento e diagnóstico do diabetes mellitus gestacional no Brasil," 2020, <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/pdf/diabetes-gestacional-relatorio.pdf>.
- [3] SBD, "Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes 2013-2014," 2020, <https://www.diabetes.org.br/images/pdf/diretrizes-sbd.pdf>.
- [4] Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, and Departamento de Atenção Básica, *Diabetes Mellitus*, Ministério da Saúde, Brasília, Brazil, 2013.
- [5] D. R. Coustan, "Gestational diabetes mellitus," *Clinical Chemistry*, vol. 59, no. 9, pp. 1310–1321, 2013.
- [6] N. P. G. Souza, G. Y. M. Oliveira, A. L. A. Girão, L. M. Souza, S. J. C. F. Maniva, and C. H. A. Freitas, "Conceptions of illness from hypertension and diabetes mellitus among a group of hospital inpatients," *Rev. Open Journal Systems*, vol. 23, 2015.
- [7] A. B. Silva, G. D. S. Lopes, T. V. B. Neves et al., "Extrato etanólico das folhas de *Raphanus sativus* L. var. oleifera Metzger (nabo forrageiro): efeitos antihiperlipidêmico, anti-dislipidêmico e antioxidante em ratos com Diabetes Mellitus tipo 1," *Revista Fitos*, vol. 13, no. 1, pp. 38–48, 2019.
- [8] C. J. S. Carvalho and I. O. Santos, "The use of phytotherapies in the treatment of rheumatic diseases and diabetes," *Revista.Pub Saude*, vol. 6, p. 157, 2021.
- [9] S. Gibbons, "Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents," *Phytochemistry Reviews*, vol. 4, no. 1, pp. 63–78, 2005.
- [10] M. D. Arbo, C. S. Passos, S. M. K. Rates, and G. L. Von Poser, "Terpenoids with activity in the central nervous system (CNS)," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 19, 2009.
- [11] J. O. Nogueira, "Ação antimicrobiana de diferentes terpenos e fenilpropanoides em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*," Master dissertation, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brazil, 2019.
- [12] A. C. R. D. Silva, P. M. Lopes, M. M. B. D. Azevedo, D. C. M. Costa, C. S. Alviano, and D. S. Alviano, "Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers," *Molecules*, vol. 17, no. 6, pp. 6305–6316, 2012.
- [13] Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, and Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, *Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica—DBCA*, Ministério da Ciência, Brasília, Brazil, 2013.
- [14] C. A. Winter, E. A. Risley, and G. W. Nuss, "Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 111, no. 3, pp. 544–547, 1962.
- [15] A. J. Lapa, C. Souccar, M. T. R. Lima-Landman, M. A. S. Castro, and T. C. M. De Lima, *Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Mediciniais*, 5th edition, 2008.
- [16] A. Coope, A. S. Torsoni, and L. A. Velloso, "Mechanisms in endocrinology metabolic and inflammatory pathways on the pathogenesis of type 2 diabetes," *European Journal of Endocrinology*, vol. 174, no. 5, pp. 175–187, 2016.
- [17] R. W. Nesto, "Impact of the atherosclerotic process in patients with diabetes," *Acta Diabetologica*, vol. 39, no. 0, pp. 22–28, 2002.
- [18] V. Paschoal, A. Naves, and A. B. Baptistella, *Nutrição Clínica Funcional: Dos Princípios a Prática*, Editora Metha, São Paulo, Brazil, 2nd edition, 2007.
- [19] R. A. De Fronzo, E. Ferrannini, and P. Zimmet, *Diabetes Mellitus*, Wiley-Blackwell, Hoboken, NY, USA, 4th edition, 2015.
- [20] Sociedade Portuguesa de Diabetologia, *Diabetes: Factos e Números—o Ano de 2015*, Sociedade Portuguesa de Diabetologia, Lisboa, Portugal, 2019.
- [21] S. E. Kahn, M. E. Cooper, and S. Del Prato, "Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future," *The Lancet*, vol. 383, no. 9922, pp. 1068–1083, 2014.
- [22] E. Kahn and S. Caprio, "Type 2 diabetes in youth: epidemiology and pathophysiology," *Diabetes Care*, vol. 34, pp. 161–165, 2011.
- [23] B. D'Adamo, S. Caprio, S. Upadhyay, and I. Erdogan Orhan, "Therapeutic potential of α - and β -pinene: a miracle gift of nature," *Biomolecules*, vol. 9, no. 11, p. 738, 2019.
- [24] S. A. Salehi, R. P. Munshi, and U. M. Thatte, "Do plants mediate their anti-diabetic effects through anti-oxidant and anti-apoptotic actions? an in vitro assay of 3 Indian medicinal plants," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 13, no. 1, p. 257, 2013.
- [25] C. D. A. Menezes, F. A. de Oliveira Garcia, G. S. de Barros Viana et al., "*Murraya paniculata* (L.) (orange jasmine): potential nutraceuticals with ameliorative effect in

- alloxan-induced diabetic rats,” *Phytotherapy Research*, vol. 31, no. 11, pp. 1747–1756, 2017.
- [26] S. Menezes, R. D. Banjarnahor, P. Darsini, S. Ilyas, and E. Sabri, “The effect of *Saurauia vulcani* Korth. leaves extract on penile corpus cavernosa microstructure and the quality of sperm in alloxan-induced diabetic mice,” *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 1116, Article ID 052030, 2018.
- [27] R. J. Gomes, J. A. C. A. Leme, M. A. R. Mello, E. Luciano, and F. H. Caetano, “Efeitos de treinamento de natação em aspectos metabólicos e morfológicos de ratos diabéticos,” *Motriz*, vol. 14, pp. 320–328, 2008.
- [28] F. N. T. Lucchesian, N. T. D. Freitas, L. L. Cassettari, S. F. G. Marques, S. T. Spadella, and C. T. Spadella, “Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease,” *Acta Cirurgica Brasileira*, vol. 28, no. 7, pp. 502–508, 2013.
- [29] S. N. I. Lucchesian, “Agentes hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino,” in *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 1848, 1st edition, Mcgraw-hill Interamericana do Brasil, Rio de Janeiro, Brazil, 2006.
- [30] M. Valdes, F. Calzada, and J. Mendieta-Wejebe, “Structure–activity relationship study of acyclic terpenes in blood glucose levels: potential α -glucosidase and sodium glucose cotransporter (SGLT-1) inhibitors,” *Molecules*, vol. 24, no. 22, p. 4020, 2019.
- [31] M. Valdes, J. P. Giroud, and D. A. Willoughby, “Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine,” *The Journal of Pathology*, vol. 104, no. 1, pp. 15–29, 1971.
- [32] A. Mandal, V. Das, P. Ghosh, and S. Ghosh, “Anti-diabetic effect of friedelan triterpenoids in streptozotocin induced diabetic rat,” *Natural Product Communications*, vol. 10, pp. 1683–1686, Article ID 1934578X1501001, 2015.
- [33] D. P. Coqueiro, P. C. S. Bueno, E. L. Guiguer et al., “Efeitos do chá de orégano (*Origanum vulgare*) no perfil bioquímico de ratos Wistar,” *Scientia Medica*, vol. 22, pp. 191–196, 2012.
- [34] H. Lee, M. Woo, M. Kim, J. S. Noh, and Y. O. Song, “Antioxidative and cholesterol-lowering effects of lemon essential oil in hypercholesterolemia-induced rabbits,” *Preventive Nutrition and Food Science*, vol. 23, no. 1, pp. 8–14, 2018.
- [35] C. D. S. Lino, J. P. L. Diógenes, B. A. Pereira et al., “Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats,” *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 27, no. 1, pp. 125–127, 2004.
- [36] L. E. Wold, I. A. F. Ceylan, and J. Ren, “Oxidative stress and stress signaling: menace of diabetic cardiomyopathy,” *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 26, no. 8, pp. 908–917, 2005.
- [37] S. Merzouk, A. Hichami, A. Sari, S. Madani, S. N. Habane, and N. A. Khan, “Impaired oxidant/antioxidant status and LDL-fatty acid composition are associated with increased susceptibility to peroxidation of LDL in diabetic patients,” *General Physiology and Biophysics*, vol. 23, pp. 387–399, 2004.
- [38] J. P. Gilligan, S. J. Lovato, M. D. Erion, and A. Y. Jeng, “Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P,” *Inflammation*, vol. 18, no. 3, pp. 285–292, 1994.
- [39] M. G. De Carvalho, L. F. De Oliveira Cândido, P. M. Da Costa, and V. M. Rumjanek, “Chromones from *licania arianeae* (chrysobalanaceae),” *Natural Product Research*, vol. 19, no. 1, pp. 7–12, 2005.
- [40] K. A. Carvalho, O. Berge, and F. P. T. Hamers, “Using the catwalk method to assess weight bearing and pain behavior in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: effects of morphine and refecoxib,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 174, 2008.
- [41] M. D. Moller, J. C. Vilar, R. H. V. Mourão, A. R. Antonioli, and R. E. D. Souza, “Avaliação da atividade anti-edematogênica e antinociceptiva do extrato aquoso de *Bumelia sartorum* mart,” *Biologia Geral e Experimental*, vol. 1, pp. 36–41, 2000.

4.2 ARTIGO 2

Article 2. Manuscrito submetido:

Revista Life Sciences

Hypoglycemic, hypolipidemic and anti-inflammatory potential of α -pinene in diabetic rats.

Enaide Soares Santos¹, Sara Tavares de Sousa Machado¹, Francisco Beethoven Rodrigues², Yasmim Almeida da Silva², Luiz Carlos Xavier Matias², Maria Janice Pereira Lopes², Acléssia Damiana Soares Gomes², Tiago Feitosa Ribeiro², Francisca Adilfa de Oliveira Garcia⁵, Henrique Douglas Melo Coutinho^{1, *}, Bonglee Kim⁴, Cícero Francisco Bezerra Felipe³, Samya de Araújo Neves² and Marta Regina Kerntopf¹

¹Regional University of Cariri, URCA, Crato, Brazil; enaide.santos1234@gmail.com (E.S.S.); norminhaf@yahoo.com.br (C.N.F.L.); saratavares17@hotmail.com (S.T.S.M.); hdmcoutinho@gmail.com (H.D.M.C.); martaluiz@yahoo.com.br (M.R.K.)

²Faculty of Medicine Estacio of Juazeiro do Norte, FMJ, Juazeiro do Norte, Brazil; rodrigues50601@gmail.com(F.B.R.);yasmimalmeida1717@gmail.com(Y.A.S.);luizmancha000@gmail.com(L.C.X.M.);jannicelopes@hotmail.com(M.J.P.L.);samya_neves@hotmail.com (S.A.N.); aclessiasoares@gmail.com; tiagofeitosaribeiro@gmail.com (T.F.R.)

³Federal University of Paraíba, UFPB, João Pessoa, Brazil; cicero@dbm.ufpb.br (C.F.B.F.)

⁴Department of Pathology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea. bongleekim@khu.ac.kr (B.K.)

⁵The University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canada.

Correspondence: hdmcoutinho@gmail.com

Abstract: *Diabetes mellitus* (DM) is a chronic disease characterized by high levels of glucose in the blood, resulting from a relative or absolute deficiency in the action of insulin. It is now clear that a state of chronic low- level inflammation is closely associated with the pathophysiology of DM, which may contribute to the long-termeffects of the disease. Some monoterpenes, compounds present in oils from various aromatic plants, such as β - pinene, have antidiabetic and anti-inflammatory activities. Thus, the present work aimed to evaluate the hypoglycemic, hypolipidemic, and anti-inflammatory effects of α -pinene, an isomer of β -pinene in diabetic rats. Methods: Male Wistar rats (200-250 g) received a single injection of alloxan (40 mg/Kg) through the penile vein to induce diabetes. Diabetic animals were orally treated with vehicle or α - pinene (25, 50, 100 mg/Kg) or glibenclamide (5 mg/Kg), during seven consecutive days. In the last day of treatment, blood samples were collected for biochemical analysis and the anti-inflammatory effect of α -pinene was evaluated using the carrageenan- induced paw edema and carrageenan-induced peritonitis models. Results: The treatment with the monoterpene decreased blood glucose, cholesterol, triglyceride, VLDL, LDL, HDL, AST and ALT levels, when compared to the vehicle group. Likewise the association α -pinene + glibenclamide also decreased blood glucose, totalcholesterol and triglyceride levels. Finally, the oral treatment with the compound reduced de paw edema and leukocyte migration in the peritoneum of rats subjected to different models of inflammation. The α -pinene showedan important hypoglycemic and hypolipemic effect, reducing the biochemical parameters at doses 25, 50 and 100 mg/Kg. Moreover, this monoterpene showed an important anti-inflammatory effect contributed to an improvement in the general condition of the rats, significantly reducing the edema in the paw of diabetic animals at the dose of 50 mg/Kg. In addition to participating in the chemotaxis of immune cells to the site of inflammationand playing a role in reducing the inflammatory process. However, it is necessary new pre-clinical tests to elucidate more clearly the mechanism of action by which the substance is performing its activity.

Keywords: Diabetes; Aloxan; Hyperglycemia; Dyslipidemia; Inflammation; α -pinene.

1. Introduction

It is known that in healthy individuals insulin acts through a receptor located on the surface of adipocytes, hepatocytes, and myocytes and stimulates the initiation of an intracellular signaling cascade mediated by the insulin receptor substrate (IRS), which activates the IRS-AKT-GLUT pathway with consequent mobilization of glucose transport proteins (GLUT-2 and 4) for the incorporation of this molecule into the cell^[1] and consequent reduction of blood glucose.

Diabetes mellitus (DM), on the other hand, is a chronic disease characterized by high blood glucose levels, resulting from a partial or absolute deficiency in insulin action. In 2017, around 425 million people worldwide were diagnosed with DM and estimates are that this number will rise to 629 million by 2045^[2], making it one of the most lethal diseases of humanity, along with cancer, cardiovascular and cerebrovascular disease^[3].

Low-grade inflammation has recently been associated with the risk of developing insulin resistance and is linked to the features of metabolic syndrome, directly impacting hyperglycemia^[4]. During the inflammatory state, tissues undergo infiltration by TNF-producing macrophages. In the presence of this cytokine, activation of the IRS-AKT-GLUT signaling pathway is inhibited, which leads to a state of hyperglycemia and soon after to a compensatory state of hyperinsulinemia, followed by pancreatic cell apoptosis, reduced insulin levels, and maintenance of the confirmatory state of diabetes^{[5],[4]}.

Before the discovery of antidiabetic drugs and insulin, diabetic patients resorted to traditional medicine, especially the use of plant species^[6], for the treatment of DM. According to [7], there are about 600 plants with antidiabetic properties. Interest in the use of plants has grown, it is estimated that more than 50% of currently available drugs are originated from molecules present in medicinal plants^[8].

Medicinal plants contribute to the supply of secondary metabolites that aid in the treatment of various diseases. These compounds are divided into three chemically distinct groups, namely, alkaloids, phenolic compounds, and terpenes^[9]. It is known that the latter class of compounds seems to be endowed with hypoglycemic potential^[10], which makes them a promising source for the development of antidiabetic agents with minimal side effects^[11]. Pinenes are monoterpenes that have two active constitutional isomers: α - and β -pinene. A recent study developed by our group showed that α -pinene exhibited hypoglycemic, hypolipemic, and anti-inflammatory effects in rats subjected to the alloxan-induced diabetes model^[12]. α -pinene is commonly found in oils of various aromatic plants^[9] and exhibits antiviral, antimicrobial^[10],

and anti-inflammatory effects ^[13]. In this context, the present work aimed to evaluate the hypoglycemic, hypolipidemic, and anti-inflammatory effects of α -pinene isomer in diabetic rats.

2 Methods

2.1 Drugs and reagents

The α -pinene (Figure 1), alloxane and tween-80 were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and glibenclamide was purchased from Biosynthetic Laboratory (São Paulo, SP). All other reagents used were of analytical purity.

According to the provider, α -pinene presents a median lethal dose greater than 5,000 mg/Kg, v.o. Based on this information, the present work used doses less than 4% of the compound's LD₅₀ (25, 50, 100 mg/kg), which was emulsified in distilled water with tween-80 (2% v/v) and administered orally.

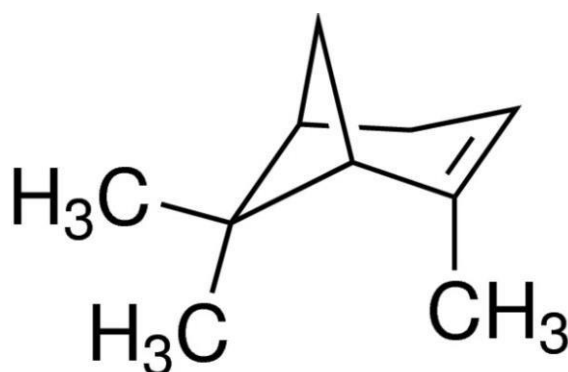


Figure 1. Chemical structure of α -pinene (Sigma-Aldrich, 2018)

2.2 Animals and ethical aspects

Male *Wistar* rats weighing 200-250 g were housed in polypropylene cages with a maximum of six animals. Food and water were available ad libitum and animals were maintained in a constant environment; ambient temperature of $24 \pm 2^\circ\text{C}$, circulating air, constant humidity of $50 \pm 10\%$ and alternating light/dark cycles of twelve hours. The research project was previously submitted to the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Estácio de Juazeiro do Norte Medical School, and approved under protocol number 2018.01.018.

2.3 Experimental protocol

2.3.1 Evaluation of the effect of α -pinene on biochemical parameters of diabetic rats

2.3.1.1 Induction of diabetes

Alloxan (40 mg/Kg, i.v) was injected in male Wistar rats (250 g) and after 48 h, animals were subjected to blood collection for measurements of blood glucose (mg/dL). Only the rats that presented blood glucose higher than 250 mg/dL were selected for the study. The diabetic animals were randomly distributed into five groups (n = 10) and treated for seven consecutive days with vehicle (1 mL/100 g, v.o) or α -pinene (AP 25, 50 and 100 mg/kg, v.o) or glibenclamide (GLI 5 mg/Kg, v.o). After 7 days, the animals underwent a 12-hour fast and subsequent blood collection. At the end of the experiments, the rodents were euthanized with an association of thiopental (150 mg/Kg, i.p.) and lidocaine (10 mg/mL, i.p.) [14].

2.3.1.2 Potentiation study

To investigate the possible mechanism of action of α -pinene, diabetic animals were randomly distributed into four groups (n=10) and treated for seven consecutive days with vehicle (1 mL/100 g, v.o.) or α -pinene (AP 10 mg/Kg, v.o.) or glibenclamide (GLI 2 mg/kg, v.o.) or the association α -pinene (AP 10 mg/Kg, v.o.) + glibenclamide (GLI 2 mg/Kg, v.o.). After 7 days, the animals were subjected to a 12-h fasting and subsequent blood collection. At the end of the experiments, they were euthanized with an association of thiopental (150 mg/Kg, i.p.) and lidocaine (10 mg/mL, i.p.) [15].

2.3.1.3 Laboratory Analysis

Blood samples were centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes to obtain serum, which was used to evaluate the following biochemical parameters: glucose, total cholesterol (TC), HDL, LDL, triglycerides (TG), AST and ALT. All tests used colorimetric methods, according to the manufacturer's instructions (Labtest®, Brazil).

2.3.2. Evaluation of the anti-inflammatory effect of α -pinene in diabetic rats

Diabetic animals were randomly assigned into three groups (n=10) and treated for seven consecutive days with vehicle (1 mL/100g, v.o.) or glibenclamide (GLI 5 mg/Kg, v.o.) or dexamethasone (DEX 5 mg/Kg, v.o.) or α -pinene (AP 50 mg/Kg, v.o.) for seven consecutive days. On the last day of treatment, 1 h after drug administration, each animal received an

intraperitoneal injection of 1% carrageenan. A naive group, composed of non-diabetic animals, was used as control and received only vehicle (1 mL/100 g, v.o). The treated animals were then subjected to the models described below.

2.3.2.1. Carrageenin-induced paw edema model

On the last day of treatment, 1 h after drug administration, acute inflammation was induced in the right hind paw of rats by subplantar injection of 40 μ L (1% carrageenan solution). The paw volume was then measured at 1, 2, 3, 4 and 24 h plethysmometrically after the carrageenan injection, for atypical assessment of progressive edema, which occurs in diabetic rats. The edema volume (EV) resulting from an acute inflammatory reaction was determined by the difference between the final (FV) and initial (IV) paw volumes ^[16].

2.3.2.2. carrageenan-induced peritonitis model

On the last day of treatment, 1 h after drug administration, each animal received an intraperitoneal injection of 1% carrageenan. After 4 h, 3 mL of heparinized PBS was administered into the peritoneal cavity of the animals, followed by a gentle massage in the abdominal region of the mouse to collect the peritoneal fluid, which was used for leukocyte count by ABX Micros 60 device ^[15].

2.4 Statistical analysis

The results were initially evaluated for normality. Data that showed normal distribution were represented as mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's test. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Evaluation of the effect of α -pinene on biochemical parameters of diabetic rats

Table 1 shows that oral treatment with α -pinene (100 mg/Kg) for seven consecutive days significantly and dose-dependently reduced the concentration/activity of all biochemical markers evaluated compared to the vehicle group. The other doses of the compound, however,

significantly reduced compared to vehicle only some of the parameters evaluated: ~~namely:~~ glucose, triglycerides, HDL, LDL, and VLDL.

Table 1: Evaluation of biochemical parameters in diabetic rats after α -pinene seven-days treatment.

Parâmetros	VH	GLI (mg/kg, v.o.)	AP (mg/Kg, v.o.)		
	(1 mL v.o)	5	25	50	100
Glucose(mg/dL)	375.9 \pm 22.5 ---	99,65 \pm 2,1 **** (73,9%)	249,4 \pm 7,3 **** (33,6%)	115,8 \pm 9,7 **** (69,1%)	108,2 \pm 8,4 **** (71,2%)
CT (mg/dL)	113,1 \pm 11,2 ---	82,38 \pm 2,4 ** (27,2%)	98,28 \pm 3,9 ---	94,05 \pm 3,27 ---	83,5 \pm 4,7 * (26,2%)
HDL (mg/dL)	182,6 \pm 3,04 ---	39,64 \pm 2,06 **** (78,2%)	105,6 \pm 4,6 **** (42,1%)	83,36 \pm 3,7 **** (54,3%)	81,5 \pm 1,9 **** (55,3%)
LDL (mg/dL)	64,57 \pm 3,867 ---	12,93 \pm 1,902 **** (79,9%)	29,8 \pm 4,4 **** (53,8%)	8,7 \pm 0,65 **** (86,5%)	5,7 \pm 0,68 **** (91,1%)
VLDL (mg/dL)	119,3 \pm 2,4 ---	14,7 \pm 1,2 **** (87,6%)	45,8 \pm 3,1 **** (61,6%)	33,08 \pm 2,5 **** (72,2%)	11,12 \pm 0,69 **** (90,6%)
TG (mg/dL)	298,3 \pm 17,4 ---	144,7 \pm 7,4 *** (51,4%)	219,8 \pm 10,29 * (26,3%)	160,1 \pm 12,15 ** (46,3%)	127,9 \pm 5,2 ** (57,1%)
AST (UI/L)	134,1 \pm 5,8 ---	109,7 \pm 5,1 * (18,1%)	125,7 \pm 4,3 ---	117,4 \pm 8,1 ---	41,67 \pm 2,8 **** (68,9%)
ALT (UI/L)	141,3 \pm 16,1 ---	109,7 \pm 5,1 *** (21,8%)	125,7 \pm 4,3 ---	124,5 \pm 7,05 ---	41,6 \pm 2,8 **** (70,3%)

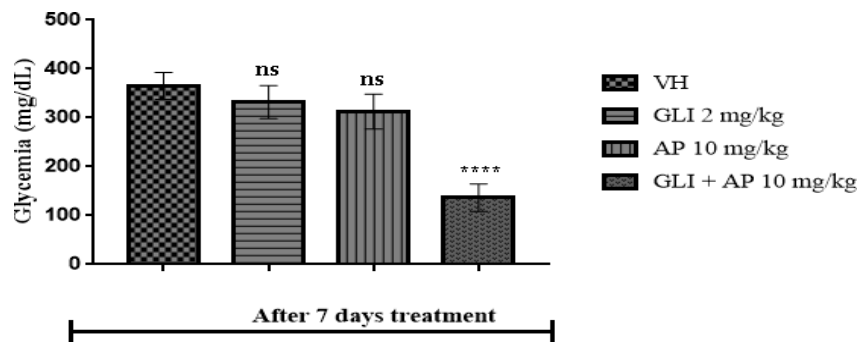
Values represent mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed through two-way ANOVA and followed by Bonferroni (n = 10). The values were considered significant at **p<0.01; *** = p < 0.001, **** = p < 0.0001 vs VH. VH = vehicle; GLI = glibenclamida; AP = α -pinene.

In order to identify the possible mechanism of action of the monoterpene, a potentiation test was performed using low doses of glibenclamida (2 mg/Kg, v.o.) and α -pinene (10 mg/Kg, v.o.), alone or in association, for seven consecutive days.

According to figure 3 it can be observed that the administration of glibenclamida (2 mg/Kg, v.o.) and α -pinene (10 mg/Kg, v.o.) individually did not significantly alter plasma glucose concentration (332.1 \pm 15.17 mg/dL and 312.8 \pm 33.92 mg/dL, respectively) compared to the vehicle group (365.1 \pm 27.51 mg/dL). On the other hand, the association of the two

compounds significantly reduced plasma glucose concentration (136.7 ± 12.56 mg/dL, $p < 0.0001$) by 62.5 % compared to the vehicle group.

Figure 3. Effect of



Glibenclamide plus α -pinene oral seven-day treatment on blood glucose in diabetic rats. The columns represent the mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed through two-way ANOVA and followed by Bonferroni ($n = 10$). The values were considered significant at $**p < 0.01$; $*** = p < 0.001$, $**** = p < 0.0001$ vs VH. VH = vehicle; GLI = glibenclamide; AP = α -pinene.

A similar effect can be observed in Figure 4, where the administration of glibenclamide (2 mg/Kg, v.o.) and α -pinene (10 mg/Kg, v.o.) individually ~~alone~~ did not significantly alter the plasma concentration of total cholesterol (199.9 ± 5.5 mg/dL and 194.2 ± 3.5 mg/dL, respectively) compared to the vehicle group (208.7 ± 5.5 mg/dL). On the other hand, the association of the two compounds significantly reduced the plasma concentration of total cholesterol (82.96 ± 2.5 mg/dL, $p < 0.0001$) by 60.2% compared to the vehicle group.

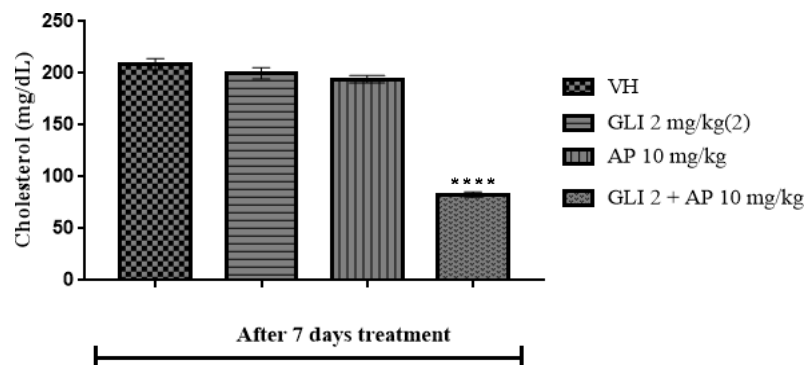


Figure 4. Effect of glibenclamide plus α -pinene (oral) seven-day treatment on blood cholesterol in diabetic rats. The columns represent the mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed through two-way ANOVA followed by Bonferroni ($n = 10$). The values were considered significant at $**p < 0.01$; $*** = p < 0.001$, $**** = p < 0.0001$ vs VH. VH = vehicle; GLI = glibenclamide; AP = α -pinene.

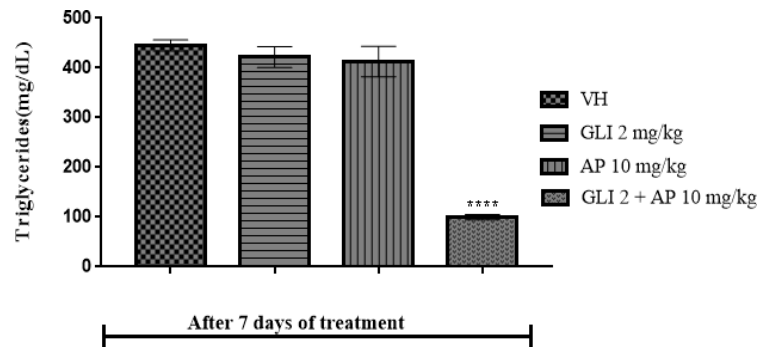


Figure 5. effect of glibenclamide plus α -pinene (oral) seven-day treatment on blood triglycerides level in diabetic rats. the columns represent the mean \pm standard error of the mean (sem), analyzed through two-way anova followed by bonferroni (n = 10). the values were considered significant at ** $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$ vh. vh = vehicle; gli = glibenclamide; ap = α -pinene.

Again, a similar effect to those described previously can be seen in Figure 5, where administration of glibenclamide (2 mg/Kg, v.o.) and α -pinene (10 mg/Kg, v.o.) alone did not significantly change plasma triglyceride concentration (421.6 ± 9.4 mg/dL and 413.1 ± 12.5 mg/dL, respectively) in relation to the vehicle group (445.3 ± 4.5 mg/dL). On the other hand, the association of the two compounds significantly reduced plasma triglyceride concentration (100.1 ± 5.2 mg/dL, $p < 0.0001$) by 77.5% compared to the vehicle group.

3.2. Evaluation of the Anti-inflammatory Effects of α -pinene in Diabetic Rats

Figure 6 shows the effect of α -pinene on the volume of carrageenan-induced paw edema in diabetic rats. According to the graph, a significant increase in paw edema can be observed in the animals treated with vehicle at times T1 (49.7 ± 7.1), T2 (70.7 ± 6.1), T3 (98.1 ± 4.6), T4 (80.8 ± 6.1) AND T24 (49.2 ± 5.3), by 61.9%, 64.7%, 66%, 68% and 67.8%, respectively, compared to the naive group (T1 18.9 ± 2.7 ; T2 24.9 ± 3.7 ; T3 32.4 ± 3.2 ; T4 25.3 ± 4.5 AND T24 15.8 ± 3.9). On the other hand, treatment with α -pinene (50 mg/Kg) and glibenclamide (5 mg/Kg) significantly reduced edema at the 3rd h of evaluation by 31.8% (66.8 ± 3.4 , $p < 0.0001$) and 40.8% (58.8 ± 2.5 , $p < 0.0001$), respectively, when compared to vehicle (98.12 ± 4.6). Furthermore, α -pinene (50 mg/Kg) and glibenclamide (5 mg/Kg) significantly reduced edema at the 4th h of evaluation by 61.2% (31.3 ± 5.1 , $p < 0.0001$) and 51.1% (39.5 ± 6.1 , $p < 0.0001$), when compared to vehicle (80.8 ± 6.1) group. After 24 h of edema induction, α -pinene (50 mg/Kg) even reduced paw edema by 56.3% (21.5 ± 4.6 , $p < 0.0001$) when compared to vehicle

(49,2 ± 5.3). It should be noted that T24 represents the 7th and last day of experiments.

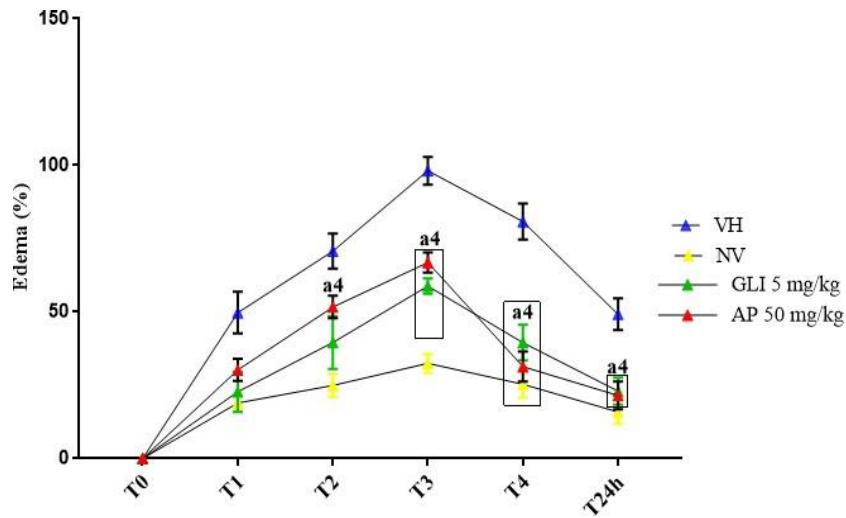


Figure 6. Effect of α -pinene on diabetic rats subjected to carrageenan-induced paw edema. The values are represented by the mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed through two-way ANOVA followed by Bonferroni (n = 10). The values were considered significant at **p<0.01; *** = p < 0.001, **** = p < 0.0001 VH. VH = vehicle; GLI = glibenclamida; AP = α -pinene.

The effect of α -pinene on granulocyte, monocyte, and lymphocyte migration in the carrageenan-induced peritonitis model in diabetic rats is shown in figures 7, 8, and 9, respectively. According to the figures, carrageenan injection promoted a significant increase in the number of granulocytes (38.9 ± 2) by 55%, monocytes (8.6 ± 1.4) by 79.6% and lymphocytes (75.3 ± 6.1) by 68.6% in the peritoneal cavity of vehicle-treated rats compared to the naive group (17.2 ± 1.6 ; 1.68 ± 0.2 and 23.6 ± 2.6 , respectively). On the other hand, dexamethasone treatment (5 mg/Kg, v.o.) significantly reduced the migration of granulocytes (21.3 ± 0.1 mg/dL, p<0.0001) by 45.2%, monocytes (1.3 ± 0.16) by 83.5% and lymphocytes (3.9 ± 0.5) by 94.7%, in the peritoneal cavity of the rats relative to the vehicle group. Similarly, α -pinene treatment (50 mg/Kg, v.o.) also significantly reduced the migration of granulocytes (17.5 ± 2.6 mg/dL, p<0.0001) by 54.9%, monocytes (3.42 ± 0.3 mg/dL, p<0.0001) by 58.5% and lymphocytes (28.6 ± 4.7 mg/dL, p<0.0001) by 62.1% in the peritoneal cavity of the rats relative to the vehicle group.

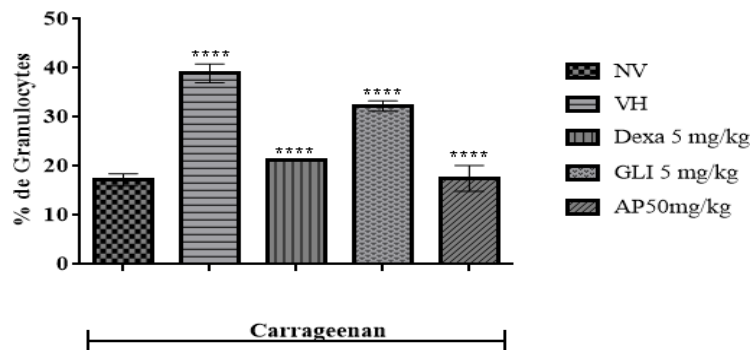


Figure. 7. Effect of α -pinene on granulocytes migration in the carrageenan-induced peritonitis test. The columns represent the mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed through two-way ANOVA followed by Bonferroni (n = 10). The values were considered significant at **p<0.01; *** = p < 0.001, **** = p < 0.0001. VH = vehicle; NV = naive; GLI = glibenclamide; AP = α -pinene.

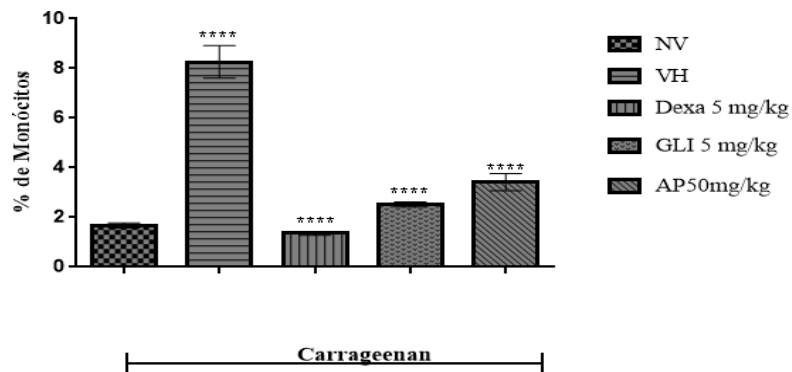


Figure. 8. Effect of α -pinene on monocytes migration in the carrageenan-induced peritonitis test. The columns represent the mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed through two-way ANOVA followed by Bonferroni (n = 10). The values were considered significant at **p<0.01; *** = p < 0.001, **** = p < 0.0001. VH = vehicle; NV = naive; GLI = glibenclamide; AP = α -pinene.

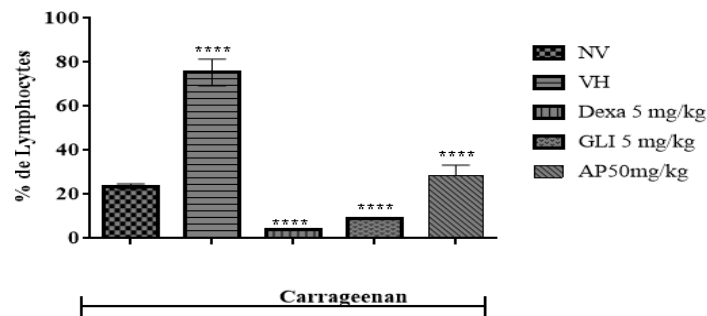


Figure 9. effect of α -pinene on lymphocyte migration in the carrageenan-induced peritonitis test. The columns represent the mean \pm standard error of the mean (SEM), analyzed through two-way ANOVA followed by Bonferroni (n = 10). The values were considered significant at ** $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$ VH. VH = vehicle; NV = naive; GLI = glibenclamida; AP = α -pinene.

4. Discussion

The International Diabetes Federation (IDF) has estimated 537 million people living with diabetes in 2021, it is projected to rise to 643 million by 2030 and 783 million by 2045. Direct health care spending due to diabetes is already close to a trillion dollars and will exceed that number by 2030 [17].

Hyperglycemia predominantly affects the retina, peripheral nerves, and renal glomeruli. These cells share the inability to regulate glucose uptake at elevated levels in the extracellular medium [18]. This glycemic condition also induces endothelial dysfunction through a variety of mechanisms, such as reduced vasodilation, increased vasoconstriction, increased exposure to free radicals, and decreased endothelial cell function [19].

Hypoglycemic therapy remains a cornerstone for diabetes control in conjunction with healthy lifestyle [20]. Oral hypoglycemic agents act in various ways to improve the effectiveness of insulin action in the body, and are used in the treatment of type II diabetes. Sulfonylureas, biguanides, alpha-glucosidase, meglitinides, DPP-4 inhibitors and thiazolidinediones are among the classes of oral hypoglycemic agents available to treat type II diabetes, but their side effects caused in patients under treatment with these drugs are still a cause for concern [21].

Natural products, particularly those of plant origin, are the main source of bioactive substances and promising in drug development because they have low cost and fewer side effects [22]. In developing countries, medicinal plants are widely used in the treatment of

diabetes due to the high cost of conventional drugs for the general population [23]. Currently, the treatment of diseases, such as diabetes, using medicinal plants is recommended [24], because these plants contain various phytoconstituents, such as flavonoids, terpenoids, saponins, carotenoids, alkaloids, and glycosides, which may possess antidiabetic activities [25].

The α -pinene belongs to the chemical class of monoterpenes, widely found in essential oils, and it is indicated as an antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant agent [26]. It is an isomer with β -pinene and has enantiomers known in nature as (-) α -pinene (most common in European pine trees), (+) α -pinene. The racemic mixture is present in some essential oils, such as eucalyptus oil [27].

The present study demonstrates that (-) α -pinene showed a significant reduction in blood glucose levels in alloxan-induced diabetic rats starting at a dose of 25 mg/Kg. Alloxan promotes a release of insulin by influx of calcium ions into the cytosol of β -cells, followed by complete suppression of the pancreatic islet response to glucose as a result of β -cell necrosis [28]. Its action in the pancreas occurs as a result of its rapid absorption and accumulation in beta cells, increasing the rate of uptake of the drug by this cell, through the glucose transporter GLUT2 present in plasma [29],[30],[31],[32],[33].

The current drugs used for glycemic control, such as glibenclamide, has as mechanism of action the inhibition of ATP-sensitive K^+ channels (KATP), which leads to cell depolarization and insulin secretion and consequently glycemic control. Thus, we propose to evaluate the association of a subtherapeutic dose of glibenclamide (2 mg/Kg) with α -pinene (10 mg/Kg) to verify the potential of these drugs in an in vivo system regarding glycemic parameters, cholesterol and triglycerides.

The association of glibenclamide (2mg/kg) with α -pinene (10mg/kg) has showed a statistically significant reduction in glycemic parameters, which shows that α -pinene potentiates the effect of glibenclamide probably by the same mechanism of action.

Recent studies by Santos et al. [12], show that the same test was performed with the beta pinene isomer which showed a positive effect in reducing not only blood glucose, but also reduced cholesterol and triglycerides, occurring a synergism between beta pinene and glibenclamide, thus assuming that the mechanism of action is similar to that of the standard drug used (glibenclamide), which stimulates insulin secretion by blocking K^+ -ATP-dependent channels in the membranes of pancreatic β -cells, causing depolarization in the plasma membrane and consequently the opening of calcium channels, which in high concentrations inside the cells promotes the secretion of insulin vesicles into the bloodstream [34]. These findings, corroborate with the present study which shares the same test model, but in that one

testing the alpha pinene isomer and obtaining very similar patterns as effective response on drug synergism.

In another study Lee et al. [35], analyzed the essential oil of lemon (*Citrus limon* (L.)), which has α -pinene in its composition, obtaining a hypocholesterolemic effect, when tested in rabbits. Corroborating with the study in question, through its results, α -pinene reduces cholesterol and fractions, in addition to triglycerides in rats.

Coqueiro et al. [36] also analyzes the effect of oregano tea (an extract that has terpene compounds in its composition), on dyslipidemia and does not notice an effective action in reducing the concentration of lipids and lipoproteins during four weeks. This finding differs from the present study, which analyzed the isolated substance (α -pinene), and had as a result the reduction of cholesterol in the highest dose of 100 mg/Kg, reduction of lipoproteins and triglycerides in all doses analyzed.

Hypertriglyceridemia is a common feature in patients with diabetes as it also promotes changes in plasma lipid concentration [37]. Overproduction of VLDL by the liver, as well as decreased removal of triglyceride-rich lipoprotein, as an example, is caused by reduced activity of lipoprotein lipase (PLP), an enzyme important for its function of hydrolysing triglyceride molecules found in lipoprotein particles [38]. Santos et al [12], studying the isomer compound of α -pinene, the (β -pinene) in the same analysis standards, observed that β -pinene, did not reduce total cholesterol. This fact leads us to observe that the isomers of the substances may present different results in a drug therapy, due to the chemical difference of the compounds evidenced in the two isomers (α -pinene and β -pinene) [21].

Another fact that draws attention in the studies by Santos et al, [12], is the fact that β -pinene shows no action in reducing liver enzymes (AST and ALT), which differs in the present study, which evaluates the effect of α -pinene in the same parameter and has as a result the reduction of both biochemical rates at a dose of 100mg/kg. The aminotransferases (AST and ALT) are widely distributed in liver and skeletal muscle tissues. The elevation of their rates occur due to hepatobiliary diseases [39]. Liver disease can also arise as a complication of diabetes due to insulin resistance and hyperinsulinemia that trigger mechanisms that induce liver inflammation and fibrosis. The insulin resistance associated with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus promotes the release of fatty acids by the adipose tissue, which accumulate in the hepatocyte promoting an increase of triglycerides in the liver. This fat accumulation besides originating hepatic steatosis, also results in oxidative stress at the mitochondrial level (lipotoxicity) with free radical production and consequent induction of chronic inflammation, necrosis and cell apoptosis [40].

Several studies conducted with essential oils containing α -pinene as one of the main constituents show anti-inflammatory activities [41], [42]. In the evaluation of anti-inflammatory activity in diabetic rats, α -pinene significantly reduced inflammation from the second hour, results similar to the action of glibenclamide. Previous work by Bae et al [43]. a pretreatment with α -pinene reduced the production of pancreatic tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6 in the cerulein-induced acute pancreatitis in rats, corroborating with our findings. Pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- are important in inflammatory diseases[42].

α -pinene has anti-inflammatory activities in various cell types such as rat peritoneal mast cells [44], in human mast cells and in chondrocytes [45].

In this study, the anti-inflammatory effect of α -pinene was performed using the carrageenan-induced paw edema and peritonitis. Thus, paw edema was induced in the diabetic rat by carrageenan induction. This model subsidizes two important analyses, the antiedematous action of the drug in question and the measure of inflammatory mediators involved in the process. The model elucidates the participation of the drug during an acute or chronic inflammation.

This experiment involves the release of several mediators inducing an inflammatory reaction in two different phases: the initial phase, which occurs from zero to three hours after the injection of the flogistic agent, and is attributed to the action of histamine, serotonin, and bradykinin, and the late phase, which is dependent on the production of tissue prostaglandins [46].

Inflammation is a set of biochemical, physiological and immunological alterations that respond to aggressive stimuli to the organism. In the acute phase response occurs an increase in blood flow and vascular permeability, with recruitment of leukocytes to the focus of injury, in addition to the release of inflammatory mediators. Cell migration to the region where inflammation is occurring is strongly influenced by the action of cytokines, which are peptides or polypeptides produced by inflammatory cells or tissues, in normal conditions, or in situations of mechanical, biochemical and/or functional cellular stress [47].

In Moller's study [48] it was already evidenced that inflammation has a peak of elevation in the first 3 hours of the induced edema. Subsequently, this edema decreases to the basal level, when there are no new stimuli. The present study shows that there was a peak of inflation in the third hour and later a reduction of this peak, especially after 24 hours, reaching close to the basal levels.

The inflammatory process in diabetes has a longer duration, because it is a chronic

disease. To better visualize this fact, we analyzed the inflammatory response up to 24 hours after induction. In the naive group (animals that did not undergo induction or treatment), It was seen that they presented a mild inflammatory response in the third hour. Soon after, it returned to normal levels, when compared to the vehicle. On the other hand, the diabetic untreated, inflamed animals had high peaks of inflammatory response, reducing slightly after 24 hours. The α -pinene was able to reduce edema at the lowest effective dose 50 mg/Kg, 31.8%, in the third hour. And even after 24 h, it was able to reduce edema by 61.2%.

Dultra, et al ^[49] studied the anti-inflammatory effect of a terpene-rich plant by analyzing its methanolic extract of *E. grandifl orus* in carrageenan-induced paw edema model in rats. They showed that the extract had a significant effect in reducing edema similar to the standard drug in only 4h of experiment. This study is similar to the study in question, which through the same model, obtains similar results. The only difference is that in our study we are working with diabetic rats, that is, a chronic disease.

Reduction in paw edema volume is a useful marker in determining the anti-inflammatory effect of drugs, plant extracts and essential oils on carrageenan-induced acute inflammation ^[50].

Based on the promising results of α -pinene in reducing inflammation, its participation in polymorphonuclear chemotaxis through the peritonitis model was also investigated ^[51].

This model involves cell migration and plasma exudation into the peritoneal cavity during an inflammatory process, as well as macrophages to promote phagocytosis of the aggressor agent. During the inflammatory process, neutrophils are recruited to the inflammatory focus, playing a defensive role for the organism ^[52].

Our results showed the important role of α -pinene in recruiting leukocyte cells to the site of inflammation. Although the results are promising for the anti-inflammatory action of α -pinene, they do not allow us to elucidate the exact mechanism by which the substance reduces edema in this model. Further studies are needed to elucidate this activity.

5. Conclusions

The α -pinene showed a hypoglycemic effect in alloxan-induced diabetic animals, possibly by inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels (KATP), similar to glibenclamide. It also showed a hypolipidemic effect, reducing cholesterol levels at a higher dose. It reduced both cholesterol and triglyceride fractions. In addition, it showed a significant reduction in AST and ALT liver enzymes. Oral administration of the association of α -pinene (AP10) + glibenclamide (Glib) caused a short-term reduction in blood glucose, suggesting that the compound possibly

has a synergistic effect to the standard drugs, sulfonylureas.

The α -pinene showed an important anti-inflammatory effect, significantly reducing the edema in the paw of diabetic animals at a dose of 50 mg/Kg. In addition to participating in the chemotaxis of immune cells to the site of inflammation and playing a role in reducing the inflammatory process. It is necessary, however, new pre-clinical tests using different methods to elucidate more clearly the mechanism of action by which α -pinene is performing its activity.

Data Availability Statement

Data available on request.

Funding Statement

The author has no funding to disclose.

Reference

- [1] Salles, B.C.C; Terra, M.C; Paula, F.B.A; “Sinalização Mediada pela Insulina em Vias Anabólicas Insulin-mediated Signaling in Anabolic Way”. *Revista Farmácia Generalista/ Generalist Pharmacy Journal*, v. 1, n. 2, p. 25-45, 2019.
- [2] Federation, Internacional Diabetes. IDF diabetes atlas 8th edition. *International Diabetes Federation*, p. 905-911, 2017.
- [3] Chauhan, A., Sharma, P. K., Srivastava, P., Kumar, N., & Dudhe, R. “Plants having potential antidiabetic activity”: a review. *Der Pharmacia Lettre*, v. 2, n. 3, p. 369-387, 2010.
- [4] Oguntibeju, O.O., “Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links”, *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, v.11(3):45-63. 2019.
- [5] Maedler, K., “Leptin modulates cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1 β in human islets”. *PNAS*, v.101, p.8138-8143,2011.
- [6] Sewell, Robert D.E; Rafieian-Kopaei, Mahmoud. “The history and ups and downs of herbal medicines usage”. *Journal of HerbMed pharmacology*, v. 3, n.1, p.1-3, 2014.
- [7] Murray, M.T., 1995. Healing power of Herbs. 2nd edition, *Gramercy Books* NY. 357.
- [8] Robert D. E. Sewell, Mahmoud Rafieian-Kopaei, “The history and ups and downs of herbal medicines usage”, *Journal of HerbMed Pharmacology, J HerbMed Pharmacol*, 3(1): 1-3.2014.
- [9] Barbara F. F. Haniel R. G. Maria R. G. Antônio A. A. Isanete G. C.B. “Estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de saponinas e sua importância medicinal”, *SAJES – Revista da Saúde da AJES*, Juína/MT, v. 5, n. 9, p. 16 – 22, Jan/Jun. 2019.
- [10] Türkez, Hasan; Aydin, Elanur. “In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of α -pinene”. *Toxicology and industrial health*, v. 32, n. 1, p. 168-176, 2016.
- [11] Bahmani, M., Golshahi, H., Saki, K., Rafieian-Kopaei, M., Delfan, B., & Mohammadi, T. Medicinal plants and secondary metabolites for diabetes mellitus control. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 4, p. S687-S692, 2014.
- [12] Santos, S.S; Coelho,G.L.A;Loula,Y.K.S.F; Landim,B.L.S; Lima,C.N.F; Machado,S.T.S;Lopes.M.J.P; Gomes, A.D.S.;Costa, J.G.M; Menezes,I.R.A; Coutinho,H.D.M;Kim, B; Felipe, C.F.B; Neves, S.A; Kerntopf, M.R. “Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Anti-Inflammatory Effects of Beta-Pinene in Diabetic Rats”. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2022, Article ID 8173307, 8 pages,2022.
- [13] Sewell, R.D.E; Kopaei, M.R. “The history and ups and downs of herbal medicines usage”. *J HerbMed Pharmacol*,3(1): 1-3,2014.
- [14] Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Castro, MAS, De Lima TCM. “Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais”. 5 ed. 2008; 2008 São Paulo.
- [15] Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica – DBCA. Brasília, DF, 2013.
- [16] Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. Carragenin-induced. Edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Exp. Biol. Med.* V.111, 544-547, 1962.
- [17] International Diabetes Federation. IDF diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021. Published by Elsevier B.V, 2021.
- [18] Villaa, J.K.D; Silva, A.R; Santos, T.S.S; Ribeiro, A.Q; Rocha, L.F. “Risco de síndrome metabólica em crianças: uso de um escore único”. *Revista Paulista de Pediatria*, v.33. 187-193, 2015.
- [19] Pires, A.A; Martins, P.A; Paiva, B.A; Pereirac, A.M; Marques, M.D; Castela, E.; Sena, C; Seica, R. “Circulating endothelial progenitor cells in obese children and adolescents”. V.91. p. 560-566, 2015.
- [20] Nauck, Michael, A; Wefers, Jakob; Meier, Juris, J. Treatment of type 2 diabetes: challenges, hopes, and anticipated successes. *The lancet diabetes & endocrinology*, v. 9, n. 8, p. 525-544, 2021.
- [21] Avery, Mitchell, A; “Type 2 diabetes and oral antihyperglycemic drugs”. *Current medicinal chemistry*, v. 15,n. 1, p. 61-74, 2008.
- [22] Sharma, Rohini; ARYA, Vikrant. “A review on fruits having anti-diabetic potential”. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 3, n. 2, p. 204-212, 2011.
- [23] Arumugam, G.; Manjula, P.; Paari, N. A review: “Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus”. *Journal of Acute Disease*, v. 2, n. 3, p. 196-200, 2013.
- [24] Kooti, Wesam et al. “Therapeutic and pharmacological potential of *Foeniculum vulgare* Mill”: a review. *Journal of HerbMed Pharmacology*, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2015.
- [25] Afrisham, Reza et al. “Inhibitory Effect of *Heracleum persicum* and *Ziziphus jujuba* on Activity of Alpha-Amylase”. *Journal of Botany*, v. 2015, 2015.
- [26] Lorena O. Felipe e Juliano L. Bicas. “Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais”. *Quím. nova esc.* – São Paulo-SP, BR.. Vol. 39, N° 2, p. 120-130, Maio 2017.
- [27] Yang Z., Wu N., Zu Y., Fu Y. “Comparative anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of (α)-pinene:

effect on nucleocapsid (N) protein. *Molecules*. V.16 1044–1054, 2011.

- [28] Szkudelski T, Kandulska K, Okulicz M. “Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells”. *Physiol Res*. 47(5):343-6, 1998.
- [29] Lima MA, Lima LMB, Rita DPC, Navarro FC, Tatsukawa RS, Pereira GA, Reis LC, Abreu MEA, Borges MF. ‘Análise quantitativa das células das ilhotas pancreáticas em ratos sob efeito de aloxana’. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 34(1):308-14, 2001.
- [30] Szkudelski, T. “The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas”. *Physiol Res*. 50(6):536-46, 2001.
- [31] Zanoello AM, Mazzanti CM, Gindri JK, Filappi A, Prestes D, Cecim M. “Efeito Protetor do *Syzygium cumini* contra Diabetes mellitus induzido por Aloxano em Ratos”. *Acta Farm Bonaer*. V.21(1):31-6, 2002.
- [32] Cavalli VLLO, Sordi C, Tonini K, Grandó A, Muneron T, Guigi A, Roman Júnior WA. “Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill)”. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17(1):64-70.
- [33] Lenzen S. “The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes”. *Diabetologia*. 51(2):216-26, 2008.
- [34] Gilbert, r. e; Krum, h. “Heart failure in diabetes: effects of anti-hyperglycaemic drug therapy”. *The Lancet*, Toronto, v. 385, n. 9982, p.2107-2117, maio 2015.
- [35] H. Lee, M. Woo, M. Kim, J. S. Noh, and Y. O. Song, “Antioxidative and cholesterol-lowering effects of lemon essential oil in hypercholesterolemia-induced rabbits,” *Preventive Nutrition and Food Science*, vol. 23, no. 1, pp. 8–14, 2018.
- [36] D. P. Coqueiro, P. C. S. Bueno, E. L. Guiguer et al., “Efeitos do chá de orégano (*Origanum vulgare*) no perfil bioquímico de ratos Wistar,” *Scientia Medica*, vol. 22, pp. 191–196, 2012.
- [37] Bahia, C.B; Guimarães, R.M; Asmus, C.I.R.F. “Alterações nos marcadores hepáticos decorrentes da exposição ambiental à organoclorados no Brasil”. *Cad. Saúde Colet*, Rio de Janeiro, 22 (2): 133-41, 2014.
- [38] Carvalho, J.F; Caleiro, M.T.C. “Lipoproteína(a) na síndrome antifosfolípide primária”. *Rev Bras Reumatol*, 49(3):246-53, 2009.
- [39] Kondo. M; Magalhães, C.F; Mota, G.P; Schreen, D. “Abordagem e tratamento da hipertensão portopulmonar”. *Sociedade Brasileira de Hepatologia e Associação de Medicina Intensiva Brasileira*, 2014.
- [40] Giestas, S; Giestas, A; Agostinho, C; Doença Hepática e Diabetes Mellitus – Uma Relação Bi-Direcional. *Revista Portuguesa de Diabetes*. v10 (4): 158-166, 2015.
- [41] Fusatto, A.L.M; Camargo, P.R; Castro, S.C; Brito, J.O; “Pastas Estimulantes em Sistemas de Resinagem de pinus elliottii var. elliottii stimulating pastes on system for resin flow of pinus elliottii var. Elliottii”. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 23, n. 3, p. 483-488, jul.-set, 2013.
- [42] Popovic, Z. et al. “Ecologically Acceptable usage of Derivatives of Essential Oil of Sweet Basil, *Ocimum basilicum*, as Antifeedants Against Larvae of the Gypsy Moth, *Lymantria dispar*”. *Journal of Insect Science*, 13, 161, 2013.
- [43] Bae, G. S.; Kim, M. S.; Jeong, J.; Lee, H. Y.; Park, K. C.; Koo, B. S.; Kim, B. J.; Kim, T. H.; Lee, S. H.; Hwang, S. Y.; Shin, Y. K.; Song, H. J.; Park, S. J. “Piperine ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting the activation of mitogen activated protein kinases”. *Biochem Biophys Res Commun*, v.8, n.410(3), p.382-8, 2011.
- [44] Simsek, T; Kocabas, F; Zheng, J; Deberardinis, R.J; Mahmoud, A.I; Olson, E.N; Schneider, J.W; Zhang, C.C; Sadek, H. A; “The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche”. *Cell Stem Cell*. Sep 3;7(3):380-90, 2010.
- [45] Moon, C.T; Befus, D.A; Kulka, M; “Mast cells mediators: their differential release and the secretory pathways involved”. *Frontiers in Immunology*, v.5, article 569, 2014.
- [46] Etienne, R.; Viegas, F. P. D.; Viegas Jr., C. “Aspectos Fisiopatológicos da Inflamação e o Planejamento de Fármacos: uma Visão Geral Atualizada”. *Rev. Virtual Quim*, 2021, 13 (1), no prelo. Data de publicação na Web: 17 de Novembro de 2020.
- [47] Poluha, R.L; Grossmann, E; “Mediadores inflamatórios relacionados às disfunções temporomandibulares artrogênicas”. *Br J Pain*. São Paulo, jan-mar;1(1):605, 2018.
- [48] Moller, K.A.; Berge, O; Hamers, F.P.T. “Using the catwalk method to assess weight bearing and pain behavior in walking rats with ankle joint monoarthritis induced by carrageenan: Effects of morphine and refecoxib”. *J. Neurosci. Methods*. 2008.
- [49] Dutra, R. C; Tavares, Carolina. Z; Ferraz, Sávio. O; Orlando.V; Pimenta, Daniel.S. “Investigação das atividades analgésicas das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandifloras*”. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n.4. 469-474, 2006.
- [50] Rocha. K.B; Luciana. S.L L; Aguiá, S.M.C. “O modelo de dor inflamatória induzida pela carragenina como estratégia para avaliar a ação de drogas sobre a dor miofascial”. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v19,2020.
- [51] Kummer R, Fachini-Queiroz FC, Estevão-Silva CF, Grespan R, Silva EL, Bersani-Amado CA.

“Evaluation of anti-inflammatory activity of citrus latifolia Tanaka essential oil and 52 limonene in experimental mouse models. Evidence-based “. *Complement Altern Med.* P.1–8, 2013.

[52] Carvalho,C.J.S; Santos, I.O. “The use of phytotherapes in the treatment of rheumatic diseases and diabetes”. *Rev.Pub Saude.* 2021. 6 – 157.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A International Diabetes Federation (IDF) estimou 537 milhões de pessoas vivendo com diabetes em 2021, e que esse número deve chegar a 643 milhões em 2030 e 783 milhões em 2045. Os gastos diretos com saúde devido ao diabetes já estão próximos a um trilhão de dólares e ultrapassarão esse número até 2030 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021).

A hiperglicemia afeta predominantemente a retina, nervos periféricos e glomérulos renais. Essas células compartilham a incapacidade de regular a captação de glicose em níveis elevados no meio extracelular (DE FERRANTI et al., 2014). Essa condição glicêmica também induz a disfunção endotelial por meio de uma variedade de mecanismos, como redução da vasodilatação, aumento da vasoconstrição, aumento da exposição aos radicais livres e diminuição da função das células endoteliais (BECKMAN et al., 2013).

A terapia hipoglicemiante continua sendo um dos pilares para o controle do diabetes em conjunto com o estilo de vida saudável (NAUCK; WEFERS; MEIER, 2021). Os hipoglicemiantes orais atuam de várias formas para melhorar a eficácia da ação insulínica no organismo, sendo utilizados no tratamento da diabetes tipo II.

Sulfonilureias, biguanidas, alfa-glicosidase, meglitinidas, inibidores de DPP-4 e tiazolidinedionas estão entre as classes de hipoglicemiantes orais disponíveis para tratar o diabetes tipo II (AVERY et al., 2008).

Os produtos naturais, particularmente os de origem vegetal, são a principal fonte de substâncias bioativas e promissores no desenvolvimento de medicamentos por possuir baixo custo e menos efeitos colaterais (SHARMA et al., 2011).

Nos países em desenvolvimento, as plantas medicinais são bastantes utilizadas no tratamento do diabetes devido ao custo elevado dos medicamentos convencionais para a população em geral (ARUMUGAM et al., 2013). Atualmente, o tratamento de doenças, como o diabetes, usando plantas medicinais é recomendado (KOOTI et al., 2015) porque essas plantas contêm vários fitoconstituintes, como flavonóides, terpenóides, saponinas, carotenóides, alcalóides e glicosídeos, que podem possuir atividades antidiabéticas (AFRISHAM et al., 2015). Os isômeros – α -pinene β -pineno – pertencem à classe química dos monoterpenos, comumente encontrados nos óleos essenciais, sendo indicado como agente antimicrobiano,

anti-inflamatório e antioxidante (LORANA et al., 2017). A mistura racêmica está presente em alguns óleos essenciais, como o óleo de eucalipto (WANG et al., 2011).

A indução do diabetes experimental pelo uso de aloxano é bastante comum no meio científico. Essa substância diabetogênica favorece o aparecimento de sinais clínicos semelhantes aos sinais encontrados em humanos com síndrome diabética e provoca alterações morfológicas e estruturais em alguns órgãos (LERCO et al., 2003).

O fígado é um órgão que contribui para manutenção das concentrações normais de glicose em jejum e pós-prandial. A falta ou ineficiência de insulina leva ao processo de glicogenólise e, conseqüentemente, a elevação da glicemia plasmática. Quando esse órgão é afetado, ocorre um armazenamento de triglicerídeos e a metabolização de gorduras (LUCCHESIAN, 2015).

Gomes et al. (2008) demonstraram, em seus estudos, que o aloxano, apesar de causar o diabetes tipo 2, não destrói todas as células β pancreáticas, mas causa apenas uma redução dessas células. O presente trabalho utilizou esse método de indução do diabetes para testar as atividades hipoglicemiantes e hipolipidêmicos do (-) - β -pineno e (-) - α -pineno em ratos. Foi utilizado, similarmente, fármacos já conceituados com efeito hipoglicemiante para ser comparado a substância em estudo. A escolha foi a glibenclamida, que faz parte dos secretagogos de insulina da classe das sulfoniluréias (DAVIS, 2006).

A glibenclamida promove uma liberação de insulina em virtude do influxo de íons cálcio ao citosol das células β , seguida por completa supressão da resposta das ilhotas pancreáticas à glicose, em decorrência de necrose das células β (SZKUDELSKI et al., 1998; LIMA et al., 2001; SZKUDELSKI, 2001).

A ação do aloxano no pâncreas ocorre de modo que há uma rápida absorção e acúmulo nas células beta, elevando a taxa de captação da droga por essa célula, por meio do transportador de glicose GLUT2 presente no plasma (LIMA et al., 2001; SZKUDELSKI, 2001; ZANOELLO et al., 2002; CAVALLI et al., 2007; LENZEN, 2008). As análises e o acompanhamento do experimento foram realizados a curto prazo – apenas em uma semana –, com objetivo de avaliar os primeiros efeitos do diabetes.

Inicialmente, a DL_{50} do monoterpene (-) - β -pineno e (-) - α -pineno foi estimada e, posteriormente, seguida a metodologia da OECD 423/2001, que analisa as primeiras horas os sinais de toxicidade e morte dos animais ao longo dos 14 dias. Os resultados expressaram que as substâncias não apresentaram alterações comportamentais significativas, nem mortes durante todos os dias da análise, tendo uma dose segura DL_{50} maior que 2.000 mg/Kg, norteando a escolha das doses para os experimentos posteriores.

Esses resultados são compatíveis aos estudos de Felipe e colaboradores (2018), que testaram um dos isômeros ((-)- β -pineno), só que em camundongos, e obtiveram, como resultado estimado, a DL_{50} maior que 2.000 mg/Kg. No entanto, o β -pineno em camundongos, promoveu uma sedação leve, após 60 minutos de observação, representando baixa toxicidade, diferentemente deste trabalho, que testou a substância em ratos. Com esses, nem mesmos sinais mínimos de toxicidade foram achados.

Este trabalho também corrobora com os estudos de Marques et al. (2013), que avaliaram a toxicidade em diversas células em ratos sobre o efeito do decocto das folhas de *Bauhinia forficata* Link., que possui em sua composição o β -pineno. Porém, não indicou toxicidade tecidual. Salehi et al. (2019) também mostraram em seus estudos que o perfil de segurança dos pinenos é considerado seguros.

Após a confirmação que os isômeros são drogas seguras, deu-se continuidade à avaliação do efeito hipoglicemiante, hipolipidêmico e anti-inflamatório dos isômeros, com a indução do diabetes pelo aloxano em ratos.

O estudo demonstra que tanto o β -pineno como α -pineno reduziram significativamente os níveis de glicose nos animais diabéticos. Esse fato ratifica os estudos de Valdes et al. (2019), ao expor que diversas substâncias isoladas desse grupo apresentam um efeito hipoglicemiante em camundongos, em uma indução com outro tipo de diabetogênico, que é a estreptozotocina. Mandal e colaboradores (2015), ao estudar o efeito antidiabético de duas substâncias triterpênicas, verificaram que os compostos apresentaram redução expressiva dos níveis elevados de glicose em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Coqueiro et al. (2012) apresentaram em seus estudos que o chá de orégano (*Origanum vulgare* L.), tem efeito hipoglicemiante em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina. Essa planta tem substâncias terpênicas em sua composição química, sendo, uma delas, o α -pineno, que é um isômero da substância em estudo. A constatação contribui para afirmação de que os componentes químicos das plantas são responsáveis pelo efeito farmacológico. Isso mostra a correlação ao presente estudo, que demonstrou que a substância terpênica isolada apresenta efeitos similares na redução da glicemia, porém, com o agente indutor do diabetes distinto.

Estudos de Lee et al (2018) mostram que o óleo essencial do limão (*Citrus limon* L.), contém, entre outras substâncias, o β -pineno em sua composição e desempenha um efeito hipocolesterolêmico, quando testados em coelhos. Os estudos de Lino e colaboradores (2004), relatam que espécies da família *Fabaceae* contêm várias substâncias químicas em sua composição, entre elas, o α e β -pineno apresenta redução significativa nos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e HDL, em ratos hiperglicêmicos tratados com extrato aquoso,

etanólico e hexânico das folhas de espécies da família. Este fato corrobora em partes com o presente estudo que mostra que o (-) - β -pineno, apresenta uma discreta redução nas frações do colesterol em suas doses maiores de 50 e 100 mg/Kg, todavia, não significamente estatístico quanto ao colesterol total. Já o (-) - α -pineno apresentou redução dos níveis de colesterol total na dose de 100 mg/Kg e frações a partir da dose de 25 mg/Kg. Tal fato pode ser explicado pelos eventos químicos e estrutura atividade dos compostos. Nos exemplos acima, os autores testaram extratos de plantas medicinais que tinham os isômeros (β -pineno e α -pineno) em sua composição.

Outros estudos na literatura demonstraram a existência de diversas plantas medicinais utilizadas não só para o tratamento de diabetes como também de dislipidemia. Esse fato está relacionado aos seus constituintes químicos ativos para essa finalidade. Os estudos de Harach et al. (2010), por exemplo, relatam que o extrato das folhas de *R. officinalis* L. possuem compostos terpênicos e promoveram uma redução da gordura abdominal em camundongos sobre a ação da lipase, que quebra a gordura do pâncreas, possivelmente, pela ação de seus constituintes químicos.

Rouhi-Boroujeni et al. (2015) também atribuem a redução do perfil lipídico no sangue dos animais, quando testados com a *Syzygium cumini* L. aos seus constituintes químicos, entre eles, terpenos. Essas pesquisas evidenciam que o grupo de terpenos e suas classificações apresentam um importante efeito farmacológico da redução dos níveis de glicose, colesterol e triglicerídeos, o que subsidia o presente trabalho ao indicar resultados promissores dos isômeros (-) - β -pineno e (-) - α -pineno para um efeito hipoglicemiante e hipolipidêmico.

Coqueiro et al. (2012) também analisa o efeito do chá de orégano (extrato que apresenta compostos terpênicos na sua composição) na dislipidemia, porém não percebe ação efetiva na redução da concentração dos lipídios e lipoproteínas durante quatro semanas. Esse achado, difere do presente estudo, que analisou a substância isolada (-) - β -pineno e (-) - α -pineno e teve como resultado a redução desses parâmetros, principalmente o (-) - α -pineno, que além de uma resposta mais efetiva na redução do colesterol total, lipoproteínas e triglicerídeos, também reduziu as enzimas hepáticas (ASL e ALT), na dose de 100 mg/Kg.

A hipertrigliceridemia é uma característica comum em pacientes com diabetes, pois também promove alterações na concentração de lipídios plasmáticos (MERZOUK et al., 2004). A superprodução de VLDL pelo fígado, bem como a diminuição da remoção de lipoproteína rica em triglicerídeos, por exemplo, é causada pela redução da atividade da lipoproteína lipase (PLP), uma enzima importante para sua função de hidrolisar moléculas de triglicerídeos encontradas em partículas de lipoproteínas (CARVALHO et al., 2005). Santos et al (2021),

estudando o composto (-) - β -pineno nos mesmos padrões de análise, observaram que esse composto, não reduziu o colesterol total. Isso nos leva a observar que os isômeros das substâncias podem apresentar resultados diferentes em uma terapia medicamentosa, devido à diferença química dos compostos evidenciada entre eles.

Outro fato que chama a atenção nos estudos de Santos et al. (2021) é o fato de o (-) - β -pineno não apresentar ação na redução das enzimas hepáticas (AST e ALT), o que difere dos resultados com seu isômero o (-) - α -pineno, o qual apresenta uma redução de ambas as taxas bioquímicas na dose de 100 mg/Kg. As aminotransferases (AST e ALT) estão amplamente distribuídas no fígado e nos tecidos musculares esqueléticos. A elevação de suas taxas ocorre devido a doenças hepatobiliares (CARVALHO et al., 2021). A doença hepática também pode surgir como complicação do diabetes devido à resistência à insulina e hiperinsulinemia, que desencadeiam mecanismos que induzem inflamação e fibrose hepática. A resistência à insulina associada à síndrome metabólica e ao diabetes mellitus tipo 2 promove a liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo e se acumulam no hepatócito, promovendo um aumento de triglicerídeos no fígado. Esse acúmulo de gordura, além de originar a esteatose hepática, também resulta em estresse oxidativo em nível mitocondrial (lipotoxicidade), com a produção de radicais livres e consequente indução de inflamação crônica, necrose e apoptose celular (MERZOUK et al., 2004).

Os fármacos atuais utilizados para o controle glicêmico, como a glibenclamida, possuem como mecanismo de ação a inibição dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (KATP), o que leva à despolarização das células e à secreção de insulina e, por conseguinte, controle glicêmico. Desta forma, propôs-se avaliar a associação de uma dose subterapêutica da glibenclamida (2 mg/Kg) com α -pineno (10 mg/Kg) para verificar o potencial dessas drogas em sistema *in vivo*, quanto aos parâmetros glicêmicos, colesterol e triglicérides. Com intuito de avaliar um efeito potencializador dos compostos, foi feita a associação da glibenclamida (2 mg/Kg) com os isômeros testados em uma subdose de 10 mg/Kg, a qual apresentou redução estatisticamente significativa nos parâmetros glicêmicos, demonstrando que o α -pineno e β -pineno potencializa o efeito da glibenclamida, provavelmente pelo mesmo mecanismo de ação. Quando avaliado a associação destas drogas em animais com hipercolesterolemia e triglicérides elevados, também foi observados redução estatisticamente significativa. Isso reforça ainda mais nossa hipótese.

Com base nestes resultados promissores para atividade hipoglicemiante e hipolipemiante dos isômeros, buscou-se analisar seus efeitos nas reações inflamatórias induzidas a ratos diabéticos.

Vários estudos realizados com óleos essenciais contendo o α -pineno e β -pineno como

constituente majoritário apresentam atividade anti-inflamatória (EL-READI et al., 2013; POPOVIĆ et al., 2014; KIM et al., 2004). Na avaliação da atividade anti-inflamatória em ratos diabéticos, ambos reduziram significativamente a inflamação a partir da segunda hora, quando analisado no modelo de edema de pata induzido com carragenina.

Esse modelo subsidia duas importantes análises: a ação antiedematosa da droga em questão e a dosagem de mediadores inflamatórios envolvidos no processo. O modelo também elucida a participação da droga durante uma inflamação aguda ou crônica.

Tal experimento envolve a liberação de vários mediadores, induzindo uma reação inflamatória em duas fases diferentes: a **fase inicial**, que ocorre de zero até três horas após a injeção do agente flogístico, sendo atribuída a ação da histamina, serotonina e bradicinina, e a **fase tardia**, que depende da produção de prostaglandinas dos tecidos (VALDES et al., 2019).

Em trabalhos anteriores, realizados por Bae et al. (2012), o pré-tratamento com α -pineno reduziu a produção de fator de necrose tumoral pancreática (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β e IL-6 no teste de pancreatite aguda induzida por ceruleína, e isso corrobora com os resultados deste trabalho. Citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF-, são importantes em doenças inflamatórias (MUDTER; NEURATH, 2007; PARK; PILLINGER, 2007; SIMSEK, 2010; RINCON; IRVIN, 2012).

O α -pineno possui atividade anti-inflamatória em vários tipos celulares, como mastócitos peritoneais de rato (MOON et al., 2013), em mastócitos humanos (NAM et al., 2014) e em condrócitos (RUFINO et al., 2014). No estudo de Moller (2008), já era evidenciado que a inflamação tem um pico de elevação nas primeiras 3 horas do edema induzido. Posteriormente, esse edema diminui a nível basal, quando não se tem novos estímulos. Percebe-se, assim, no presente estudo, que houve um pico da inflamação na terceira hora e posteriormente uma redução desse pico, principalmente após 24h, chegando próximo aos níveis basais.

O processo inflamatório no diabetes tem um tempo mais prolongado, por se tratar de uma doença crônica. Para melhor visualização desse fato, foi analisado a resposta inflamatória até 24 h de indução. Nos ratos do grupo naíve (animais que não sofreram indução e nem tratamento), nota-se que estes apresentaram uma resposta inflamatória branda na terceira hora. Logo após, contudo, passou aos índices normais, quando comparado ao veículo. Já os animais inflamados e não tratados, obtiveram altos picos de resposta inflamatória, reduzindo discretamente após as 24 h. O α -pinene conseguiu reduzir o edema na menor dose efetiva 50 mg/Kg, 31,8%, na terceira hora. E, mesmo após 24 h, conseguiu reduzir o edema em 61,2%. Dultra et al. (2011) estudaram o efeito anti-inflamatório de uma planta rica em terpenos, analisando seu extrato metanólico de *E. grandiflorus*, em modelo do edema da pata induzido

por carragenina em ratos. Mostrou que o extrato apresentou efeito significativo na redução do edema semelhante à droga padrão em apenas 4 h de experimento. Este estudo assemelha-se ao estudo em questão, que através do mesmo modelo, obtém resultado semelhante. A diferença é que no nosso estudo, trabalha-se com ratos diabéticos, ou seja, uma doença crônica.

Estudo recente de Santos et al. (2022) avalia o efeito do (-) - β -pineno no mesmo modelo, dose e também com ratos. Nele, observou-se que o composto apresentou uma redução da inflamação desde a segunda hora do processo inflamatório, seguindo para o pico da inflamação na terceira hora. Desse modo, este estudo corrobora com as análises realizadas com o enantiômero (-) - α -pineno, o qual apresenta resultados semelhantes em todos os tempos, além de voltar quase para níveis basais à resposta após 24 h do processo inflamatório induzido.

A redução do volume do edema da pata é um marcador útil na determinação do efeito anti-inflamatório de drogas, extratos vegetais e óleos essenciais na inflamação aguda induzida por carragenina. (SALEM et al. 2021). No estudo realizado com *A. bidiwilliirebentos* EO (ABSEO), foram encontrados quarenta e três componentes terpenóides, dentre os principais, beyereno (20,81%), α -pineno (16,21%), D-limoneno (14,22%), germacreno D (6,69%), β -humuleno (4,14%) e sabineno (4,12%). Em um estudo utilizando o modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina, exibiram supressão significativa da inflamação nas doses (50 e 100 mg/Kg), via oral, em comparação com os grupos controle e medicamentos de referência. Todos os resultados demonstraram a redução significativa da inflamação via citocinas inflamatórias (IL-1 β e IL8), nitrosativa (NO) e prostaglandina E2 (PGE2). Esses achados aconselharam o uso de ABSEO e sua nanoemulsão contra inúmeras doenças inflamatórias e hipertermia que poderiam ser atribuídas aos seus constituintes ativos. (ABDELHAMEED et al., 2021).

Os efeitos anti-inflamatórios agudos óleo essencial de frutos de *F. angulate*, que apresenta o cis- β -ocimeno (58,0%) e o α -pineno (10,0%) como os principais constituintes, também foram estudados com o edema de pata desencadeado em camundongos e se observou que todas as doses examinadas do óleo (25, 50 e 100 mg/Kg) causaram redução inflamatória. Os resultados indicaram que o óleo pode possuir atividades significativas contra a inflamação aguda e que, o cis- β -ocimeno (58,0%), seguido de α -pineno (10,0%), podem ser considerados como os compostos responsáveis pelo controle da inflamação e da dor (SHAFAROODI; ROOZBAHANI; ASGARPANA, 2021).

A inflamação é um conjunto de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas que respondem a estímulos agressivos ao organismo. Ocorre na resposta de fase aguda um aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, com recrutamento de leucócitos para o foco da

lesão, além de liberação de mediadores inflamatórios. A migração celular para a região em que está ocorrendo à inflamação é fortemente influenciada pela ação de citocinas, que são peptídios ou polipeptídios produzidos pelas células inflamatórias ou teciduais, em condições de normalidade, ou situação de estresse celular mecânico, bioquímico e/ou funcional (VADES et al., 2019).

Partindo dos resultados promissores do (-) - β -pineno e (-) - α -pineno na redução da inflamação, foi investigado também sua participação na quimiotaxia dos polimorfonucleares, por meio do modelo de peritonite. Este modelo envolve migração celular e exsudação de plasma para a cavidade peritoneal durante um processo inflamatório, assim como os macrófagos, para que promovam a fagocitose do agente agressor. Durante o processo inflamatório, os neutrófilos são recrutados para o foco inflamatório, desempenhando um papel defensivo para o organismo (LINO et al., 2004). No trabalho de Santos et al. (2022) também há a investigação do compostamento (-) - β -pineno na resposta celular frente a um processo inflamatório e tem, como resultado, a redução dos granulócitos, monócitos e linfócitos no mesmo modelo de indução. Este fato corrobora com o presente trabalho que ao descrever o efeito entre os isômeros, demonstra que o (-) - α -pineno também apresenta uma resposta efetiva na resposta das células inflamatórias durante o evento celular induzido.

Os resultados mostraram a importante atuação dos isômeros no recrutamento das células leucocitárias para o local da inflamação e conseqüentemente a atuação destas células na reparação tecidual. Embora os resultados sejam promissores para ação anti-inflamatória do (-) - β -pineno e (-) - α -pineno, não permitem elucidar o exato mecanismo, pelo qual a substância exerce a redução do edema neste modelo. Faz-se necessário um aprofundamento dos estudos para elucidação desta atividade.

5.2 CONCLUSÕES GERAIS

- Os isômeros (-) - β -pineno e (-) - α -pineno apresentaram efeito hipoglicemiante em ratos diabéticos induzido com aloxano nas doses de 50, 100 mg/Kg;
- (-) - β -pineno apresentou uma efetividade maior para a redução de triglicerídeos;
- (-) - α -pineno apresentou efetividade na redução do colesterol total e lipoproteínas, triglicerídeos e enzimas hepáticas (ALT e AST), e este último com efeito apenas na dose maior analisada (100 mg/Kg);
- A associação de GLB 2 mg/Kg + cada isômero na dose 10 mg/Kg, administradas oralmente causou uma redução importante nos níveis de glicemia, colesterol e triglicerídeos em um

curto prazo de 7 dias, sugerindo que os isômeros podem estar atuando por via canal de K^+ ATP-dependentes, assim como a glibenclamida, que é a droga de referência do grupo das sulfonilureias;

- Os isômeros mostraram um resultado estatisticamente efetivo na ação anti- inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina e uma redução dos polimorfonucleares no modelo de peritonite ao participar na quimiotaxia das células imunológicas para o local da inflamação e desempenhar uma redução do processo inflamatório;
- Faz-se necessário, no entanto, novos ensaios pré-clínicos em diferentes métodos para elucidar com mais clareza o mecanismo de ação pelo qual cada composto está desempenhando sua atividade.

5.3 PERSPECTIVAS DE INVESTIGAÇÕES FUTURAS

A escolha dos isômeros (-) - β -pineno e (-) - α -pineno para o estudo de suas propriedades hipoglicemiante foi despertada a partir de apanhados literários que demonstram as diversas atividades terapêuticas que os terpenos, classe de sua origem, apresenta. Além de sua disponibilidade nas plantas medicinais e a variedade de compostos isolados já divulgados (CHANG et al., 2010). Além disso, os terpenos apresentam propriedades hipoglicêmica, responsáveis por aumentar a produção de insulina e tratar o diabetes. Este trabalho buscou, com testes experimentais de triagem, investigar esse efeito. Pôde-se perceber que a substância apresenta um efeito promissor na redução do diabetes e outros parâmetros bioquímicos relacionados a dislipidemia. O mecanismo de ação da droga ainda não está bem esclarecidos. Sabe-se que possivelmente age semelhantemente ao mecanismo de ação da glibenclamida, droga utilizada nos experimentos como referência. O efeito potencializador descrito neste trabalho fortaleceu a hipótese. Entretanto, mais experimentos necessitam ser realizados para melhor fundamentação para se constituir como base de evidências no esclarecimento detalhado do mecanismo.

Espera-se, com esta pesquisa, a continuidade das investigações dos isômeros (-) - β -pineno e (-) - α -pineno, enxergando a possibilidade da continuidade em mais análises, para futuro uso terapêutico em humanos, uma vez que seja melhor detalhado os diferentes mecanismos de ação de ambos os compostos, segurança e eficácia de seu uso em humanos.

REFERÊNCIAS

- ARBO, M. D.; PASSOS, C. S.; RATES, S. M. K.; VON POSER, G. L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, ed. 1A, p. 140-149, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/LyGb5WhfnX9nNM87nGJ535H/?lang=pt&format=pdf>>.
- BARBOSA, V. S. N.; GOMES, J. S.; PALMA, D. C. A. Dislipidemia em Pacientes com Diabetes tipo 2. **Saúde e Pesquisa**, DOI: <http://dx.doi.org/10.177651/1983-1870.2017v10n3p579-585>.
- BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). **Dia Mundial da Saúde 2016**, OMS lança seu primeiro relatório global sobre Diabetes. 2016.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica – DBCA**. Brasília, DF, 2013.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2016**: Brasília: Editora MS, 2017. P. 160. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/02/vigitel-brasil-2016.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2020.
- FERNANDES, B. F.; GONÇALVES, H. R.; GUIMARÃES, M. R.; ALVES, A. A.; BIESKE, I. G. C. Estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de saponinas e sua importância medicinal, **SAJES – Revista da Saúde da AJES**, v. 5, n. 9, p. 16-22, 2019.
- CARVALHO, C. J. S.; SANTOS, I. O. The use of phytotherapes in the treatment of rheumatic diseases and diabetes. **Revista PubSaude**. p. 6-157, 2021.
- CARVALHO, M. G.; OLIVEIRA, L. F.; COSTA, P. M.; RUMJANEK, V. M. Chromones from *Licania arianae* (Chrysobalanaceae), **Natural Product Research**, v. 19, n. 1, p. 7-12, 2005.
- CHAUHAN, A.; SHARMA, P. K.; SRIVASTAVA, P.; KUMAR, N.; DUDHE, R. Plants having potential antidiabetic activity: a review. **Der Pharmacia Lettre**, v. 2, n. 3, p. 369-387, 2010.
- COQUEIRO, D. P.; BUENO, P. C. S.; GUIGUER, E. L.; BARBALHO, S. M.; SOUZA, M. S. S.; ARAÚJO, A. C.; TORRES, C. S.; SCACCO, G.; TIVERON, A. M.; COSTA, J. M.; VANZO, L. A.; SILVA, L. O.; GIL, M. S.; ABIB, M. D.; ROSSI, P. B. R.; OZI, R. F.; ABIB, T. D.; GONÇALVES, U. M. Efeitos do chá de orégano (*Origanum vulgare*) no perfil bioquímico de ratos *Wistar*. **Scientia Medica**, v. 22, p. 191-196, 2012.
- COUSTAN, D. R. Gestational Diabetes mellitus. **Clinical Chemistry**, v. 59, p. 1310-1321, 2013.
- DAVIS, S. N. Insulina, Agentes hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino. **In: As bases farmacológicas da terapêutica**. 1º ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-hill

Interamericana do Brasil, p. 1848, 2006.

DEWICK, P. M. **The Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids**, ed. 3, 2009.

DIABETES: 2013-2014. São Paulo: AC Farmacêutica, 2014. p. 382. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/publico/images/pdf/diretrizes-sbd.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

FARIA, E. C.; DALPINO, F. B.; TAKATA. Lípidos e lipoproteínas séricos em crianças e adolescentes ambulatoriais de um hospital universitário público. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 26, ed. 1, p. 54-58, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rpp/a/3jhFRyRbjQH3vg7c8mVs5hx/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2020.

FARKAS, J.; MOHÁCSI-FARKAS, C. In: MOTAJERMI, Y. (ed). Ed. 1ª. Safety of foods and beverages: spices and seasonings. **Encyclopedia of Food Safety**. V. 3: Foods, Materials, Technologies and Risks. Elsevier, p. 324-330, 2014.

FEDERATION, Internacional Diabetes. **IDF diabetes atlas 8th edition**. International Diabetes Federation, p. 905-911, 2017.

FELIPE, C. F. B.; ALBUQUERQUEA, A. M. S.; PONTES, J. L. X.; MELO, J. I. V.; RODRIGUES, T. C. M. L.; SOUSA, A. M. P.; MONTEIRO, A. B.; RIBEIRO, A. R. S.; LOPES, J. P.; MENEZES, I. R.; ALMEIDA, R. N. Comparative study of alpha- and beta-pinene effect on PTZ-induced convulsions in mice. **Societ e Francaise de Pharmacologie et de Therapeutique Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 2, p. 181-190, 2019.

FILHO, B. M.; SOUSA, A. C. S.; ISSA, A. F. C.; NASCIMENTO, B. R.; FILHO, H. C.; VIEIRA, M. L. C. Diretriz Brasileira de Reabilitação Cardiovascular – 2020, **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 114, n. 5. P. 943-987, 2020.

GARCIA, F. V.; COUTINHO, L. B.; OLIVEIRA, M. C. Biochemical and Immunological interaction between diabetes mellitus and periodontal diseases in orthodontics. **Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia**. v. 51, n. 1, p. 75-88, 2021.

GLEW, R. A.; CRABB, D. W. Interrelações metabólicas. In: DEVLIN, T.M.; MICHELACCI, Y.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. São Paulo: Editora Blücher, p. 829-869, 2007.

GLEW, R. A.; CRABB, D. W. Interrelações metabólicas. In: DEVLIN, T. M.; MICHELACCI, GOMES, R. J.; LEME, J. A. C. A.; MELLO, M. A. R.; LUCIANO, E.; CAETANO, F. H. Efeitos de treinamento de natação em aspectos metabólicos e morfológicos de ratos diabéticos. **Motriz**, v. 14, p. 320-328, 2008.

GROSSI, S. A. A; CIANCIARULHO, T. I; MANNA, T. D. Caracterização dos perfis glicêmicos domiciliares como estratégia para os ajustes insulino-terápicos em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 37, ed. 1, p. 62-71, 2003. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/reusp/a/Y9SHgcDT8RVNbh8mjLMpCC/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2020.

GUIMARÃES, J. M. M.; ARAGÃO, E. S.; GALDINO, F. S. S.; ALMEIDA, B. A.; SILVA, S. A. L. S. Paradigmas e trajetórias tecnológicas em saúde: desafios da inovação no cuidado da diabetes. **Saúde Debate**, v. 42, número especial 2, p. 218-232, 2018.

HABER, E. P.; CURI, R.; CARVALHO, C. R. O.; CARPINELLI, A. R. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 45, ed. 3, 2001. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abem/a/fgttzMVj8xwKtfSVGwq4qKC/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

HARACH, T.; APRIKIAN, O.; MONNARD, I.; MOULIN, J.; MEMBREZ, M.; BÉOLOR, J. C.; DARIMONT, C. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract limits weight gain and liver steatosis in mice fed a high-fat diet. **PlantaMed**, v. 76, p. 566-571, 2010.

KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. L. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 32-50, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/advances/article/2/1/32/4591639>>. Acesso em: 12 abr. 2020.

KIM, D. S.; LEE, H. J.; JEON, Y. D.; HAN, Y. H.; KEE, J. Y.; KIM, H. J.; SHIN, H. J.; KANG, J.; LEE, B. S.; KIM, S. H. Alfa-pineno exibe atividade anti-inflamatória através da supressão de MAPKs e da via NF-kappaB em macrófagos peritoneais de camundongos. **Journal Chinese Medica**, v. 43, p. 731-742, 2015.

KRIVORUCHKO, A.; NIELSEN, J. Production of natural products through metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 35, p. 7, 2014.

LEE, H. M.; WOO, M.; KIM, J. S. NOH, Y. O. Song, Antioxidative and cholesterol-lowering effects of lemon essential oil in hypercholesterolemia-induced rabbits, **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 23, n. 1, p. 8-14, 2018.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 216-226, 2008.

LERCO, M. M.; SPADELA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANE, C. R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela Aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, ed. 2, p. 132-142, 2003. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/acb/a/JKJrFGbnbYdG8gjBbHm5kZg/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2020.

LIMA, L. M.; CARVALHO, M. G.; SOUSA, M. L. Índice Apo B/Apo A-I e Predição de Risco Cardiovascular Apo B/Apo A-I Ratio and Cardiovascular Risk Prediction. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 88, n. 6, p. 187-190, 2007.

LINO, C. S.; DIÓGENES, J. P. L.; PEREIRA, B. A.; FARIA, R. A. P. G.; ANDRADE NETO, M.; ALVES, R. S.; QUEIROZ, M. G. R.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats, **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 125-127, 2004.

LORENA, O.; FELIPE JULIANO, L. Bicas. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova Escola**. v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

LUCCHESIAN, F. N. T.; CASSETTARI, L. L.; MARQUES, S. F. G.; SPADELLA, S. T. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, p. 502-508, 2015.

MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product and evaluating. In: Wasner H, Walf LP, eds. **Natural products and plant drugs with pharmacological biological or terapeutical activity**. Berlin: Spring Verlag, 1983.

MANDAL, A.; DAS, V.; GHOSH, P.; GHOSH, S. Anti-diabetic Effect of Friedelan Triterpenoids in Streptozotocin Induced Diabetic Rat. **Natural Products Communications**, v. 10, p. 1683-1686, 2015.

MERCIER, B.; PROST, J.; PROST, M. The essential oil of Turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes). *Int. J. Occup. Medicine Environmental Health*, 2009. DOI: 10.2478 / v10001-009-0032-5.

MERZOUK, S. A.; HICHAMI, A.; SARI, S.; MADANI HABANE, S. N.; KHAN, N. A. Impaired oxidant/antioxidant status and LDL fatty acid composition are associated with increased susceptibility to peroxidation of LDL in diabetic patients. **General Physiology and Biophysics**, v. 23, p. 387-399, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério Da Saúde Secretaria De Ciência, Tecnologia, Inovação E Insumos Estratégicos Portaria Sctie/Ms N° 54**, De 11 De Novembro De 2022.

MORO, E.; GALINA, P.; PAIS, M.; CAZOLATO, G.; ALESSANDRINE, P.; BITTOLO-BOM, G. Hipertriglyceridemia is associated with increased insulin resistance in subjects with normal glucose tolerance: evolution in large cohort of subjects assessed with the 1999 World Health Organization criteria for classification of diabetes. **Metabolism**, v. 52, n. 5, p. 616-619, 2003.

MORRIS, A. D. The Reality of type 2 diabetes treatment today. **International Journal of Clinical Practice Supplement**, v. 121, p. 32-35, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11594243/>>. Acesso em: 12 mar. 2020.

NAM, S.-Y.; CHUNG, C.-K.; SEO, J.-H.; RAH, S.-Y.; KIM, H.-M.; JEONG, H.-J. A eficácia terapêutica do α -pineno em um modelo experimental de camundongo de rinite alérgica. **International Immunofarmacology**, v. 23, p. 273-282, 2014.

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. 17th December, 2001.

OLIVEIRA, J. E. P.; VENCIO, S. (org.). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. São Paulo: Editora Clannad, 2017. p. 383. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2020.

OLIVEIRA, J. E. P.; VÊNICO, S. (org.). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2014. p.382. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/publico/images/pdf/diretrizes-sbd.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

PEREIRA, R. A relação entre Dislipidemia e Diabetes Mellitus tipo 2. **Cadernos UniFOA**, v. 17, dez 2011. Disponível em: <<https://moodlead.unifoa.edu.br/revistas/index.php/cadernos/article/viewFile/1087/938>>. Acesso em: 10 abr. 2020.

PEREIRA, J. C.; MARTINS, A. B.; ROCHA, M. C. F.; JÚNIOR, S. M. C.; FEITOSA, C. M. Espécies medicinais do Brasil com potencial anti-inflamatório ou antioxidante: Uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, e10310716196, 2021.

PORTEA, A.; LUCIANA, H.; PORTEB, M.; OLIVEIRA, L. M. Cromatografia Gasosa Quiral na Resolução de Enantiômeros Envolvidos em Flavours de Frutas. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1670-1679, 2014.

ROBERT D. E.; RAFIEIAN-KOPAEI, S. M. The history and ups and downs of herbal medicines usage. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2014.
RODRIGUEZ LAY, G. Insulinoterapia. **Revista Médica Herediana**, v. 14, n. 3, p. 140-144, 2003.

ROGLIC, G.; UNWIN, N. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, p. 15-19, 2010.

RUFINO, A. T.; RIBEIRO, M.; JUDAS, F.; SALGUEIRO, L.; LOPES, M. C.; CAVALEIRO, C.; MENDES, A. F. Anti-inflammatory and chondroprotective activity of (+)alfa pinene: structural and enantiomeric selectivity. **Journal of Natural Products**, v. 28, p. 264-269, 2014.

SALEHI, B.; UPADHYAY, S.; ERDOGAN ORHAN, I.; KUMAR JUGRAN, A.; JAYAWEERA, S.; A. DIAS, D.; SHAROPOV, F.; TAHERI, Y.; MARTINS, N.; BAGHALPOUR, N.; C. CHO, W.; SHARIFI-RAD, J. Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature. **Biomolecules**, v. 9, p. 738, 2019.

SANTOS, A. G.; ARRUDA, P. N. O.; BRASIL, M. C. O.; LACERDA, G. A. Teor do óleo foliar de assa-peixe (*vernonanthura brasiliensis* (L.) h.rob.) nativo da região norte de Minas Gerais. **Revista Bionorte**, v. 6, n. 1, 2017.

SANTOS, E. S.; COELHO, G. L. A.; LOULA, Y. K. S.; LANDIM, B. L. S.; LIMA, C. N. F.; MACHADO, S. T. S.; LOPES, M. J. P.; GOMES, A. D. S.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; KIM, B.; FELIPE, C. F. B.; NEVES, S. A.; KERNTOPF, M.R. Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Anti-Inflammatory Effects of Beta-Pinene in Diabetic Rats. **Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2022, 2022.

SCHAAN, B. D. A.; HARZHEIM, E.; GUS, I. Perfil de risco cardíaco no diabetes mellitus e na glicemia de jejum alterada. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, ed. 4, p. 529-536, 2004. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsp/a/HNd393MQmZTrRC3SWMZ6vmb/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 10 abr. 2020.

SCHOFIELD, J. D. Diabetes Dyslipidemia. **Diabetes Ther**, v. 7, p. 203-219, 2016. DOI 10.1007/s13300-016-0167-x. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s13300-016-0167-x.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2020.

SECA, A. M. L. Isômeros: compostos iguais com diferenças. **Uaciência**, 2015.

SEMEDO, M.; LAVRADOR, M. A.; MARGARIDA, M. L.; BRANCO, C.; FIGUEIREDO, I. V.; CABRAL, A. N. As Novas Insulinas: Oportunidades no Tratamento da Diabetes Tipo 1. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v. 13, p.8-18, 2021.

SILVA, A. B.; SILQUEIRA, G. L. D.; VILAS BOAS, T. N.; SANTOS, G. B. B.; REIS, L. F. C.; SALLES, C. B. C.; CERDEIRA, C. D.; MORAIS, G. L. I. Extrato etanólico das folhas de *Raphanus sativus* L. var. oleifera Metzg (nabo forrageiro): efeitos antihiperlipidêmico, antidislipidêmico e antioxidante em ratos com Diabetes Mellitus tipo 1. **Revista Fitos**. v. 13, n. 1, p. 38-48, 2019.

SILVA, A. C. R.; LOPES, P. M.; AZEVEDO, M. M. B.; COSTA, D. C. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. **Molecules**. v. 17, p. 6305-6316, 2012.

SILVA, A. R.; CERDEIRA, C. D.; BRITO, A. R.; SALLES B. C. C.; REVAZI, G. F.; MORAES, G. O. I. Green banana pasta diet prevents oxidative damage in liver and kidney and improves biochemical parameters in type 1 diabetic rats. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 60, ed. 4, p. 355-366, 2016. DOI: 10.1590/2359-3997000000152. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/aem/a/S3nwSNrZrVhwhsbLcHmMJhz/?format=pdf&lang=en>>. Acesso em: 25 mar. 2020.

SILVA, M.; LIMA, W. G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 55, n. 1. Sociedade Brasileira de Diabetes. Clanid editora científica. GESTÃO Biênio 2018-2019, 2011.

SILVA, V. D.; NOGUEIRA, R. M. B. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, p. 9-15, 2015.

SOLOMONS, T. W. G; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 9ª edição, v.1. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

SOUZA, N. P. G.; OLIVEIRA, G. Y. M.; GIRÃO, A. L. A.; SOUZA, L. M.; MANIVA, S. J. C. F.; FREITAS, C. H. A. Conceptions of illness from hypertension and Diabetes Mellitus among a group of hospital inpatients. **Rev. Open Journal Systems**, v. 23, p.1, 2015.

SZKUDELSKI LUCCHESIAN, F. N. T.; CASSETTARI, L. L.; MARQUES, S. F. G.; SPADELLA, S. T. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, p. 502-508, 2015.

TECHIO, P. X.; BELO, M. A. A. Estrutura Química e Interação Molecular Farmacodinâmica entre Salicilatos e Oxicans. **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n.14, 2012.

VALDES, M.; CALZADA, F.; MENDIETA-WEJEBE, J. Structure–Activity Relationship Study of Acyclic Terpenes in Blood Glucose Levels: Potential α -Glucosidase and Sodium Glucose Cotransporter (SGLT-1) Inhibitors. **Molecules**, v. 24, p. 4020, 2019.

VERICEL, E.; JANUEL, C. CARRERAS, M; MOULIN, P. Diabetes Patients without Vascular Complications Display Enhanced Basal Platelet Activation and Decreased Antioxidante Status. **Diabetes**, v. 53, p. 1046-1051, abr. 2004. Disponível em: <https://diabetes.diabetesjournals.org/content/53/4/1046>. Acesso em: 05 mar. 2020.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageniin-induced. Edema in hind paw of therat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

Y. M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. São Paulo: Editora Blücher, p. 829-869, 2007.

YANG, Z.; WU, N.; ZU, Y.; FU, Y. Comparative anti-infectious bronchitis virus (IBV) activityof (α)-pinene: effect on nucleocapsid (N) protein. **Molecules**, v. 16, p. 1044-1054, 2011.

ZANOELLO, A. M.; MELAZZO-MAZZANTI, C.; KERPEL GINDRI, J.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; CECIM, M. Efeito Protetor do Syzygium cumini contra Diabetes Mellitus induzido por Aloxano em Ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, ed.1, p. 31-36, 2002.

ZHOU, J. Y.; TANG, F. D.; MAO, G. G.; BIAN, R. L. Efeito do alfa-pineno na translocação nuclear deNF-kappa B em células THP-1. **Acta Pharmacology**, v. 24, p. 480-484, 2004.