

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde**

**POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE DO EXTRATO  
AQUOSO DE QUIABO (*Abelmoschus esculentus L.*) EM  
LIPOSSOMAS EM UM MODELO DE RESISTÊNCIA À  
INSULINA**

**SUÉLLEN ALVES COSTA**

**Sinop, Mato Grosso**  
**Agosto, 2022**

**SUÉLLEN ALVES COSTA**

**POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE DO EXTRATO  
AQUOSO DE QUIABO (*Abelmoschus esculentus L.*) EM  
LIPOSSOMAS EM UM MODELO DE RESISTÊNCIA À  
INSULINA**

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cezar de Oliveira  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Stela Regina Ferrarini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário de Sinop, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Saúde

**Sinop, Mato Grosso  
Agosto, 2022**

### **Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.**

C837p Costa, Suéllen Alves.

Potencial hipoglicemiante do extrato aquoso de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) em lipossomas em um modelo de resistência à insulina [recurso eletrônico] / Suéllen Alves Costa. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 64 f., il. color., pdf). -- 2022.

Orientador: Júlio Cezar de Oliveira.

Coorientadora: Stela Regina Ferrarini.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde, Sinop, 2022.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

1. Hipoglicemiante. 2. Alimento funcional. 3. Nanossistemas. 4. Resistência à insulina. I. Oliveira, Júlio Cezar de, *orientador*. II. Ferrarini,

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM SAÚDE**  
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: "Potencial hipoglicemiante do extrato aquoso de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) em lipossomas em um modelo de resistência à insulina"**

AUTOR (A): MESTRANDO (A) **Suéllen Alves Costa**

Dissertação defendida e aprovada em **25/08/2022**.

**COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

1. Doutor(a) **Júlio Cezar de Oliveira** (Presidente Banca / Orientador)  
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso
2. Pós-Doutor(a) **Andressa Bernardi** (Examinador Externo)  
INSTITUIÇÃO: Fundação Oswaldo Cruz/Rio de Janeiro
3. Doutor(a) **Veridiana Mota Moreira Lima** (Examinador Externo)  
INSTITUIÇÃO: Universidade Estadual do Mato Grosso
4. Doutor(a) **Michel Leandro de Campos** (Examinador Suplente)  
INSTITUIÇÃO: Indiana University (USA)
5. Doutor(a) **Renato Chaves Souto Branco** (Examinador Suplente)  
INSTITUIÇÃO: Universidade Federal de Mato Grosso

**Sinop, 25/08/2022.**



Documento assinado eletronicamente por **JULIO CEZAR DE OLIVEIRA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 28/08/2022, às 11:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Veridiana Mota Moreira Lima, Usuário Externo**, em 30/08/2022, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andressa Bernardi registrado(a) civilmente como Andressa, Usuário Externo**, em 20/09/2022, às 09:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufmt.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5038247** e o código CRC **3FE72B92**.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me guiar em todos os momentos e me encorajam a prosseguir

Aos meus pais, **Elias e Vilma**, que nunca mediram esforços para me apoiar e me ensinar o caminho do bem. Sem vocês, eu não chegaria até aqui. Muito obrigada por tudo! É muito bom saber que posso contar com vocês em todos os momentos. Amo vocês!

Ao meu orientador, **Professor Júlio Cezar de Oliveira**, pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pela confiança e por me atender com paciência todas as vezes que precisei. Agradeço por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável, e por me guiar a pós-graduação. Muito obrigada por tudo!

A minha coorientadora, professora **Stela Regina Ferrarini**, por toda a ajuda durante a realização deste trabalho. Sua contribuição foi essencial para a concretização de todas as pesquisas desenvolvidas neste trabalho de pesquisa. Muito obrigada!

Aos professores do programa de pós-graduação em Ciências em Saúde-UFMT Sinop, por todo conhecimento transmitido durante o curso de Mestrado.

Aos amigos do laboratório, **Camila Luiza Ricken, Ester Vieira Alves e Ingridys Borkenhagen, Adriel Felipe e João Jesus** que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, levarei vocês o resto da vida. Muito Obrigada!

À amiga **Karoline da Silva Paiva**, que fiz durante a graduação e embarcou comigo no sonho da pós-graduação. Obrigada por todo apoio ao longo desta caminhada. Dividimos os sonhos e as dificuldades juntas. Ter você por perto foi essencial para que eu conseguisse seguir em frente. Muito obrigada por tudo!

À amiga **Juliandra Spagnol Bonache e Ana Lis Cabral**, obrigada por todo apoio ao longo desta caminhada. Dividimos os sonhos e as dificuldades juntas. É muito bom saber que tenho vocês sempre comigo.

Ao **Gabriel Martins de Paula** pela colaboração nas etapas laboratoriais deste trabalho e por todos os momentos felizes compartilhados e também pelo apoio nos momentos difíceis. Muito Obrigada!

À **Dayane Scherrer Rigato, Leidiane Maximiano, Bruna Bento, Regiane Maximiano e Clara Valentina** que mesmo com a distância vocês sempre estiveram presentes e me ajudaram durante o Mestrado, com palavras acolhedoras.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

Devido sua importância terapêutica como agente anti-inflamatório, antialérgico, imunossupressor, dentre outros, os glicocorticoides são amplamente usados na clínica médica; contudo, o uso crônico desse hormônio tem sido associado ao desenvolvimento de resistência periférica à insulina. Por outro lado, alimentos funcionais como o quiabo (*Abelmoschus esculentus L.*) aparecem como compostos bioativos promissores no combate às doenças metabólicas, tais como o diabetes mellitus tipo 2. Nesse trabalho objetivamos caracterizar (quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH) lipossomas contendo quiabo e testar seu efeito hipoglicemiante em um modelo de resistência à insulina. Aos 60 dias de vida, ratos Wistar, machos e fêmeas, receberam uma injeção diária de dexametasona (DEX; 1mg/kg de peso corporal, pc, intraperitoneal, i.p.) por 10 dias, enquanto os ratos controles receberam solução salina (NaCl, 0,9% i.p., grupo CONT). Aos 65 dias de vida, parte dos ratos DEX foram tratados, via gavagem por cinco dias consecutivos, com lipossoma contendo quiabo (1,5mg/kg de pc, grupo DEX-LipoQ) ou extrato de quiabo na forma livre (200mg/kg de pc, grupo DEX-ExtrL), como controle negativo, ratos DEX receberam lipossoma branco (lipossoma sem quiabo, grupo DEX-LipoB). Durante o tratamento, avaliou-se a glicemia basal, massa ponderal, ingestão hídrica e alimentar. Ao término, avaliou-se a homeostase glicêmica, parâmetros biométricos e perfil lipídico. Quanto a caracterização dos lipossomas, desenvolveu-se uma estrutura de diâmetro médio de 280nm, potencial zeta  $-31,46 \pm 1,48$  e pH 6,8. Em relação aos ratos CONT, os ratos DEX, de ambos os sexos, apresentaram-se hiperglicêmicos, intolerantes à glicose e resistentes à insulina ( $P < 0,05$ ). De modo similar, os ratos DEX-LipoB, de ambos os sexos, também se apresentaram hiperglicêmicos, intolerantes à glicose e resistentes à insulina em relação aos ratos CONT ( $P < 0,05$ ), não diferindo estatisticamente dos ratos DEX ( $P > 0,05$ ). Os ratos DEX-LipoQ e DEX-ExtrL, em ambos os sexos, apresentaram valores de glicemia basal, tolerância à glicose e responsividade à inulina similares aos observados nos ratos CONT ( $P > 0,05$ ), porém significativamente diferente daqueles observados nos ratos DEX ( $P < 0,05$ ). Quanto ao dimorfismo sexual, a homeostase glicêmica dos machos mostrou-se mais vulnerável ao efeito da dexametasona, bem como apresentou melhora proeminente frente ao efeito do quiabo; por outro lado, a sensibilidade periférica à insulina, em fêmeas, teve melhora com magnitude cerca de 40-vezes maior do que em machos. Em síntese, o tratamento com lipossoma contendo quiabo mesmo em concentração menor, foi eficaz em reverter o quadro de intolerância à glicose e resistência à insulina, sendo este resultado também observado no tratamento com quiabo na sua forma livre, mas que a eficácia só foi adquirida mediante uma concentração maior do extrato do quiabo. Além disso, considerando-se a dose aplicada, o lipossoma contendo quiabo foi mais eficaz em promover o controle da glicemia nos animais hiperglicêmicos em ambos os sexos do que o quiabo em forma de extrato livre.

**Palavras-chave:** Hipoglicemiante; alimento funcional; nanossistemas; resistência à insulina.

## ABSTRAC

Given its therapeutic importance as an anti-inflammatory, antiallergic, immunosuppressive agent, among others, glucocorticoids are widely used in clinical medicine; however, the chronic use of this hormone has been associated with the development of peripheral insulin resistance. On the other hand, functional foods such as okra (*Abelmoschus esculentus L.*) appear as promising bioactive compounds in the fight against metabolic diseases, such as type 2 diabetes mellitus. In this work we aim to characterize (in terms of mean diameter, polydispersity index zeta potential and pH) liposomes containing okra, and to test their hypoglycemic effect in an insulin resistance rat-model. At 60 days-old, male and female Wistar rats underwent a daily injection of dexamethasone (DEX; 1mg/kg body weight, bw, intraperitoneal, i.p.) for 10 days, while control rats received saline solution (NaCl, 0.9% i.p., CONT group). At 65 days-old, a batch of DEX rats were treated, via gavage for five consecutive days, with a liposome containing okra (1.5mg/kg bw, DEX-LipoQ group) or okra extract in the free form (200mg/kg of pc, DEX-ExtrL group), as a negative control, DEX rats received white liposome (liposome without okra, DEX-LipoB group). During treatment, baseline blood glucose, weight, water, and food intake were evaluated. At the end, glycemic homeostasis and biometric parameters were evaluated. The characterization of the developed liposomes shows a structure with an average diameter of 280nm, zeta potential  $-31.46 \pm 1.48$  and 6.8 as pH. In relation to CONT rats, DEX rats, in both sexes were hyperglycemic, glucose intolerant and insulin resistant ( $P < 0.05$ ). Similarly, DEX-LipoB rats, in both sexes, were hyperglycemic, glucose intolerant and insulin resistant compared to CONT rats ( $P < 0.05$ ), and not statistically different of the DEX rats ( $P > 0.05$ ). DEX-LipoQ and DEX-ExtrL rats, in both sexes, presented basal glycemia, glucose tolerance and insulin responsiveness like those observed in CONT rats ( $P > 0.05$ ), but significantly different of those observed in DEX rats ( $P < 0.05$ ). Regarding sexual dimorphism, glycemic homeostasis of males was more vulnerable to the effect of dexamethasone, as well as showing a more prominent improvement against the effect of okra; on the other hand, peripheral insulin sensitivity in females improved with magnitude about of 40-fold greater than in males. In summary, the treatment with okra, even in a smaller concentration, was effective on reversing glucose intolerance and insulin resistance, which was also observed in rats treated with okra in a free form, but only by using a higher okra-extract concentration. Furthermore, considering the applied dose, liposomes containing okra was more effective in promoting glycemic control in hyperglycemic animals, in both sexes, than it was using okra-extract in free form.

**Keywords:** Hypoglycemic; functional food; nanosystems; insulin resistance.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1. DIABETES MELLITUS TIPO 2</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2. Modelo de resistência à insulina a partir da administração de dexametasona</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3. Vias de sinalização e resistência à ação da insulina</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4. Moléculas bioativas na prevenção do DMT2</b> .....	<b>14</b>
<b>1.5. Nanotecnologia na terapêutica para o DMT2</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. Obtenção do extrato de quiabo</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2. Desenvolvimento e caracterização dos lipossomas</b> .....	<b>19</b>
<i>3.2.1. Desenvolvimento dos lipossomas</i> .....	<b>19</b>
<i>3.2.2. Caracterização físico-química dos lipossomas desenvolvidos</i> .....	<b>19</b>
<b>3.3. Modelo experimental</b> .....	<b>20</b>
<b>3.4. Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica</b> .....	<b>22</b>
<b>3.5. Avaliação da ingestão alimentar e hídrica e composição corporal dos animais</b> .....	<b>23</b>
<b>3.6. Análise estatística</b> .....	<b>23</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1. Caracterização físico-química do extrato do quiabo</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2. Caracterização dos lipossomas desenvolvidos</b> .....	<b>24</b>
<b>4.3. Rastreamento de 24 horas em relação à dose-resposta do extrato do quiabo em lipossoma</b> .....	<b>24</b>
<b>4.4. Homeostase glicêmica durante o período de administração da dexametasona e tratamento com quiabo em diferentes formulações</b> .....	<b>25</b>
<b>4.5. Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica durante o ipGTT</b> .....	<b>27</b>
<b>4.6. Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica durante o ipITT</b> .....	<b>29</b>
<b>4.7. Peso corporal, ingestão alimentar e consumo hídrico dos animais</b> .....	<b>31</b>
<b>4.8. Avaliação da composição corporal</b> .....	<b>35</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>

<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>
<b>8. PATENTE .....</b>	<b>53</b>
<b>8.1 Título .....</b>	<b>53</b>
<b>8.2 Resumo .....</b>	<b>53</b>
<b>8.3 Relatório descritivo .....</b>	<b>53</b>
<b>8.3 Referências bibliográficas.....</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DIABETES MELLITUS TIPO 2

O diabetes é uma doença metabólica crônica caracterizada por níveis elevados de glicose sanguínea. Disfunção esta que com o passar do tempo promove sérios danos a órgãos e tecidos importantes do corpo, tais como o coração, vasos sanguíneos, olhos, rins, nervos e pâncreas. Dentre as formas do diabetes, o diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) é a forma mais comum, a qual é geralmente observada em adultos. O DMT2 ocorre quando os tecidos periféricos, em especial o tecido adiposo branco e músculo esquelético, se tornam resistentes à ação do hormônio insulina, ou quando as células  $\beta$ -pancreáticas não produzem a insulina em quantidades suficientes para atender a demanda fisiológica de captação da glicose sanguínea (Xu, Liu *et al.*, 2018).

Nas últimas três décadas, a prevalência de DMT2 aumentou dramaticamente em todo o mundo, afetando países de todos os níveis econômicos (WHO, 2021). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 422 milhões de adultos são diabéticos no mundo, sendo que entre estes cerca de 90% são portadores do DMT2; cerca de 80% vivem em países de renda baixa e/ou média, e aproximadamente 1,6 milhões de mortes, ao ano no mundo, são atribuídas diretamente ao diabetes (WHO, 2021). No Brasil, de acordo com o Atlas da Diabetes, nosso país é o 5º país no mundo com mais diabéticos, 16,8 milhões, sendo que este número tende a aumentar em mais de 150% até 2035 (SBCBM, 2019). Nesta mesma linha, estimativa global aponta que o número de diabéticos no mundo aumentará de 422 para 570 milhões em 2030 e para 700 milhões em 2045. Além disso, o impacto econômico para tratar essa patologia, no Brasil, chega a custos anuais que ultrapassam a casa dos US\$ 2 bilhões, o que seria equivalente a mais de R\$ 10 bilhões (WHO, 2021).

O DMT2, também chamado diabetes não insulino dependente ou diabetes do adulto é um quadro clínico que ocorre geralmente em pessoas obesas, em virtude de hábitos alimentares irregulares, predisposição genética e/ou sedentarismo. Nesse tipo de diabetes, é comum se encontrar a presença de níveis elevados de insulina, porém sua ação é dificultada por ação de moléculas, como por exemplo citocinas produzidas em consequência de outras disfunções metabólicas, levando à resistência insulínica, caracterizando um estado de hiperglicemia (Erfani Majd, Tabandeh *et al.*, 2018).

Neste contexto, modelos experimentais com animais roedores na pesquisa do diabetes tipo 1 e 2 são muito comuns e são classificados em duas classes (1) modelos genéticos ou

induzidos espontaneamente e (2) modelos não genéticos ou induzidos experimentalmente. Os modelos não genéticos ou induzidos experimentalmente são mais aplicados e populares quando comparado aos modelos genéticos, justamente por serem mais acessíveis, proporcionar uma facilidade na indução do diabetes além da facilidade em manter o estado diabético dos animais. Nos últimos anos alguns modelos não genéticos foram desenvolvidos para a pesquisa do diabetes, dentre eles estão os modelos alimentados com dieta rica em gordura (Nagy e Einwallner, 2018; Daryabor, Kabelitz *et al.*, 2019), modelos alimentados com frutose (Riviere, Soubeyre *et al.*, 2016; Namekawa, Takagi *et al.*, 2017), dentre outros, tais como os modelos induzidos pela dexametasona (Rafacho, Marroqui *et al.*, 2010).

O efeito negativo do uso crônico de glicocorticoides sintéticos sobre a homeostase da glicose, bem como sobre a função das ilhotas pancreáticas, levou ao desenvolvimento do modelo bastante conhecido, o qual se encaixa na classe dos não genéticos ou induzidos experimentalmente. Este modelo tem sido utilizado na pesquisa do DMT2, com o intuito de esclarecer os efeitos diretos na biossíntese ou liberação de insulina, bem como nas vias de sinalização da insulina, uma vez que estes fármacos, de maneira geral, apresentam efeitos adversos que afetam o metabolismo dos carboidratos, reduzem a captação e utilização da glicose em tecidos periféricos, aumentando a gliconeogênese e o catabolismo proteico (Radhakutty e Burt, 2018).

## **1.2. Modelo de resistência à insulina a partir da administração de dexametasona**

Os glicocorticoides são hormônios esteroides produzidos no córtex da glândula adrenal, os quais atuam em vários processos fisiológicos, desde agentes reguladores da homeostase glicêmica através da produção/liberação de glicose hepática, secreção de insulina por células  $\beta$ -pancreáticas, até reguladores da transcrição gênica envolvida em diversos outros processos metabólicos (Moisiadis e Matthews, 2014; Facchi, Lima *et al.*, 2020). Na terapêutica, os glicocorticoides sintéticos como a dexametasona atuam como importante agente anti-inflamatório tanto na fase inicial quanto crônica da inflamação. Porém, o uso crônico do mesmo está frequentemente associado a distúrbios funcionais tanto na secreção de insulina quanto na ação periférica tecidual da insulina (Jeong, Oh *et al.*, 2001).

Como já bem descrito, o efeito da dexametasona sobre o metabolismo da glicose depende da dose e do tempo de exposição do indivíduo ao glicocorticoide, ou seja, administrados por longo prazo e/ou em doses suprafarmacológicas um dos efeitos adversos

mais importantes observados nesse caso é a resistência periférica à insulina (Rafacho, Marroqui *et al.*, 2010).

Nesse modelo experimental, além do que já se conhece sobre os efeitos diretos dos glicocorticoides levando a uma condição de resistência periférica à insulina (Rafacho, Ortsater *et al.*, 2014), há evidências que os glicocorticoides atuam causando um estímulo na produção de glicose hepática, por sua vez, ao estimular a gliconeogênese hepática também deprime a síntese de proteína no músculo, sendo este um dos principais eventos bioquímicos observados (Dabrowski e Majdan, 2016). Além disso, também se sabe que pode ocorrer uma redução significativa na densidade do receptor de insulina em hepatócitos após tratamento crônico com dexametasona. Também foi demonstrado haver redução no nível de fosforilação dos substratos tipo 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) e da proteína quinase B (PKB, também conhecida como Akt) no tecido adiposo de ratos machos, após tratados com dexametasona (Caperuto, Anhe *et al.*, 2006). Em resposta a resistência insulínica induzida por glicocorticoides, o pâncreas endócrino sofre alterações compensatórias, as quais modulam a função e a massa das células  $\beta$ , acarretando em maior secreção e hiperinsulinemia, o que tem sido relacionado com a formação de agregados amiloides tóxicos que podem induzir a apoptose de células  $\beta$ -pancreáticas (Westermarck, Andersson *et al.*, 2011).

### **1.3. Vias de sinalização e resistência à ação da insulina**

A insulina é um hormônio peptídico produzido pelas células  $\beta$ -pancreáticas, e liberada na corrente sanguínea em resposta a altos níveis glicêmicos, atuando como o principal sinalizador responsável por fazer o controle dos níveis de glicose no sangue, no entanto, a insuficiência da capacidade das células  $\beta$  (disfunção das células  $\beta$  e/ou massa insuficiente das células  $\beta$ ) contribui para a patogênese tanto do diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) quanto do DMT2 (Haeusler, McGraw *et al.*, 2018).

Quanto a sinalização da insulina, a mesma se dá através de sua ligação ao seu receptor (IR) transmembrana, na subunidade alfa, situada na superfície externa da membrana celular, o qual por ser um receptor do tipo tirosina quinase, em seguida à ligação da insulina, promove autofosforilação da subunidade beta, situada no lado interno da membrana celular, com isso ativando outras duas vias de sinalização importantes, a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e a via da proteína quinase ativada por mitógeno, MAPK/ERK (Hojlund, 2014).

Indivíduos com resistência à insulina carregam pelo menos o comprometimento de uma dessas vias, já que a resistência à insulina, em tecidos periféricos (tecido adiposo branco,

fígado e músculo esquelético), basicamente ocorre devido a modificações moleculares e alterações do grau de fosforilação de proteínas envolvidas com o IR e/ou com o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1R), ao qual a insulina também se liga (Ogawa e Kasuga, 2006). As proteínas localizadas na via de sinalização envolvendo um destes receptores, IR/IGF1R, podem ser fosforiladas em resíduos de tirosina, especialmente os IRS1 e IRS2, sendo que o produto de fosforilação das proteínas ativadas se liga fortemente à subunidade reguladora, p85, da PI3K (Hojlund, 2014). Esta proteína é um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85), a qual quando fosforilada pelo IRS ativa a subunidade catalítica, de modo que a fosforilação dos sítios de tirosina das proteínas IRS se liga ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI3K, estimulando-a e, assim, ativando o sítio catalítico (p110). A PI3K catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol 3,4 difosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato, PIP3, sendo que a ativação dessa via intracelular é essencial para o transporte de glicose (Yaribeygi, Farrokhi *et al.*, 2019; Hopkins, Goncalves *et al.*, 2020).

Posteriormente ocorre à ativação da proteína serina/treonina quinasse (PKB/Akt), uma das proteínas alvo da PI3K, através da fosforilação em resíduos de serina. A ocupação dos sítios de ligação pelos resíduos de tirosina gera resistência às ações da insulina, tais como o transporte de glicose, a síntese de proteínas, a síntese de glicogênio, bem como a estimulação da produção de óxido nítrico, em tecidos como músculo esquelético, tecido adiposo branco e fígado (De Franca, Meneses-Santos *et al.*, 2018).

Embora existam diversos estudos sobre o desenvolvimento de resistência à insulina em estado crônico, incluindo DMT2 e outros distúrbios, os mecanismos envolvendo essa resistência ainda são incertos. Possivelmente há outros mecanismos dependentes da patologia e mecanismos que podem atuar de forma diferente em tecidos-alvo da insulina. Por exemplo, uma resistência aguda à insulina é dita como diabetes de estresse, sendo observada em lesões e traumas graves, ou seja, ocorrem logo após uma lesão física, ao contrário de outros casos que necessitam de um período maior e frequente de insultos para desenvolver resistência à insulina (Thompson, Kim *et al.*, 2008).

De modo geral, é comum que um indivíduo com DMT2, possua alterações nas vias de sinalização da insulina, tais como redução na expressão e/ou função de IRS1, PI3K, PKB/Akt, assim como no transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), alterações que estão diretamente relacionadas com uma redução na captação de glicose (De Franca, Meneses-Santos *et al.*, 2018) e a síntese de glicogênio (Arner, 2002; Bienso, Ringholm *et al.*, 2012).

Estudos anteriores também abordam que a administração de diferentes doses de dexametasona por 5 dias em ratos adultos induz hiperinsulinemia e resistência à insulina de forma dose-dependente e ação diminuída da insulina periféricamente induz adaptações compensatórias no pâncreas endócrino (Rafacho, Cestari *et al.*, 2009). A maioria dos estudos *in vitro* mostra um efeito negativo dos glicocorticoides na secreção, proliferação e sobrevivência das células  $\beta$ -pancreáticas (Fichna e Fichna, 2017). Outro estudo realizado em ilhotas humanas e com células Min6 (linhagem de células  $\beta$  de camundongo) mostra que a dexametasona ou prednisolona leva a uma diminuição na viabilidade celular, via ativação da p38 MAPK/TXNIP, além disso, também se sabe que a dexametasona induz degradação pós-traducional de GLUT2 e inibição da secreção de insulina em células  $\beta$ -pancreáticas (Gremlich, Roduit *et al.*, 1997; Reich, Tamary *et al.*, 2012). Assim, percebemos que os glicocorticoides interferem na sinalização da insulina e são capazes de modular a sinalização da insulina em nível molecular além de afetar a função das células beta pancreáticas.

#### **1.4. Moléculas bioativas na prevenção do DMT2**

No caso do DMT2, o uso de alternativas terapêuticas, outras tais como o uso de plantas medicinais que proporcionem efeito hipoglicemiante, assim como também redução dos efeitos colaterais e adversos em relação aos fármacos sintéticos é de grande importância para a saúde do paciente acometido com o DMT2 e tem sido de grande importância para tratar diversas doenças (Unuofin e Lebelo, 2020).

Atualmente, o uso das terapias envolvendo plantas medicinais vem trazendo muitas evidências sobre a eficácia destes produtos na prevenção do DMT2, de modo que estudos envolvendo diferentes meios para o tratamento do DMT2 tiveram uma mudança notável entre os medicamentos convencionais e terapias que empregam moléculas bioativas ou fitomoléculas oriundas de fontes naturais (Unuofin e Lebelo, 2020). O potencial terapêutico dos produtos naturais, seu baixo custo e efeitos colaterais mínimos, veem revolucionando e aprimorando o gerenciamento de novos medicamentos (Tiwari, Ahmad *et al.*, 2017). Diante disso, sabemos que o DMT2 é uma patologia passível de prevenção, portanto, reduzir a incidência de novos casos pode ser uma ótima estratégia em minimizar o impacto global dessa fisiopatologia.

Dentre essas plantas medicinais/compostos bioativos, pode-se citar a mangiferina (2- $\beta$ -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona), uma xantona de baixo peso molecular, encontrada principalmente em plantas superiores, tais como a manga. A

magniferina é um composto bioativo que possui potencial terapêutico antioxidante, hipoglicêmico e antidiabético, além de outros efeitos como ação antimicrobiana, antialérgica e imunomoduladora (Imran, Arshad *et al.*, 2017; Aswal, Kumar *et al.*, 2020).

A curcumina, molécula bioativa presente no rizoma da *Curcuma longa* vem sendo bastante estudada atualmente devido seus diferentes efeitos biológicos e farmacológicos anti-hiperglicêmicos e anti-hiperlipidêmico (Oliveira, Monteiro-Alfredo *et al.*, 2020). Em um estudo recente com ratos diabéticos induzidos por streptozotocina, os autores concluíram que a curcumina tem o potencial antidiabético e pode prevenir o desenvolvimento do DMT2, por atuar nas células  $\beta$ -pancreáticas, melhorando sua função secretora, bem como por diminuir a resistência periférica à insulina e reduzir dano hepático (Pivari, Mingione *et al.*, 2019).

Outra planta de importância medicinal é a babosa, pertencente à família Asphodelaceae, espécie *Aloe vera* L. Burm. As Asphodelaceae possuem alcalóides, flavonóides, taninos, fenóis, saponinas, carboidratos, vitaminas e minerais. Recentemente estudos científicos têm dado suporte para a ação antidiabética e antioxidante da babosa (Suksomboon, Poolsup *et al.*, 2016) Se tratando da ação antidiabética em modelo experimental com roedores, o extrato aquoso de *Aloe vera*, via oral, reduziu os níveis glicêmicos de forma significativa, além de promover menores efeitos colaterais comparados a outros fármacos sintéticos (Okyar, Can *et al.*, 2001).

No contexto do uso de plantas medicinais que previnem o DMT2, o quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.), planta da família das Malváceas, que se situa entre as hortícolas de alto valor alimentício, de fácil cultivo e rentável devido sua grande utilidade possui capacidade terapêutica para o DMT2, uma vez que esta planta possui fibras dietéticas e polifenóis em abundância, contribuindo no efeito hipoglicemiante, já que estudos apontam que a fibra alimentar, comum em alimentos funcionais, promove efeitos importantes no controle dos níveis glicêmicos pós prandial (Erfani Majd, Tabandeh *et al.*, 2018). Como previamente demonstrado, em um estudo sobre o uso da porção polar ou fração solúvel em água do extrato de quiabo, quando administrado em ratos, foi possível observar que este ativo permite o controle dos níveis glicêmicos e pode ser uma alternativa para o controle do DMT2 (Khatun, Rahman *et al.*, 2011).

Através dessa abordagem é considerável que pesquisas adicionais que possam contribuir com mais informações sobre o efeito hipoglicemiante do quiabo, por exemplo, por meio da aplicação da nanotecnologia, com o intuito de aumentar a eficácia do tratamento do DMT2 envolvendo plantas medicinais, são de grande relevância (Disanto, Subramanian *et al.*, 2015), uma vez que a maioria dos constituintes biologicamente ativos dos extratos, como

por exemplo, flavonoides e taninos, são altamente solúveis em água, porém com baixa absorção, sendo incapazes de atravessar as membranas lipídicas das células, além de possuírem tamanho molecular excessivamente alto ou serem pouco absorvidos, resultando em perda de biodisponibilidade e eficácia (Bonifácio, Silva, Ramos *et al.*, 2014).

Diante desses obstáculos, tem sido proposto combinar ativos vegetais com nanotecnologia, pois sistemas nanoestruturados podem ser capazes de potencializar a ação de extratos vegetais, reduzindo a dose necessária e efeitos indesejáveis, além de fornecer o constituinte ativo em uma concentração suficiente durante todo o período de tratamento, direcionando-o para o local de ação desejado, uma vez que muitos tratamentos convencionais não proporcionam esses requisitos (Bonifacio, Silva *et al.*, 2014; Abu Lila e Ishida, 2017).

### **1.5. Nanotecnologia na terapêutica para o DMT2**

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que vem sendo estudada como uma ferramenta para a liberação e ação de uma substância ativa, conferindo estabilidade, segurança e eficácia (Patra, Das *et al.*, 2018).

Com base no conhecimento de vários fármacos, óleos e extratos vegetais com propriedade terapêutica, a nanotecnologia está envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica (menores de 1000 nm), que variam desde nanopartículas poliméricas, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões entre outros (Wagner, Dullaart *et al.*, 2006). Entre as vantagens que os nanossistemas podem oferecer destacam-se a promoção do aumento da eficácia terapêutica pela liberação progressiva e controlada do ativo, redução dos níveis de toxicidade por direcionar a molécula ativa a alvos específicos, bem como a manutenção da atividade farmacológica (Mazayen, Ghoneim *et al.*, 2022). A escolha do sistema de liberação do fármaco vai depender das características físico-químicas do fármaco (por exemplo, carga, polimorfismo do fármaco, pKa, hidrofobicidade e tamanho) e do alvo a ser atingido (Almeida, Nag *et al.*, 2020).

Nanoestruturas como os lipossomas são constituídos de compostos biodegradáveis, mostrando estabilidade frente a determinada faixa de pH e temperatura, o que pode ser controlado pela modificação da composição lipídica, interação nos fluidos biológicos, sendo bem recomendados em aplicações clínicas (Bonifacio, Silva *et al.*, 2014).

Os lipossomas são definidos como vesículas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso (Almeida, Nag *et al.*, 2020). São partículas que

possuem afinidade tanto com o óleo quanto com a água, dessa maneira podendo carrear substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as hidrofílicas ficam no compartimento que possui afinidade com água e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana. As vesículas variam de 50 a 500 nm de diâmetro e são fabricados a partir da automontagem de fosfolipídios. Por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicas são altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas (Sala, Diab *et al.*, 2018).

O interesse em comercializar lipossomas como carreadores de fármacos e moléculas bioativas se deve em sua maioria ao seu método fácil de fabricação, a capacidade de encapsular e interagir com as moléculas bioativas independente da sua solubilidade, carga, tamanho e outras características físico-químicas (Almeida, Nag *et al.*, 2020). Um exemplo interessante e atualmente comercializado é o medicamento AmBisome<sup>®</sup> (Anfotericina B lipossomal) utilizado no tratamento da Leishmaniose visceral. A anfotericina B incorporada dentro de lipossomas foi desenvolvida na tentativa de melhorar sua eficácia e tolerabilidade, especialmente no que tange à toxicidade renal. O pequeno tamanho do lipossoma e a interação fármaco-lipossoma fazem com que a molécula permaneça mais tempo em circulação, atingindo níveis plasmáticos elevados de anfotericina B e ampla distribuição pelos tecidos infectados (Stone, Bicanic *et al.*, 2016).

Diante disso, sabemos que até o presente momento, relatos de estudos utilizando a nanotecnologia para associação de substâncias ativas presentes no quiabo são ainda escassos. Portanto buscamos desenvolver e avaliar o efeito hipoglicemiante do extrato aquoso do quiabo em lipossomas em um modelo já bem caracterizado de ratos pré-diabéticos, induzidos pela aplicação suprafisiológica de dexametasona.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito hipoglicemiante do extrato aquoso de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) em lipossoma em um modelo de resistência à insulina, bem como avaliar a responsividade sexo específica.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Desenvolver e caracterizar físico-quimicamente os nanossistemas contendo ou não o extrato de quiabo;
- ✓ Avaliar a ingestão alimentar e hídrica dos animais;
- ✓ Avaliar parâmetros biométricos dos animais;
- ✓ Avaliar a homeostase glicêmica-insulinêmica;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção do extrato de quiabo

O extrato de quiabo foi obtido por decoção (fervura do fruto com água durante 10 minutos) posteriormente homogeneizado em moinho de facas até total trituração do quiabo. Após esse procedimento, o homogenato foi filtrado para a obtenção do extrato aquoso. Posteriormente lipossomas contendo extrato do quiabo foram desenvolvidos, enquanto outra porção do extrato aquoso foi armazenada à  $-20^{\circ}\text{C}$ , para uso posterior.

Uma porção desse extrato foi desidratada e utilizada para determinação dos constituintes presentes no quiabo através do método físico-químico para análise de alimentos descrito pelo instituto Adolfo Lutz, 2008 (Métodos Físico-químicos para Análises de Alimentos).

#### 3.2. Desenvolvimento e caracterização dos lipossomas

##### 3.2.1. Desenvolvimento dos lipossomas

Lipossomas contendo quiabo foram preparados através do método de evaporação em fase reversa (Mertins, Cardoso *et al.*, 2006). Primeiramente a fase orgânica foi preparada com fosfatidilcolina, colesterol e clorofórmio, com a ajuda de ultrassom por 5 min. Já a fase aquosa foi preparada contendo solução salina tamponada em fosfato (pH 7,4) e polissorbato 80, e em seguida sonicada por 5 min em ultrassom. Posteriormente quando ambas as fases estavam solúveis, 1mL da fase aquosa foi adicionada na fase orgânica e retornou ao ultrassom. Em seguida o solvente orgânico foi removido por evaporação rotatória à  $25^{\circ}\text{C}$  sob pressão reduzida até a formação de um filme fino. Este filme foi hidratado adicionando o restante da fase aquosa e submetido a agitação sob pressão reduzida por 30 min.

##### 3.2.2. Caracterização físico-química dos lipossomas desenvolvidos

Os lipossomas foram caracterizados quanto ao diâmetro da partícula, potencial zeta ( $\zeta$ ) e pH. Esse procedimento foi realizado pela equipe da Prof. Dra. Sandra Elisa Haas, da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, Uruguaiana/RS).

###### 3.2.2.1. Diâmetro de partícula e potencial Zeta

Os lipossomas foram caracterizados quanto ao seu diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial  $\zeta$ , por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e eletroforese laser Doppler (LDE), medida à 25°C (NanoBrook 90Plus Zeta<sup>®</sup>, Brookhaven Instruments Corporation, USA). As amostras foram diluídas previamente com água MilliQ<sup>®</sup> e 0,01 mol/L de solução aquosa de NaCl. Foram filtrados os meios de diluição (0,45  $\mu\text{m}$ ) antes da análise, porém cada amostra foi utilizada diretamente, sem filtração ou qualquer outro tratamento, a fim de evitar a seleção das amostras. Ainda para avaliar o tamanho da partícula, também foi utilizada a técnica de difratometria de laser, utilizando o equipamento Mastersizer<sup>®</sup> 2000 (Malvern Instruments) e o acessório Scirocco<sup>®</sup> 2000. Após obtenção dos dados de 26 difrações de laser, estes foram avaliados utilizando o valor  $d_{4,3}$ , o qual representa o diâmetro médio baseado no volume da partícula e ainda os valores de 10% ( $d_{10\%}$ ), 50% ( $d_{50\%}$ ) e 90% ( $d_{90\%}$ ) da distribuição, que indicam a porcentagem de partículas possuindo diâmetro igual ou inferior ao valor determinado. O valor do Span (Equação 1), que indica o valor da polidispersão do sistema, também foi utilizado para a caracterização das formulações.  $d_{0,1}$ ,  $d_{0,9}$  e  $d_{0,5}$ .

$$\text{Span} = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}} \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde  $d_{0,1}$  é o diâmetro cumulativo em volume de 10% da fase dispersa da nanoestrutura analisada. Do mesmo modo,  $d_{0,9}$  é o diâmetro cumulativo em volume de 90% da população total. Finalmente  $d_{0,5}$  é o parâmetro que divide a distribuição percentual de volume obtida exatamente na metade, ou seja, 50% do volume total das nanoestruturas da fase dispersa encontra-se abaixo do valor de  $d_{50}$  e 50% encontram-se acima dele.

### 3.2.2.2 Determinação de pH e aspectos macroscópicos das nanocápsulas

Para realizar a determinação do pH foi utilizado um potenciômetro (Denver<sup>®</sup> Instrument VB-10, New York, USA) calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas formulações, logo após a preparação. Os resultados representaram a média de três determinações. Os lipossomas foram avaliados segundo a aparência macroscópica, levando em consideração a homogeneidade, aspecto leitoso, branco e opalescente.

## 3.3. Modelo experimental

Foram usados ratos Wistar, criados no biotério setorial do Núcleo de Pesquisa e Apoio

Didático em Saúde (NUPADS), da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), *Campus* Universitário de Sinop. Os experimentos foram desenvolvidos de acordo com as normas do Comitê de Ética para uso e Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso (Processo N° 23108.070797/2021-42). Durante o período experimental, os ratos foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade ( $55\pm 5\%$ ) e fotoperíodo (12h de claro, 06:30 às 18:30h e 12h de escuro), com água e comida *ad libitum*.

O modelo experimental foi produzido a partir da administração intraperitoneal de dexametasona (1 mg/kg de peso corporal, uma vez ao dia) em ratos Wistar de ambos os sexos, a partir dos 60 dias de vida, até o término do tratamento, que se deu aos 70 dias de vida dos animais. Durante todo o período experimental foi aferido o peso corporal, bem como a ingestão alimentar e hídrica dos ratos a cada dois dias. Os ratos tratados com dexametasona (grupo DEX, n=60 ratos machos e n=60 ratas fêmea receberam injeção diária de dexametasona intraperitoneal (1 mg/kg de peso corporal, i.p.) por 10 dias consecutivos, enquanto ratos controle (grupo CONT, n=15 ratos machos e n=15 ratas fêmeas) receberam solução salina (NaCl, 0,9%), segundo protocolo adaptado de estudo prévio (Rafacho, Marroqui *et al.*, 2010). A glicemia dos ratos (alimentados) foi avaliada antes (dia zero) e durante (ao quinto, oitavo e décimo dia) do tratamento com dexametasona. Ao quinto dia, após o início da indução de resistência à insulina (tratamento com dexametasona), deu-se início ao tratamento com o extrato do quiabo (seja este em formulação lipossômica ou na forma de extrato livre).

Aos 65 dias de vida, parte dos animais tratados com dexametasona, foi tratada por 5 dias consecutivos (dos 65 aos 70 dias de vida) com o extrato do quiabo em formulação lipossômica ou na forma de extrato livre. Desta forma, em todo o estudo foram formados cinco grupos experimentais de ambos os sexos:

- ✓ Grupo CONT; ratos (n=15 ratos machos e n=15 ratas fêmeas) que não receberam tratamento.
- ✓ Grupo DEX; ratos (n=15 ratos machos e n=15 ratas fêmeas) que receberam, apenas água via gavagem.
- ✓ Grupo DEX-LipoB; ratos (n=15 ratos machos e n=15 ratas fêmeas) que receberam, via gavagem, veículo em formulação lipossômica sem conter extrato de quiabo.
- ✓ Grupo DEX-LipoQ; ratos (n=15 ratos machos e n=15 ratas fêmeas) que receberam, via gavagem, o extrato de quiabo a 1,5 mg/kg em formulação lipossômica.
- ✓ Grupo DEX-ExtrL; ratos (n=15 ratos machos e n=15 ratas fêmeas) que receberam, via gavagem, o extrato de quiabo em sua forma livre (200 mg/kg de peso corporal),

segundo dose adaptada de estudo prévio (Erfani Majd, Tabandeh *et al.*, 2018).

Todos os procedimentos foram realizados em triplicata para que pudéssemos obter o número desejado de animais por grupo. Além disso, o rastreamento de 24 horas foi realizado como forma de confirmar em resposta do tempo a dose adequada do extrato do quiabo associado em lipossoma utilizado durante o período experimental.

### **3.4. Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica**

A glicemia de ratos alimentados foi avaliada ao quinto, oitavo e décimo dia durante o período experimental.

A avaliação da homeostase glicêmica e insulinêmica foi realizada através do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT), segundo o método descrito anteriormente (Mathias, Miranda *et al.*, 2020). Após jejum de 12 horas (6:00–18:00h) e sem efeito de anestesia, administrou-se uma carga de glicose (2g/kg de peso corporal, ip). Antes da administração de glicose foi realizada uma primeira dosagem da glicemia de jejum, que correspondeu ao tempo zero (0 minutos); em seguida aplicou-se a glicose, em então, após 30, 60, 90 e 120 minutos da aplicação de glicose foram feitas novas dosagens de glicose sanguíneas.

Quanto ao teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT), após jejum de 4 horas (07:00–11:00h) e sem efeito de anestesia, foi administra uma dose de insulina (1 IU/kg de peso corporal, ip). Antes da administração de insulina uma primeira dosagem da glicemia foi obtida, correspondendo ao tempo zero (tempo zero, para obtenção da glicemia de jejum sem efeito da ação da insulina, 0 min); e então após a administração da insulina, nos tempos 15, 30, 45 e 60 minutos foram feitas novas dosagens de glicose sanguínea.

A dosagem da glicemia em ambos os procedimentos, ipGTT e ipITT, se deu através de glicosímetro digital (Accu-Chek<sup>®</sup> Performa, Roche).

Após a realização do ipITT, procedeu-se o cálculo para determinação da taxa de captação tecidual de glicose, ou seja, a constante de desaparecimento de glicose no plasma ( $K_{it}$ ), a qual foi calculada pela fórmula  $0,693/(t_{1/2})$ , conforme descrito anteriormente (De Oliveira, Scomparin *et al.*, 2011). Neste caso, a meia-vida da glicose plasmática foi calculada a partir da inclinação da análise dos mínimos quadrados das concentrações de glicose plasmática durante a fase linear do declínio da curva (Lundbaek, 1962).

### 3.5. Avaliação da ingestão alimentar e hídrica e composição corporal dos animais

Durante todo o período experimental a massa corporal, assim como também a ingestão alimentar e hídrica dos animais foi registrada a cada dois dias. O peso corporal foi realizado através da pesagem dos animais em balança digital (SF-400).

A ingestão alimentar e hídrica foi aferida por meio do cálculo de subtração entre o valor colocado na caixa e o valor restante após dois dias, o qual também foi dividido pelo número de ratos na caixa e pelo número de dias (2). Esse procedimento foi realizado considerando-se a ingestão média de todos os animais na caixa, relativizada pelo peso corporal e apresentado como g/100g de peso corporal.

Após o término dos procedimentos experimentais, os animais de todos os grupos experimentais, sob jejum de 12 horas (19:00–07:00h) foram eutanasiados por decapitação em guilhotina para roedores. Imediatamente após a eutanásia, coletou-se amostras teciduais para análises biométricas e amostras de sangue para a realização de análises bioquímicas (perfil lipídico).

Quanto às amostras teciduais, foram coletados os principais estoques de gordura (retroperitoneal, periepididimal e/ou periovariana e mesentérica), as quais foram pesadas para estimativa do acúmulo total de gordura corporal (Ibanez, Erthal *et al.*, 2017).

### 3.6. Análise estatística

Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade para avaliação da distribuição Gaussiana, em assumindo uma distribuição normal Gaussiana, os dados foram submetidos a análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), seguido pelo pós teste de Bonferroni, considerando-se valores  $p < 0,05$  como estatisticamente significativos.

Todas as avaliações estatísticas foram realizadas através do programa estatístico GraphPad Prism, versão 8.0 (Graphpad Prism 8.0, Software for Windows, San Diego, CA, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização físico-química do extrato do quiabo

A tabela 1 mostra a caracterização físico-química do extrato do quiabo desidratado.

**Tabela 1. Caracterização físico-química do extrato do quiabo**

Amostra	Umidade (%)	Cinza (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)	Açúcares redutores (%)	Fibras (%)	Fenóis totais (mg/100g)	Potencial Antioxidante (DPPH) ( $\mu\text{mol/g}$ )
<b>Extrato Quiabo</b>	27,16	13,91	14,38	0,00	0,760	45,65	113,140	705,50*

\*amostra na concentração administrada nos animais

### 4.2. Caracterização dos lipossomas desenvolvidos

Na tabela 2 estão apresentados os valores referentes à caracterização físico-química dos lipossomas desenvolvidos.

**Tabela 2. Caracterização físico-química do lipossoma**

Formulações	Difração de laser		Espectroscopia de correlação de fótons		Potencial zeta (mV)	pH
	D <sub>4,3</sub> ( $\mu\text{m}$ )	Span	Z-Average (nm)	PDI		
<b>LipoBr</b>	0,23 $\pm$ 0,030	1,21 $\pm$ 0,10	0,250 $\pm$ 0,12	0,076 $\pm$ 0,157	-28,20 $\pm$ 0,10	7,10
<b>LipoQ</b>	0,28 $\pm$ 0,047	1,39 $\pm$ 0,54	0,152 $\pm$ 0,54	0,269 $\pm$ 0,200	-31,46 $\pm$ 1,48	6,80

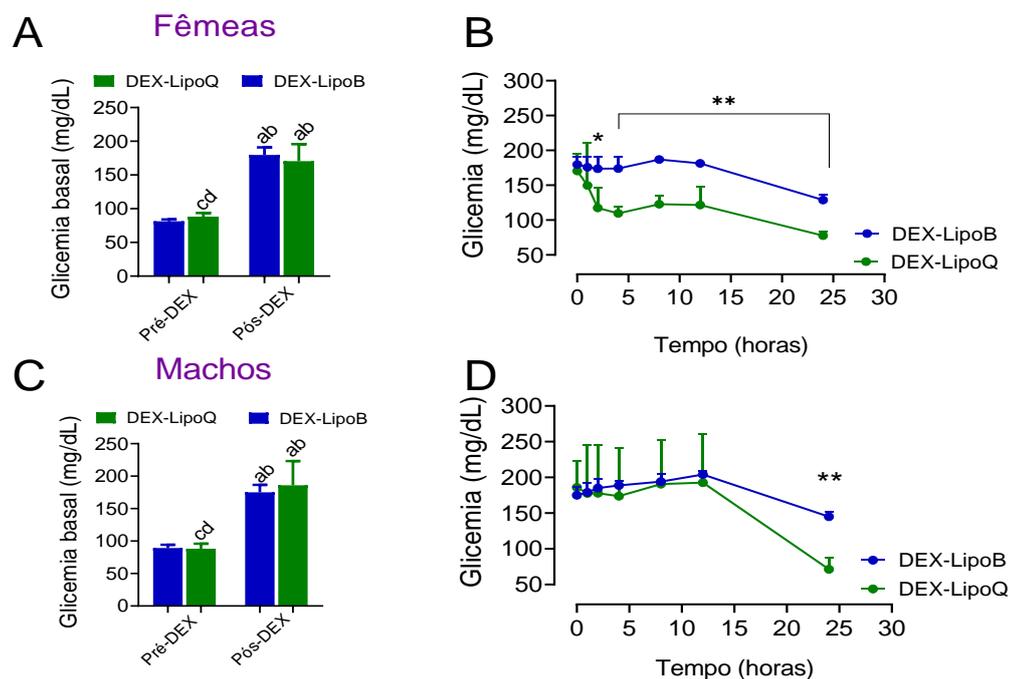
### 4.3. Rastreamento de 24 horas em relação à dose-resposta do extrato do quiabo em lipossoma

As figuras 1A e 1C, mostram os valores de glicemia basal antes e cinco dias depois do tratamento com dexametasona, nas quais é possível observar que cinco dias após o tratamento com dexametasona os ratos de ambos os sexos já estavam hiperglicêmicos (aumento médio de aproximadamente 105,23%,  $P < 0,001$ ); porém, não houve diferença estatística entre os grupos que subsequentemente seriam tratados com a formulação lipossômica contendo ou não quiabo ( $P > 0,05$ ).

Em seguida, logo após um período de 4 horas da aplicação da primeira dose do lipossoma contendo quiabo (grupo DEX-LipoQ), pode-se observar redução de 74% nos valores da glicemia em fêmeas DEX-LipoQ, quando comparados aos valores das fêmeas do

grupo DEX-LipoB ( $P < 0,01$ , Figura 1B). Após 24 horas da aplicação do lipossoma contendo quiabo as fêmeas DEX-LipoQ apresentavam-se normoglicêmicas ( $P < 0,01$ , Figura 1B).

Quanto aos machos, o decaimento inicial da glicemia se deu somente no período de 24 horas após a aplicação do lipossoma contendo quiabo, com redução glicêmica de 61,6%, ( $P < 0,001$ , Figura 1D). Neste momento, em relação aos valores glicêmicos anteriores à aplicação do lipossoma, já se observava normoglicemia dos ratos DEX-LipoB ( $P < 0,01$ , Figura D).



**Figura 1. Triagem do tempo de ação do quiabo em formulação lipossômica sobre a glicemia basal de fêmeas (A e B) e machos (C e D).** Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 7-8 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni (figuras A e C) e teste t de Student (figuras B e D). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$  representa diferença estatística pelo teste t de Student entre os grupos DEX-LipoQ *versus* DEX-LipoB. As letras sobre as barras representam diferença estatística pelo *one-way* ANOVA entre os grupos. a) DEX-LipoB em situação pré-DEX; grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo sem quiabo; b) DEX-lipoQ em situação pré-DEX; grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo contendo quiabo; c) DEX-LipoB em situação pós-DEX e d) DEX-lipoQ em situação pós-DEX.

#### 4.4. Homeostase glicêmica durante o período de administração da dexametasona e tratamento com quiabo em diferentes formulações

Como esperado, antes da aplicação de dexametasona, não foi observada diferença estatística entre os grupos experimentais, em ambos os sexos ( $P > 0,05$ , Figura 2A e D).

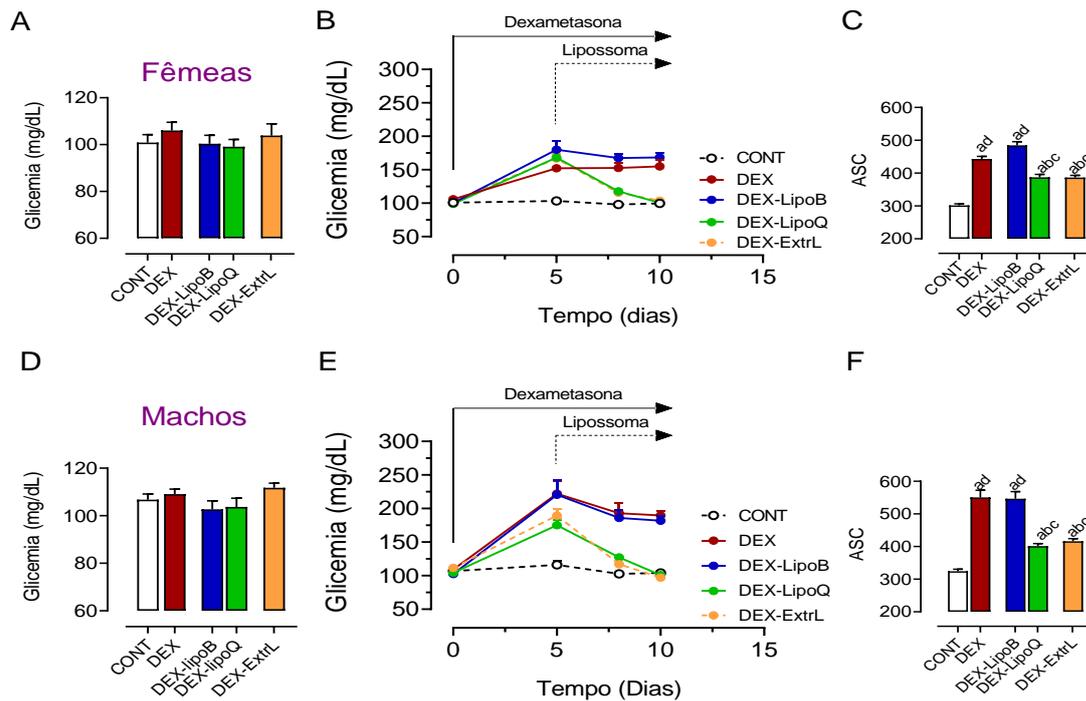
Como pode ser visto nas figuras 2B e E, a indução do DM2 com dexametasona elevou a glicemia em 47% nas fêmeas do grupo DEX, enquanto nos machos observou-se aumento de

69% ( $P < 0,01$ ), quando comparados aos seus respectivos grupos CONT. A glicemia das fêmeas DEX-LipoB aumentou em 60% em relação às fêmeas do grupo CONT ( $P < 0,05$ , Figura 2B e C), enquanto em machos esse aumento foi de 68% ( $P < 0,01$ , Figura 2E e F). Por outro lado, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos DEX-LipoB e DEX, em ambos os sexos ( $P > 0,05$ ).

Em relação ao tratamento com quiabo na formulação lipossômica (1,5mg/kg peso animal), as fêmeas DEX-lipoQ apresentaram redução de 27% na glicemia, quando comparadas as fêmeas do grupo DEX ( $P < 0,01$ , Figura 2B e C). Por outro lado, quando comparadas ao grupo CONT, as fêmeas DEX-LipoQ ainda mantiveram a glicemia aumentada em 28% ( $P < 0,05$ , Figura 2B e C). Quanto aos machos DEX-LipoQ, observou-se redução de 37% em relação ao grupo DEX ( $P < 0,01$ , Figura 2E e F), os quais mantiveram glicemia aumentada em 23% quando comparados ao grupo CONT ( $P < 0,05$ , Figura 2E e F).

Em relação ao tratamento com quiabo na forma de extrato livre (200mg/kg peso animal), as fêmeas DEX-ExtrL apresentaram redução de 15% na glicemia, em relação às fêmeas do grupo DEX ( $P < 0,01$ , Figura 2B e C). Por outro lado, a glicemia desse mesmo grupo, quando comparada à glicemia das ratas CONT, manteve-se aumentada em 29% ( $P < 0,05$ , Figura 4B e C). Os machos DEX-ExtrL apresentaram glicemia reduzida em 32% quando comparados ao grupo DEX ( $P < 0,01$ , Figura 4E e F), embora ainda tenha sido observado aumento da glicemia em 28% ao serem comparados com os ratos CONT ( $P < 0,05$ , Figura 2E e F).

De modo geral, isso significa que o lipossoma contendo quiabo mesmo em concentração muito pequena em relação ao extrato do quiabo livre, também foi capaz de gerar uma resposta positiva em reduzir os níveis glicêmicos de animais fêmeas e machos, de modo com que suas respectivas glicemias se encontrassem próximas ao grupo CONT.



**Figura 2. Homeostase glicêmica durante o período experimental de fêmeas (A, B e C) e machos (D, E e F).** Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 12-18 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a*) CONT, grupo controle; *b*) DEX, grupo que recebeu dexametasona; *c*) DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo sem quiabo; *d*) DEX-LipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contendo quiabo e *e*) DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

#### 4.5. Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica durante o ipGTT

Ao término período experimental, como mostrado na figura 3A e 3D, quando comparadas ao grupo CONT, as fêmeas DEX mostraram-se hiperglicêmica (97%,  $P < 0,01$ ), bem como os machos, os quais apresentaram aumento de 93% na glicemia de jejum ( $P < 0,01$ ). Quanto aos demais grupos, quando comparados ao grupo CONT, observou-se glicemia basal aumentada em 86% nas fêmeas DEX-LipoB e em 90% nos machos DEX-LipoB ( $p < 0,01$ , Figura 3). Por outro lado, não foi observada diferença estatística entre os grupos DEX-LipoB e DEX, em ambos os sexos ( $P > 0,05$ ).

Em relação aos animais tratados com quiabo, em formulação lipossômica ou extrato livre, as fêmeas DEX-LipoQ apresentaram redução de 52% na glicemia quando comparadas as fêmeas DEX e DEX-LipoB ( $P < 0,01$  Figura 3A). Por outro lado, quando comparadas ao grupo CONT, não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ , Figura 3A). Quanto aos machos DEX-LipoQ, observou-se redução de 58% em relação ao grupo DEX e DEX-LipoB ( $P < 0,01$ ,

Figura 3D), enquanto, quando comparados ao grupo CONT, não foram observadas diferenças estatísticas ( $P>0,05$  Figura 3D).

Quanto aos animais DEX-ExtrL, as fêmeas apresentaram redução de 38% na glicemia basal quando comparadas as fêmeas DEX ( $P<0,01$  Figura 3A). Por outro lado, quando comparadas ao grupo CONT, não diferiram estatisticamente ( $P>0,05$ , Figura 3A). Quanto aos machos DEX-ExtrL observou-se redução de 37% em relação ao grupo DEX ( $P<0,01$ , Figura 3D), enquanto, quando comparados ao grupo CONT, não foram observadas diferenças estatísticas ( $P>0,05$  Figura 3D).

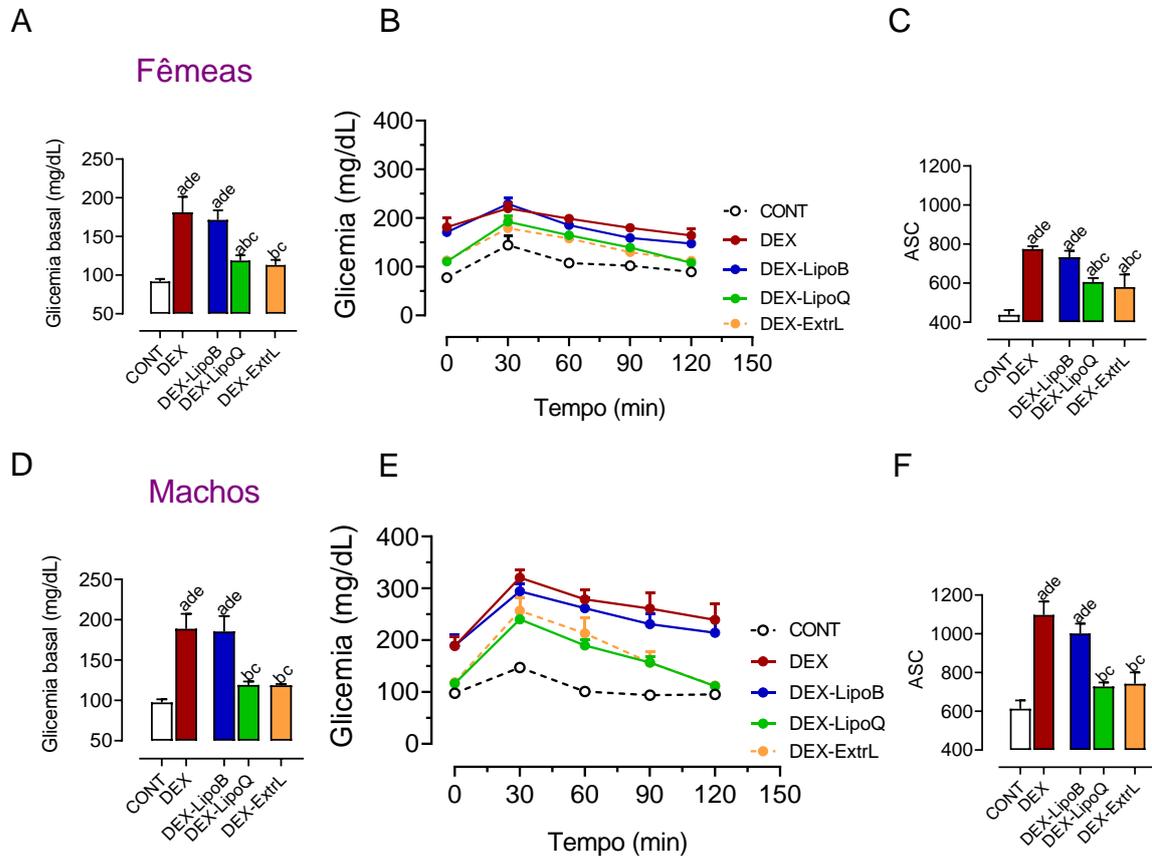
Quanto aos valores glicêmicos durante o ipGTT, como pode ser visto na figura 3B e C (fêmeas) e figuras 3E e F (machos), durante o ipGTT a glicemia das fêmeas DEX se manteve elevada em 76%, enquanto a dos machos se manteve aumentada em 79%, quando comparados aos valores glicêmicos de seus respectivos grupos CONT ( $P<0,01$ ). De modo similar, quando comparados ao grupo CONT, a glicemia das fêmeas DEX-LipoB, permaneceu elevada em 67% ( $P<0,01$ , Figura 3B e 3C), ao passo que a dos machos se manteve aumentada em 63% ( $P<0,01$ , Figura 3E e 3F). Por sua vez, não foi observada diferença estatística entre os grupos DEX-LipoB e DEX, em ambos os sexos ( $P>0,05$ , Figura 3B, C, E e F).

Quanto aos animais tratados com quiabo, em formulação lipossômica ou extrato livre, as fêmeas DEX-LipoQ apresentaram redução de 27% na glicemia durante o ipGTT quando comparadas às fêmeas DEX e às fêmeas DEX-LipoB ( $P<0,01$ , Figura 3B, C). Por outro lado, quando comparadas ao grupo CONT, as fêmeas DEX-LipoQ ainda mantiveram a glicemia aumentada em 38,4% ( $P<0,01$ , Figura 3B, C). Quanto aos machos DEX-LipoQ, observou-se redução de 51% em relação ao grupo DEX e ao grupo DEX-LipoB ( $P<0,01$ , Figura 3E, F), já quando comparados ao grupo CONT não foi observada diferença estatística ( $P>0,05$ , Figura 3E, F).

Ainda durante o ipGTT, as fêmeas do grupo DEX-ExtrL apresentaram redução da glicemia em 33%, em relação ao grupo DEX ( $P<0,01$ , Figura 3B, C) e aumento de 32% em relação ao grupo CONT ( $P<0,01$ , Figura 3B, C). Os machos DEX-ExtrL apresentaram redução de 48% da glicemia, quando comparados ao grupo DEX ( $P<0,01$ , Figura 3E, F), mas quando comparados aos valores glicêmicos dos ratos CONT, não mostraram diferença estatística ( $P>0,05$ , Figura 3E, F).

De modo geral, isso significa que o lipossoma contendo quiabo mesmo com uma concentração muito pequena em relação ao extrato do quiabo livre, também foi capaz de gerar uma resposta positiva em reduzir os níveis glicêmicos frente ao teste de ipGTT em

fêmeas e machos, de modo que não houvesse uma intolerância a glicose presente nesses animais.



**Figura 3. Homeostase glicêmica durante ipGTT de fêmeas (A, B e C) e machos (D, E e F).** Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 8-12 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a*) CONT, grupo controle; *b*) DEX, grupo que recebeu dexametasona; *c*) DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo sem quiabo; *d*) DEX-LipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contendo quiabo e *e*) DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

#### 4.6. Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica durante o ipITT

A figura 4A, B, C e D mostra os valores glicêmicos durante o ipITT e a taxa de captação periférica de glicose, representada pelos valores do  $K_{itt}$ . Em nosso estudo, observamos que durante ipITT a velocidade de captação periférica de glicose das fêmeas DEX se manteve reduzida em 92%, e nos machos DEX em 84%, quando comparada a taxa de decaimento glicêmico dos seus respectivos grupos CONT ( $P < 0,01$ , Figura 4B e D).

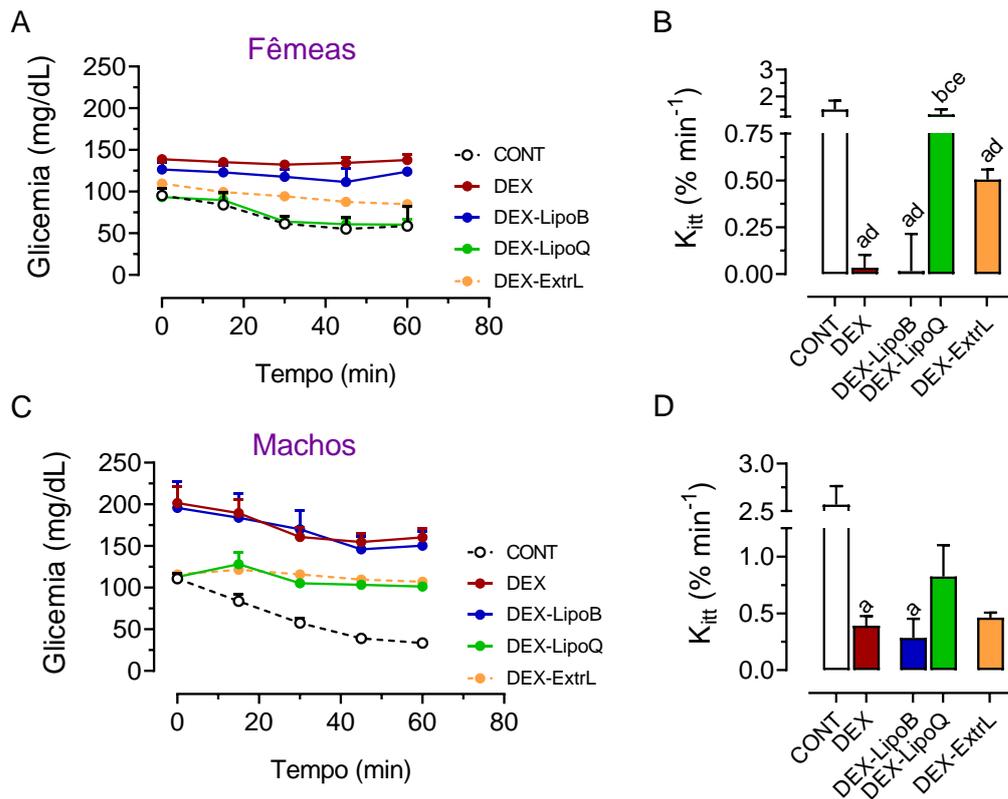
Quando comparado aos respectivos grupos CONT, as fêmeas DEX-LipoB apresentaram redução de 99% na taxa de decaimento glicêmico, já os machos DEX-LipoB apresentaram redução de 88% ( $P < 0,01$ , Figura 4B e D). Por outro lado, ao se comparar com os valores de  $K_{itt}$  do grupo DEX, os grupos DEX-LipoB, em ambos os sexos, não diferiram estatísticas dos de seus respectivos grupos DEX ( $P > 0,05$ , Figura 4B e D).

Quanto aos animais tratados com quiabo, em formulação lisossômica ou extrato livre, as fêmeas DEX-LipoQ apresentaram aumento de 97% na velocidade de captação periférica de glicose, quando comparadas às fêmeas DEX e às fêmeas DEX-LipoB ( $P < 0,01$ , Figura 4B). Por outro lado, quando comparada a taxa de decaimento glicêmico das fêmeas do grupo CONT, as fêmeas DEX-LipoQ não apresentaram diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ), Figura 4B). Quanto aos valores de  $K_{itt}$  dos machos DEX-LipoQ, estes não diferiram estatísticas quando comparados aos valores observados nos demais grupos ( $P > 0,05$ , Figura 4C e D).

Quanto ao  $K_{itt}$  observado nas fêmeas DEX-ExtrL, estes valores foram estatisticamente menores (redução média de 64%,  $P < 0,01$ , Figura 4B) do que os valores observados nas ratas CONT e nas ratas DEX-LipoQ, não diferindo estatisticamente dos demais grupos ( $P > 0,05$ , Figura 4B).

Quanto aos valores do  $K_{itt}$  dos machos DEX-ExtrL, estes não diferiram estatisticamente quando comparados aos demais grupos ( $P > 0,05$ , Figura 4E).

Isso significa que o lipossoma contendo quiabo mesmo com uma concentração muito inferior em relação ao extrato do quiabo livre, também foi capaz de gerar uma resposta positiva na proteção contra a resistência à insulina, sendo que este efeito foi mais proeminente em fêmeas tratadas com lipossoma.



**Figura 4. Homeostase glicêmica durante ipITT de fêmeas (A e B) e machos (C e D).** Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 8-12 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a*) CONT, grupo controle; *b*) DEX, grupo que recebeu dexametasona; *c*) DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo sem quiabo; *d*) DEX-LipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contendo quiabo e *e*) DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

#### 4.7. Peso corporal, ingestão alimentar e consumo hídrico dos animais

A figura 5 mostra o peso corporal de fêmeas e machos durante todo o período experimental. Em relação ao peso corporal durante o período que antecedeu a administração de dexametasona, como esperado, não houve diferença estatística entre os grupos, em ambos os sexos ( $P > 0,05$ , Figura 5A, B, E e F).

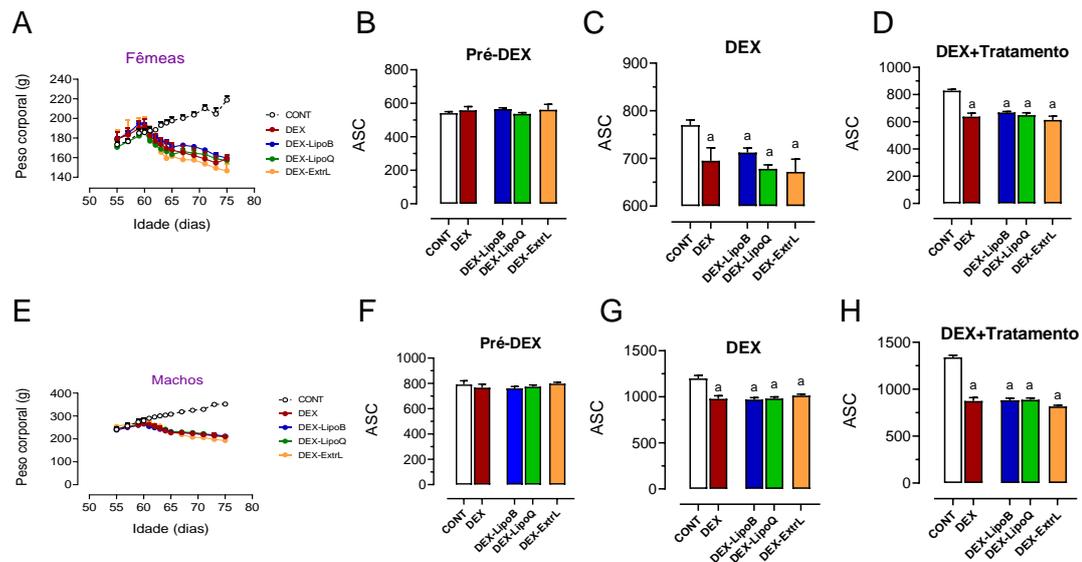
Quanto ao peso corporal durante os cinco primeiros dias da administração de dexametasona, observou-se redução em todos os grupos que receberam dexametasona, em ambos os sexos. Sendo que em comparação ao grupo CONT, o peso corporal das fêmeas DEX reduziu em 9%, enquanto o peso dos machos DEX teve redução de 18% ( $P < 0,01$ , Figura 5A, C, E e G). Como esperado, não se observou diferença estatística entre os demais grupos ( $P > 0,05$ ). Contudo, estes se mostram diferentes de seus respectivos grupos CONT.

Também quando comparados ao grupo CONT, o peso corporal das fêmeas DEX-LipoB reduziu em 7%, já em machos essa redução foi de 19% ( $P < 0,01$ , Figura 5A, C, E e G). As fêmeas DEX-LipoQ apresentaram redução do peso corporal em 11%, enquanto os machos DEX-LipoQ tiveram redução em 18% ( $P < 0,01$ , Figura 5A, C, E e G). De modo similar, as fêmeas DEX-ExtrL obtiveram redução do peso em 12%, ao serem comparadas com fêmeas CONT ( $P < 0,01$ , Figura 5A, C, E e G) e os machos DEX-ExtrL tiveram redução de seu peso em 15% ( $P < 0,01$ , Figura 5A, C, E e G).

Quanto ao período de tratamento com as diferentes formulações de quiabo, representado pela ASC (Figura 5A, D, E e H), observou-se que as fêmeas DEX apresentaram redução do peso corporal em 23% e os machos uma redução de 34% em relação aos seus respectivos grupos CONT ( $P < 0,01$ , Figura 5A, D, E e H). Nesse mesmo período, o grupo DEX-LipoB, em ambos os sexos, não diferiu estatisticamente em relação ao grupo DEX, mas em relação ao grupo CONT, as fêmeas DEX-LipoB obtiveram redução do peso em 19%, enquanto os machos DEX-LipoB uma redução de 34% ( $P < 0,01$ , Figura 5A, D, E e H).

As fêmeas DEX-LipoQ, tratadas com lipossoma contendo quiabo, e as ratas DEX-ExtrL, tratadas com quiabo na forma livre, não diferiram estatisticamente entre si e nem em relação ao grupo DEX ( $P > 0,05$ , Figura 5A, D), o mesmo aconteceu para os machos ( $P > 0,05$ , Figura 5E, G). Porém, ao serem comparados ao grupo CONT, as fêmeas DEX-LipoQ apresentaram peso corporal reduzido em 21%, enquanto os machos apresentaram redução de 34% ( $P < 0,01$ , Figura 5A, D, E e H). Quanto às fêmeas DEX-ExtrL, o peso corporal apresentou-se 26% menor em relação ao grupo CONT, assim como os machos, que apresentaram redução em 39% ( $P < 0,01$ , Figura 5A, D, E e H).

De maneira geral, foi perceptível que todos os grupos experimentais, em ambos os sexos, apresentaram-se magros durante todo período experimental, mesmo diante do tratamento com quiabo em diferentes formulações.



**Figura 5. Peso corporal de fêmeas (A, B, C e D) e machos (E, F, G e H).** Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 10-16 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a*) CONT, grupo controle; *b*) DEX, grupo que recebeu dexametasona; *c*) DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma sem quiabo; *d*) DEX-LipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contendo quiabo e *e*) DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

Quanto à ingestão alimentar, antes da aplicação de dexametasona, como esperado não observou diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, em ambos os sexos ( $P > 0,05$ , Figura 6A, B, E e F).

Durante o período de indução ao DMT2, a ingestão alimentar das fêmeas DEX diminuiu em 58% quando comparada a ingestão das ratas CONT ( $P < 0,05$ , Figura 6A e C), já as fêmeas DEX-LipoB, não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo DEX ( $P > 0,05$ , Figura 6A e C), porém ao serem comparadas ao grupo CONT apresentaram redução alimentar de 42% ( $P < 0,05$ , Figura 6A e C). Ainda, as fêmeas DEX-LipoQ e DEX-ExtrL não diferiram entre si, bem como não apresentaram diferença estatística quando comparadas ao grupo DEX ( $P > 0,05$ , Figura 6A e C). Por outro lado, ao serem comparadas ao grupo CONT, as fêmeas DEX-LipoQ apresentaram redução de 56% na ingestão alimentar, ao passo que as fêmeas DEX-ExtrL apresentaram redução de 37% ( $P < 0,05$ , Figura 6A e C).

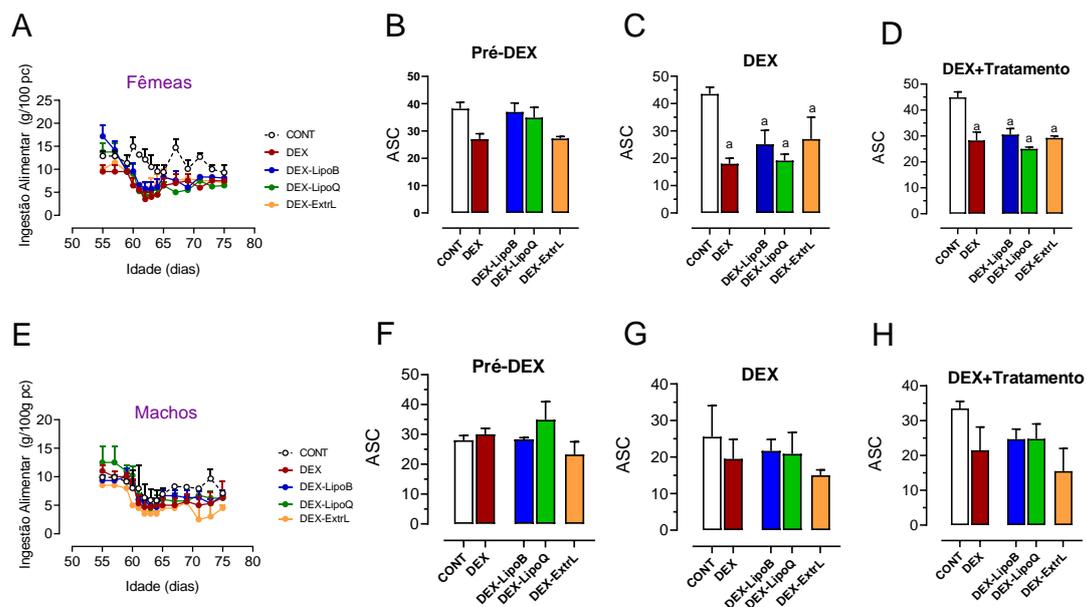
Em relação à ingestão alimentar nos machos, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais durante o período de administração de dexametasona ( $P > 0,05$ , Figura 6E e G).

Quanto à ingestão alimentar observada durante o período de tratamento com quiabo, as fêmeas DEX apresentaram ingestão reduzida em 35%, quando comparadas as ratas CONT ( $P < 0,05$ , Figura 6A e D). Porém, o mesmo não foi observado quando comparamos os machos DEX em relação ao grupo CONT ( $P > 0,05$ , Figura 6E e H).

As fêmeas DEX-LipoB não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo DEX ( $P > 0,05$ , Figura 6A e D), mas ao serem comparadas com as ratas do grupo CONT, apresentaram redução de 32% na ingestão alimentar ( $P < 0,05$ , Figura 6A e D). Quanto à ingestão alimentar das fêmeas DEX-LipoQ e das DEX-ExtrL, não apresentaram diferenças aos serem comparadas entre si, bem como não houve diferença estatística quando comparadas a ingestão alimentar das ratas DEX ( $P > 0,05$ , Figura 6A e D). Por sua vez, as fêmeas DEX-LipoQ, ao serem comparadas às ratas CONT, apresentaram redução de 44% na ingestão alimentar, enquanto as fêmeas DEX-ExtrL tiveram ingestão alimentar reduzida em 35% quando comparadas as ratas CONT ( $P < 0,05$ , Figura 6A e D).

Quanto à ingestão alimentar dos ratos machos, não observaram diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais ( $P > 0,05$ , Figura 6E, F, G e H).

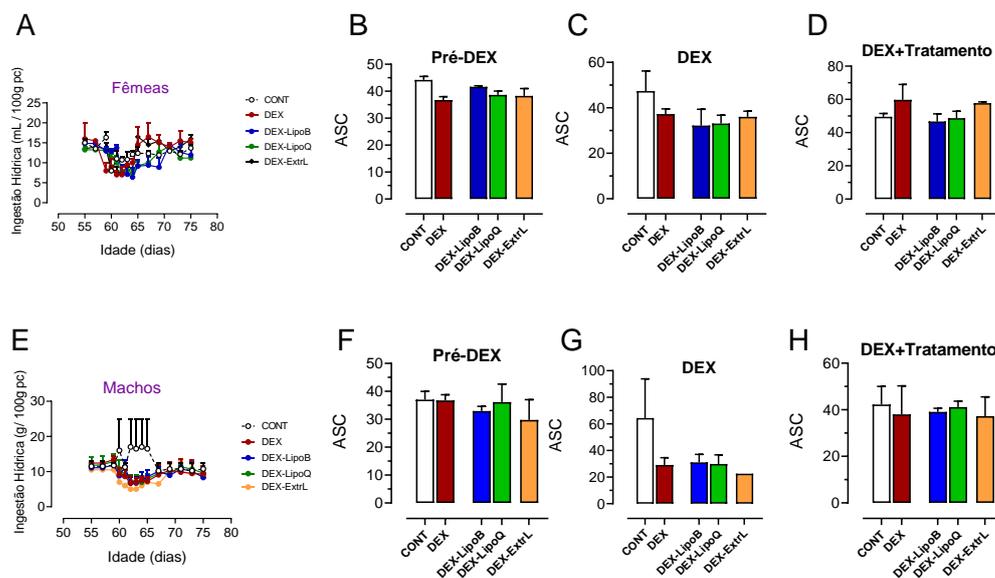
Ou seja, a figura 6 nos mostra que o perfil magro dos animais em todos os grupos tratados, em ambos os sexos, ocorreu por uma baixa ingestão alimentar, mesmo diante do tratamento com quiabo em diferentes formulações.



**Figura 6.** Ingestão alimentar de fêmeas (A, B, C e D) e machos (E, F, G e H). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 10-16 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os

grupos, onde *a*) CONT, grupo controle; *b*) DEX, grupo que recebeu dexametasona; *c*) DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo sem quiabo; *d*) DEX-LipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contendo quiabo e *e*) DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

Quando a ingestão hídrica avaliada ao longo do período experimental, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, em ambos os sexos ( $P > 0,05$ , Figura 7A, B, C, D, E, F, G e H).



**Figura 7. Ingestão hídrica de fêmeas (A, B, C e D) e machos (E, F, G e H).** Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 10-16 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. CONT, grupo controle; DEX, grupo que recebeu dexametasona; DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma sem quiabo; DEX-lipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contendo quiabo, DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

#### 4.8. Avaliação da composição corporal

Como mostrado na figura 8A, ao término do período experimental, as fêmeas DEX apresentaram-se fenotipicamente magras com redução do peso corporal em 18%, ao passo que os machos DEX tiveram redução de seu peso corporal em 37% ( $P < 0,01$ ) quando comparados aos animais CONT ( $P < 0,01$ , Figura 8G). Da mesma forma, o peso das fêmeas DEX-LipoB foi 33% menor do que o das fêmeas CONT, enquanto o peso dos machos apresentou redução de 36% ( $P < 0,01$ , Figura 8A, G). As fêmeas DEX-LipoB tiveram também redução em 14% do

seu peso, em relação às fêmeas do grupo DEX ( $P < 0,05$ , Figura 8A). Por sua vez, não foi observada diferença estatística entre os machos DEX-LipoB e DEX ( $P > 0,05$ , Figura 8G).

Em relação aos animais tratados com quiabo, em formulação lipossômica ou extrato livre, as fêmeas DEX-LipoQ e os machos não foram estatisticamente diferentes de seu grupo DEX ( $P > 0,05$ , Figura 8A, G). Por outro lado, as fêmeas DEX-LipoQ tiveram redução de 25% do seu peso corporal em relação às fêmeas CONT, enquanto o peso corporal dos machos DEX-LipoQ mostrou-se 36% menor do que nos machos CONT ( $P < 0,01$ , Figura 8A, G). Quanto às fêmeas DEX-ExtrL, e aos machos DEX-ExtrL, estes grupos não apresentaram diferença estatística em relação aos seus respectivos grupos DEX ( $P > 0,05$ , Figura 8A, G). Porém, o peso corporal das fêmeas DEX-ExtrL foi reduzido em 35%, em relação ao peso das ratas CONT, bem como o dos machos DEX-ExtrL que reduziu em 37% quando comparado ao dos ratos CONT ( $P < 0,01$ , Figura 8A, G).

Em comparação aos animais CONT, o peso do fígado das fêmeas DEX apresentou um aumento em 26%, enquanto o dos machos apresentou aumento de 54% ( $P < 0,0$ , Figura 8B, H). O fígado das fêmeas DEX-LipoB apresentou aumento de 29%, já os machos DEX-LipoB com aumento de 59%, ao serem comparados com seus respectivos grupos CONT ( $P < 0,05$ , Figura 8B, H). Também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos DEX-LipoB e DEX em ambos os sexos ( $P > 0,05$ ).

Quanto aos animais tratados com quiabo, em formulação lipossômica ou extrato livre, tanto as fêmeas DEX-LipoQ quanto as DEX-ExtrL não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo DEX, bem como em relação ao grupo CONT ( $P > 0,05$ , Figura 8B, H). Por outro lado, o fígado dos machos DEX-LipoQ apresentou redução de 17% em relação ao grupo DEX ( $P < 0,05$ ) e de 31% em relação ao grupo CONT ( $P < 0,01$ , Figura 8H). Já o fígado dos machos DEX-ExtrL mostrou-se 21% mais leve do que o peso do fígado dos machos DEX ( $P < 0,05$ ) e 28% mais leve do que o dos machos CONT ( $P < 0,05$ , Figura 8H).

Quanto ao peso do tecido adiposo marrom, as fêmeas DEX apresentaram aumento de 58%, quando comparadas ao grupo CONT ( $P < 0,05$ , Figura 8C), o mesmo não foi observado em machos DEX, os quais não diferiram dos machos CONT ( $P > 0,05$ , Figura 8I).

Em relação aos animais tratados com lipossoma contendo quiabo, as fêmeas e os machos dos grupos DEX-LipoB e DEX-LipoQ não se apresentaram estatisticamente diferentes em relação ao grupo DEX e CONT ( $P > 0,05$ , Figura 8C, I). Por outro lado, as fêmeas DEX-ExtrL apresentaram redução de 68% no peso da gordura marrom em relação ao CONT ( $P < 0,05$ , Figura 8C), enquanto os machos DEX-ExtrL não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo DEX ( $P > 0,05$ , Figura 8I). Porém, quando comparados aos

seus respectivos grupos CONT, tanto as fêmeas DEX-ExtrL, quanto os machos DEX-ExtrL não se apresentaram diferentes estatisticamente ao CONT ( $P>0,05$ , Figura 8C, I).

Quanto aos estoques de tecido adiposo branco, a gordura retroperitoneal das fêmeas DEX-LipoB apresentou-se reduzida em 42%, quando comparada aos valores do grupo CONT ( $P<0,05$ , Figura 8D), e reduzida em 30%, em relação ao grupo DEX-ExtrL ( $P<0,01$ ). Quanto aos demais grupos de fêmeas, não houve diferença estatística entre os valores da gordura retroperitoneal ( $P>0,05$ ).

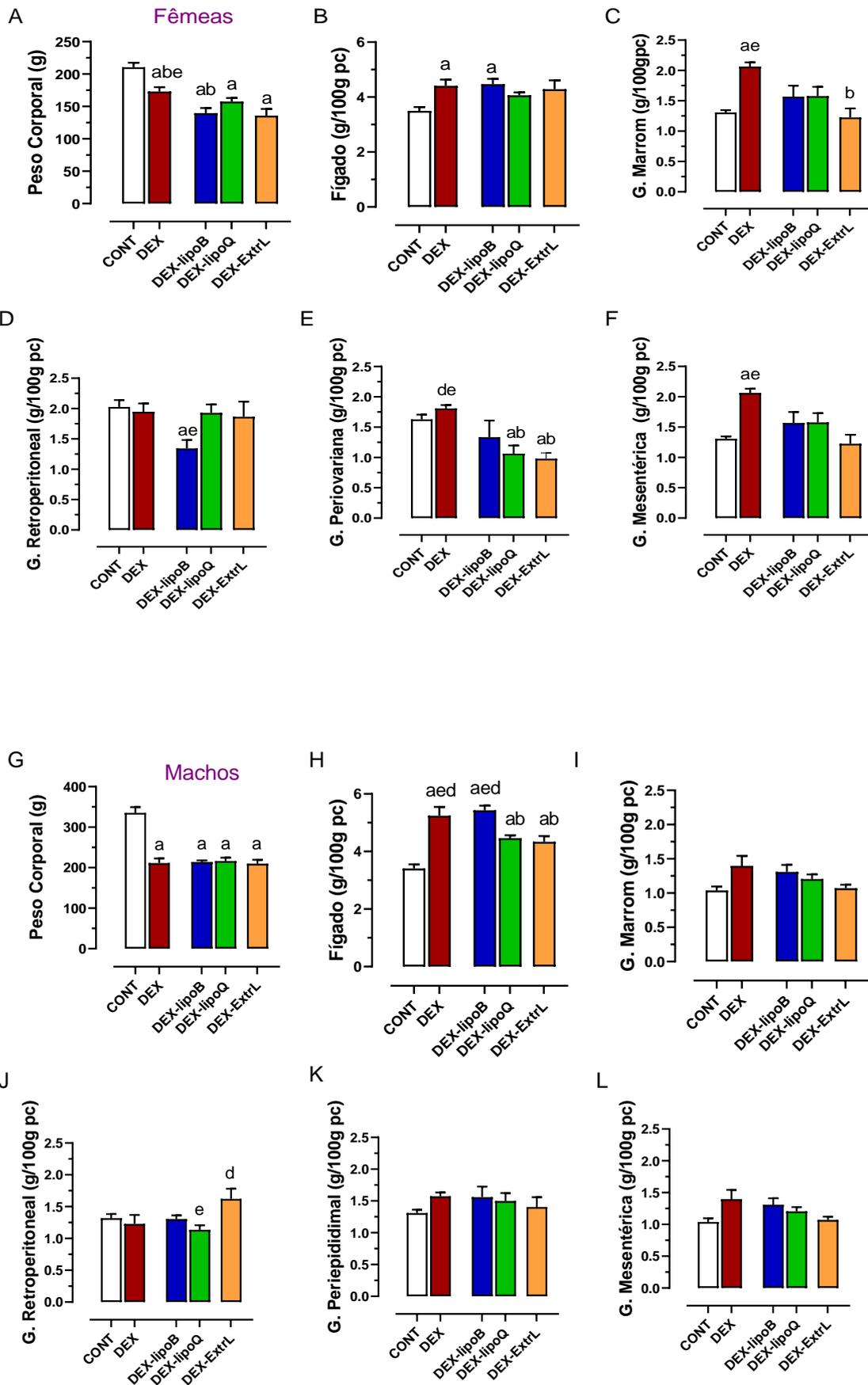
Ainda quanto aos estoques de gordura retroperitoneal, em machos DEX-LipoQ foi observada uma redução de 28%, quando comparada ao grupo DEX-ExtrL ( $P<0,05$ , Figura 8J). Quanto aos demais grupos de machos, não houve diferença estatística entre os valores da gordura retroperitoneal ( $P>0,05$ ).

Se tratando da gordura periovariana, as fêmeas DEX não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo CONT ( $P>0,05$ , Figura 8E), bem como foi observado nas fêmeas DEX-LipoB, as quais não apresentaram diferenças estatísticas em comparação ao grupo CONT e os demais grupos ( $P>0,05$ ).

Os estoques de gordura periovariana das fêmeas DEX-LipoQ apresentaram-se reduzido em 41% em relação ao grupo DEX ( $P<0,05$ ) e em 34%, quando comparados aos valores do grupo CONT ( $P<0,01$ , Figura 8E). Por sua vez, quando comparadas ao grupo DEX, as fêmeas DEX-ExtrL tiveram uma redução de 45% em sua gordura periovariana, ( $P<0,05$ ) e quando comparadas com o grupo CONT, a redução foi de 39% ( $P<0,05$ ).

No caso dos machos, os estoques de gordura periepididimal não foram estatisticamente diferentes entre os demais grupos experimentais ( $P>0,05$ , Figura 8K).

Quanto aos valores da gordura mesentérica dos animais, as fêmeas DEX apresentaram aumento de 53%, quando comparadas ao grupo CONT ( $P<0,05$ , Figura 8F). Além disso, o grupo DEX-ExtrL apresentou uma redução de 64% em relação ao grupo DEX ( $P<0,05$ ), por sua vez não foram observadas diferenças estatísticas entre os demais grupos experimentais ( $P>0,05$ ). Em relação à gordura mesentérica dos machos, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ( $P>0,05$ , Figura 8L).



**Figura 8. Composição corporal dos de fêmeas (A, B, C, D, E e F) e machos (G, H, I, J, K e L).** Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média de 8-13 animais por grupo experimental, em ambos os sexos. Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) seguida de pós teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, CONT, grupo controle; DEX, grupo que recebeu dexametasona; DEX-LipoB, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossomo sem quiabo; DEX-LipoQ, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com lipossoma contendo quiabo, DEX-ExtrL, grupo que recebeu dexametasona e tratamento com extrato livre contendo quiabo.

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, apresentamos o efeito do quiabo, em formulação lipossômica sobre a homeostase glicêmica em ratos com resistência à insulina induzida pelo tratamento crônico com dexametasona, mostrando ainda o efeito sexo dependente deste tratamento. Em adição, mostramos uma nova possibilidade terapêutica farmacológica para o controle dos níveis glicêmicos em indivíduos acometidos pelo DMT2, através da caracterização deste composto em estrutura lipossômica.

A caracterização do fruto do quiabo permitiu conhecer o perfil físico-químico do material. Além disso, houve uma redução para o teor de água quando o extrato de quiabo passou por secagem de  $T = 45^{\circ}\text{C}$ . A técnica de

das membranas celulares mesmo em concentrações pequenas desse ativo, além disso secagem do extrato do quiabo se tornou viável para processar o quiabo e obter suas características físico-químicas seguindo os métodos físico-químicos para análise de alimentos de Adolfo Lutz, 2008. O teor de cinzas encontrado nesse trabalho está mais elevado do que quando comparado com o percentual de 9,61% apresentado por (Mir *et al.*, 2017). Os mesmos autores também apresentaram o teor proteína em torno de 14,49% o que se assemelha com nosso resultado.

Para fibra bruta foi encontrado no presente trabalho um valor de 45,65%, ou seja, um teor mais elevado do que apresentado por Famuwera e Olumofin, 2015. Para o teor de compostos fenólicos totais obtidos nesse trabalho quando comparados com outras hortaliças, infere-se que o quiabo apresenta potencial bioativo (Kaushik *et al.*, 2015). Em relação a atividade antioxidante obtido pelo método DPPH, observamos na literatura valores inferiores e superiores ao encontrado em nosso trabalho. Essas diferenças podem ser atribuídas justamente por diferenças em metodologias de análise ou variações de cultivo e maturação do quiabo (Brito *et al.*, 2015).

Quanto à caracterização físico-química dos lipossomas desenvolvidos no presente trabalho, nossos resultados demonstraram estar de acordo com outros trabalhos, onde foi relatada uma distribuição para lipossoma sem extrato do quiabo (LipoB) de 230nm e lipossoma contendo extrato do quiabo (LipoQ) 280nm de tamanho ( $d_{4,3}$ ), semelhante a 280 nm para lipossomas utilizados no encapsulamento de extratos por (Yusuf, Sharma *et al.*, 2014). Os mesmos autores também avaliaram o tamanho médio e índice de polidispersão dos lipossomas obtidos através do processo de homogeneização e sonicação e verificaram que não houve diferenças na obtenção de lipossomas de tamanho nanométrica, no entanto, mostraram

que lipossomas produzidos através do processo de sonicação podem apresentar um tamanho médio em alguns casos até menor (280 nm) em comparação com lipossomas que foram submetidos a homogeneização (303,97 nm).

Com relação a polidispersão das vesículas, que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição de tamanho, de acordo com os dados na tabela 1, os valores de Span e índice de polidispersão demonstraram baixa variação no diâmetro dos lipossomas desenvolvidos, sistema monomodal e homogêneo (Manaia, Abucafy *et al.*, 2017). Além disso, em nosso trabalho, através do potencial zeta, mostramos que o potencial de carga superficial das partículas está em conformidade com formação de cargas negativas devido à presença de lecitina (Yusuf, Sharma *et al.*, 2014). Além disso, o pH dos lipossomas permaneceu em torno de 7,0 o que manteve a conservação do lipossoma, não sendo afetada pela temperatura ou por possível hidrólise.

Fizemos um comparativo do tratamento com o extrato do quiabo em lipossoma (LipoQ) e lipossoma branco (LipoB), ou seja, não contendo o extrato do quiabo. Esse comparativo teve como intuito demonstrar nesse estudo que uma molécula ativa quando associada em lipossoma, facilitou a permeação do ativo através, exerceu controle dos níveis glicêmicos em animais que se encontravam hiperglicêmicos. Nesse caso, como já vimos em literatura, os lipossomas por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos são altamente versáteis para pesquisa e terapêutica, nesse caso a molécula ativa é levada até seu sitio de ação sem sofrer alterações que danifiquem a sua função no organismo (Almeida, Nag *et al.*, 2020). Como esperado o lipossoma branco não causou alterações consideráveis na redução dos níveis glicêmicos.

O quiabo na sua forma de extrato livre, apresentado nesse estudo, foi administrado em concentração mais elevada, para promover uma ação positiva em reverter a hiperglicemia presente em machos e fêmeas. Já que dados da literatura mostram que o efeito hipoglicemiante do extrato do quiabo, administrados em ratos Wistar, pode ser visto entre concentrações 200 e 500 mg/kg (Erfani Majd, Tabandeh *et al.*, 2018; Liao, Zhang *et al.*, 2019).

Em nosso estudo, optamos por realizar um rastreamento de 24 horas em relação à dose em resposta do tempo do extrato do quiabo em lipossoma, já que na literatura não encontramos trabalhos que abordassem um limiar de concentração desse ativo nesse tipo de nanoestrutura. Por sua vez como se trata de uma estrutura em escala nanométrica logo devemos considerar que a quantidade de ativo utilizada nesse sistema é necessariamente em concentrações menores do que em relação aos ativos utilizados em métodos convencionais de

encapsulamento (Almeida, Nag *et al.*, 2020). Consideramos que a administração (1,5mg/kg peso animal) do lipossoma contendo extrato do quiabo, foi capaz de reduzir a glicemia das fêmeas consideradas diabéticas a partir de 4 horas após administração e em machos a redução foi detectada em 24 horas.

Aqui nós mostramos que a administração crônica de dexametasona, em dose supra fisiológica já conhecida (Rafacho, Ortsater *et al.*, 2014), porém por período mais prolongado (10 dias consecutivos) em ratos Wistar de ambos os sexos, leva-os à hiperglicemia associada a um fenótipo caquético e hipofágico. Quanto a hiperglicemia observada nestes ratos, pode-se atribuir esse efeito como uma possível resultante de defeitos na ação periférica da insulina (Radhakutty e Burt, 2018), bem como também a um possível efeito hepático, decorrente de uma ação direta deste glicocorticoide sobre a via gliconeogênica ao ativar fatores de transcrição tais como a proteína de ligação do elemento de transcrição básica 1, ou fator 9 semelhante à Krüppel (Klf9) e o coativador do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ) nos hepatócitos (Cui, Fan *et al.*, 2019). Nesse âmbito, pontuamos como sendo uma limitação de nosso estudo o fato de não termos realizado análises de marcadores da via gliconeogênica em hepatócitos, bem como de marcadores da ação da insulina em tecidos periféricos como o músculo esquelético e tecido adiposo branco.

No que tange a hiperglicemia, em estado de jejum, observada em ratos tratados com dexametasona, em nosso estudo não observamos dimorfismo sexual quanto a este parâmetro. Interessantemente, frente ao desafio metabólico, durante o ipGTT, o efeito negativo da ação da dexametasona sobre a capacidade periférica de captação de glicose foi observado no grupo DEX, em ambos os sexos; contudo, esse efeito prejudicial foi significativamente maior, cerca de 1,4 vezes, nos machos do que em fêmeas. Neste mesmo contexto, apesar de termos observado dimorfismo sexual quanto à sensibilidade periférica à insulina, em ratos controles, de modo que os machos se mostram significativamente mais sensíveis à insulina do que as fêmeas, cerca de 1,7 vezes, não observamos dimorfismo sexual quanto a magnitude do prejuízo induzido pela dexametasona sobre a sensibilidade periférica à ação da insulina, frente ao ipITT. Esses dados são sugestivos de que os machos sejam mais vulneráveis ao efeito danoso da dexametasona em promover intolerantes à glicose frente a situações que mimetiza o estado pós-prandial, como é o caso do ipGTT, efeito que pode estar relacionado a uma possível redução da função endócrina pancreática quanto a sua capacidade de produção e/ou de secreção de insulina, uma vez que não se observou diferença de sexo quanto aos dados do  $K_{itt}$ . Como previamente mostrado, ratos Wistar machos são mais vulneráveis do fêmeas ao efeito crônico da dexametasona sobre a homeostase glicêmica (Stopa, De Souza *et al.*, 2019).

Embora neste estudo os autores tenham usado uma dose cerca de 2 mil vezes menor do que a que usamos em nosso estudo, porém, mesmo assim eles observaram intolerância à glicose em machos.

Em nosso estudo também mostramos a eficácia do desenvolvimento da estrutura lipossômica como partícula carreadora do princípio de nosso interesse, fato que pode ser constatado a partir dos dados obtidos no grupo LipoB, os quais são muito similares os dados do grupo DEX. Uma vez que os ratos LipoB, foram tratados com a mesma estrutura lipossômica, porém sem carrear quiabo em seu interior, esperava-se que tal tratamento não induzisse alterações significativas nos parâmetros avaliados.

Durante o experimento a evolução do quadro de hiperglicemia dos machos DEX e DEX-LipoB em relação às fêmeas do mesmo grupo fez com que pudéssemos constatar que os animais machos e fêmeas possuem muitas características biológicas e fisiológicas diferentes, já que o perfil diabetogênico nesses grupos foi mais presente em machos do que em fêmeas. Segundo(Gannon, Kulkarni *et al.*, 2018) existem evidências crescentes sugerindo que o sexo afeta a homeostase da glicose e a sua fisiopatologia, acarretando prevalência do diabetes, bem como alterações a resposta à terapia e essas diferenças entre sexos masculino e feminino vêm sendo pauta de estudos referentes a homeostase da glicose e DMT2. Neste âmbito, apesar das mulheres serem menos propensas ao desenvolvimento do DMT2 (Li, Quan *et al.*, 2021), elas são mais susceptíveis ao desenvolvimento de complicações relacionadas, tais doenças cardiovasculares e complicações renais (Shepard, 2019).

Ao utilizarmos do tratamento com o extrato do quiabo como agente anti-hiperglicemiante, devemos considerar que o quiabo possui de fibras solúveis e compostos fenólicos que atuam retardando o esvaziamento gástrico e a digestão e reduzindo consideravelmente a absorção de glicose, favorecendo diretamente a glicemia pós prandial de portadores de DMT2 (Erfani Majd, Tabandeh *et al.*, 2018). Dessa forma, foi perceptível no grupo DEX-LipoQ, em fêmeas e machos tratados, a redução na glicemia ao longo do experimento quando comparados aos grupos DEX e DEX-LipoB. Em nosso estudo também mostramos que o grupo DEX-ExtrL também foi capaz de reduzir a glicemia, em ambos os sexos. Porém, ressaltamos que para que tal efeito foi obtido precisou-se administrar uma dose em concentração cerca de 130 vezes maior desse ativo.

Além de avaliar os parâmetros da hiperglicemia causada pela dexametasona e o controle desse estado utilizando quiabo como tratamento em diferentes formulações observou que regulação do peso corporal e tecido adiposo também podem ser influenciados pelos glicocorticoides, embora o efeito metabólico dessa classe de hormônio no tecido adiposo

ainda seja pouco claro (Pasięka e Rafacho, 2016). Em nosso modelo experimental identificamos que os grupos experimentais tiveram reduęão do seu peso quando comparados ao CONT.

Nesse caso, ao contrário, do que já foi descrito, no qual os glicocorticoides podem promover aumento da massa gorda e síntese de triglicerídeos na gordura visceral (Anagnostis, Athyros *et al.*, 2009). Em nosso estudo observamos uma reduęão em relação ao peso corporal em animais submetidos à dexametasona.

O fato de os respectivos tratamentos não reverter o quadro da perda de peso causado pela dexametasona pode ter sido relacionado à presença de fibras solúveis do quiabo. As fibras solúveis uma vez no estômago e no intestino delgado, diminuem a atividade de algumas enzimas digestivas e influenciam na taxa de digestão e absoręão de nutrientes, além de influenciar na moderação da glicemia pós-prandial e níveis de insulina, como também realizar a regulação do apetite (Fan, Zhang *et al.*, 2014; Erfani Majd, Tabandeh *et al.*, 2018). Além disso, esse estudo corrobora com achados quanto à reduęão dos estoques de tecido adiposo branco observado em nosso estudo entre os grupos DEX-LipoQ e DEX-ExtrL.

A administração da dexametasona em nosso estudo também nos indicou alterações de peso do fígado dos animais. os grupos DEX e DEX-LipoB apresentaram fígado mais pesado em relação ao CONT, principalmente nos animais machos de ambos os grupos. Quanto aos animais tratados com lipossoma ou quiabo livre as fêmeas DEX-LipoQ e Dex-ExtrL não apresentaram aumento ou reduęão do peso do fígado, os machos DEX-LipoQ e DEX-ExtrL apresentaram fígado leve quando comparados ao CONT do que quando comparados em grupo DEX.

Estudos pré-clínicos e clínicos já demonstram que a administração de dexametasona, em altas doses e/ou por períodos crônicos, promove uma desregulação no metabolismo hepático da glicose que está diretamente relacionada à reduęão da ação da insulina no fígado, além disso, a dexametasona pode exercer um efeito na expressão, localização e atividade da glicoproteína-P (P-gp) hepática e renal em ratos após 4 dias de administração oral entre doses de 1 ou 25 mg/kg por dia (Micuda, Fuksa *et al.*, 2007).

## 6. CONCLUSÃO

Com esse trabalho, conclui-se que lipossoma contendo quiabo como composto bioativo foi preparado com sucesso podendo ser utilizado para a entrega da molécula ativa pela administração via gavagem em ratos de ambos os sexos.

A formulação desenvolvida teve efeitos benéficos em reduzir a intolerância à glicose dos animais considerados diabéticos induzidos por dexametasona, principalmente em ratos machos, protegendo-os contra a resistência à insulina, sendo que este efeito foi mais proeminente em fêmeas.

Também demonstramos que um período de 10 dias de superexposição a dexametasona induziu mudanças duradouras na composição corporal dos animais. Além disso, o efeito positivo dos lipossomas com quiabo se mostrou maior do que em relação ao extrato na sua forma livre.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU LILA, A. S.; ISHIDA, T. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. **Biol Pharm Bull**, v. 40, n. 1, p. 1-10, 2017. ISSN 1347-5215 (Electronic) 0918-6158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28049940> >.

ALMEIDA, B. et al. Recent Progress in Bioconjugation Strategies for Liposome-Mediated Drug Delivery. **Molecules**, v. 25, n. 23, Dec 1 2020. ISSN 1420-3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33271886> >.

ANAGNOSTIS, P. et al. Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 8, p. 2692-701, Aug 2009. ISSN 1945-7197 (Electronic) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19470627> >.

ARNER, P. Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 18 Suppl 2, p. S5-9, Mar-Apr 2002. ISSN 1520-7552 (Print) 1520-7552 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11921432> >.

ASWAL, S. et al. A Molecular Approach on the Protective Effects of Mangiferin Against Diabetes and Diabetes-related Complications. **Curr Diabetes Rev**, v. 16, n. 7, p. 690-698, 2020. ISSN 1875-6417 (Electronic) 1573-3998 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31584372> >.

BIENSO, R. S. et al. GLUT4 and glycogen synthase are key players in bed rest-induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 61, n. 5, p. 1090-9, May 2012. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22403297> >.

BONIFACIO, B. V. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24363556> >.

CAPERUTO, L. C. et al. Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats. **Endocrine**, v. 29, n. 3, p. 391-8, Jun 2006. ISSN 1355-008X (Print) 1355-008X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943575> >.

CASTELLI, W. P. et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. **JAMA**, v. 256, n. 20, p. 2835-8, Nov 28 1986. ISSN 0098-7484 (Print) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3773200> >.

CUI, A. et al. Dexamethasone-induced Kruppel-like factor 9 expression promotes hepatic gluconeogenesis and hyperglycemia. **J Clin Invest**, v. 129, n. 6, p. 2266-2278, Apr 29 2019. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31033478> >.

DABROWSKI, P.; MAJDAN, M. [Diagnosis and therapy of steroid-induced hyperglycemia based on literature reports]. **Wiad Lek**, v. 69, n. 4, p. 642-645, 2016. ISSN 0043-5147 (Print) 0043-5147 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27941203> >.

DARYABOR, G.; KABELITZ, D.; KALANTAR, K. An update on immune dysregulation in obesity-related insulin resistance. **Scand J Immunol**, v. 89, n. 4, p. e12747, Apr 2019. ISSN 1365-3083 (Electronic) 0300-9475 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30593678> >.

DE FRANCA, I. R. et al. Insulin signaling pathway in the masseter muscle of dexamethasone-treated rats. **Interv Med Appl Sci**, v. 10, n. 4, p. 226-232, Dec 2018. ISSN 2061-1617 (Print) 2061-1617 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30792919> >.

DE OLIVEIRA, J. C. et al. Metabolic imprinting by maternal protein malnourishment impairs vagal activity in adult rats. **J Neuroendocrinol**, v. 23, n. 2, p. 148-57, Feb 2011. ISSN 1365-2826 (Electronic) 0953-8194 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21091554](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21091554) >.

DISANTO, R. M.; SUBRAMANIAN, V.; GU, Z. Recent advances in nanotechnology for diabetes treatment. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 7, n. 4, p. 548-64, Jul-Aug 2015. ISSN 1939-0041 (Electronic) 1939-0041 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25641955> >.

ERFANI MAJD, N. et al. Okra (*Abelmoschus esculentus*) Improved Islets Structure, and Down-Regulated PPARs Gene Expression in Pancreas of High-Fat Diet and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Cell J**, v. 20, n. 1, p. 31-40, Apr 2018. ISSN 2228-5806 (Print) 2228-5806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29308616> >.

FACCHI, J. C. et al. Perinatal programming of metabolic diseases: The role of glucocorticoids. **Metabolism**, v. 104, p. 154047, Mar 2020. ISSN 1532-8600 (Electronic) 0026-0495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31837301> >.

FAN, S. et al. Extract of okra lowers blood glucose and serum lipids in high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 7, p. 702-9, Jul 2014. ISSN 1873-4847 (Electronic) 0955-2863 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24746837> >.

FICHNA, M.; FICHNA, P. Glucocorticoids and beta-cell function. **Endokrynol Pol**, v. 68, n. 5, p. 568-573, 2017. ISSN 2299-8306 (Electronic) 0423-104X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29168546> >.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n. 6, p. 499-502, Jun 1972. ISSN 0009-9147 (Print) 0009-9147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4337382> >.

GANNON, M. et al. Sex differences underlying pancreatic islet biology and its dysfunction. **Mol Metab**, v. 15, p. 82-91, Sep 2018. ISSN 2212-8778 (Electronic) 2212-8778 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29891438> >.

GREMLICH, S.; RODUIT, R.; THORENS, B. Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic beta cells. Comparison with the

effects of fatty acids. **J Biol Chem**, v. 272, n. 6, p. 3216-22, Feb 7 1997. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013557> >.

HAEUSLER, R. A.; MCGRAW, T. E.; ACCILI, D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 19, n. 1, p. 31-44, Jan 2018. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28974775> >.

HOJLUND, K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. **Dan Med J**, v. 61, n. 7, p. B4890, Jul 2014. ISSN 2245-1919 (Electronic) 2245-1919 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25123125> >.

HOPKINS, B. D.; GONCALVES, M. D.; CANTLEY, L. C. Insulin-PI3K signalling: an evolutionarily insulated metabolic driver of cancer. **Nat Rev Endocrinol**, v. 16, n. 5, p. 276-283, May 2020. ISSN 1759-5037 (Electronic) 1759-5029 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32127696> >.

IBANEZ, C. A. et al. A High Fat Diet during Adolescence in Male Rats Negatively Programs Reproductive and Metabolic Function Which Is Partially Ameliorated by Exercise. **Front Physiol**, v. 8, p. 807, 2017. ISSN 1664-042X (Print) 1664-042X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29163186> >.

IMRAN, M. et al. Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders. **Lipids Health Dis**, v. 16, n. 1, p. 84, May 2 2017. ISSN 1476-511X (Electronic) 1476-511X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28464819> >.

JEONG, I. K. et al. The effects of dexamethasone on insulin release and biosynthesis are dependent on the dose and duration of treatment. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 51, n. 3, p. 163-71, Mar 2001. ISSN 0168-8227 (Print) 0168-8227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11269888> >.

KHATUN, H. et al. Water-soluble Fraction of *Abelmoschus esculentus* L Interacts with Glucose and Metformin Hydrochloride and Alters Their Absorption Kinetics after Coadministration in Rats. **ISRN Pharm**, v. 2011, p. 260537, 2011. ISSN 2090-6153 (Electronic) 2090-6145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389848> >.

LI, T. et al. Type 2 diabetes is more predictable in women than men by multiple anthropometric and biochemical measures. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, p. 6062, Mar 15 2021. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33723361> >.

LIAO, Z. et al. Polysaccharide from Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) Improves Antioxidant Capacity via PI3K/AKT Pathways and Nrf2 Translocation in a Type 2 Diabetes Model. **Molecules**, v. 24, n. 10, May 17 2019. ISSN 1420-3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31108940> >.

LUNDBAEK, K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br Med J**, v. 1, n. 5291, p. 1507-13, Jun 2 1962. ISSN 0007-1447 (Print) 0007-1447 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14467359> >.

MANAIA, E. B. et al. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 4991-5011, 2017. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28761340> >.

MARTIN, S. S. et al. Comparison of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Assessment by Martin/Hopkins Estimation, Friedewald Estimation, and Preparative Ultracentrifugation: Insights From the FOURIER Trial. **JAMA Cardiol**, v. 3, n. 8, p. 749-753, Aug 1 2018. ISSN 2380-6591 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29898218> >.

MATHIAS, P. C. F. et al. Cholinergic-pathway-weakness-associated pancreatic islet dysfunction: a low-protein-diet imprint effect on weaned rat offspring. **J Dev Orig Health Dis**, p. 1-8, Apr 6 2020. ISSN 2040-1752 (Electronic) 2040-1744 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32249729> >.

MAZAYEN, Z. M. et al. Pharmaceutical nanotechnology: from the bench to the market. **Futur J Pharm Sci**, v. 8, n. 1, p. 12, 2022. ISSN 2314-7253 (Electronic) 2314-7245 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35071609> >.

MERTINS, O. et al. Structural evaluation of phospholipidic nanovesicles containing small amounts of chitosan. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 6, n. 8, p. 2425-31, Aug 2006. ISSN 1533-4880 (Print) 1533-4880 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17037851> >.

MICUDA, S. et al. Morphological and functional changes in p-glycoprotein during dexamethasone-induced hepatomegaly. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 4, p. 296-303, Apr 2007. ISSN 0305-1870 (Print) 0305-1870 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17324141> >.

MOISIADIS, V. G.; MATTHEWS, S. G. Glucocorticoids and fetal programming part 1: Outcomes. **Nat Rev Endocrinol**, v. 10, n. 7, p. 391-402, Jul 2014. ISSN 1759-5037 (Electronic) 1759-5029 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24863382> >.

NAGY, C.; EINWALLNER, E. Study of In Vivo Glucose Metabolism in High-fat Diet-fed Mice Using Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and Insulin Tolerance Test (ITT). **J Vis Exp**, n. 131, Jan 7 2018. ISSN 1940-087X (Electronic) 1940-087X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29364280> >.

NAMEKAWA, J. et al. Effects of high-fat diet and fructose-rich diet on obesity, dyslipidemia and hyperglycemia in the WBN/Kob-Lepr(fa) rat, a new model of type 2 diabetes mellitus. **J Vet Med Sci**, v. 79, n. 6, p. 988-991, Jun 10 2017. ISSN 1347-7439 (Electronic) 0916-7250 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28442647> >.

OGAWA, W.; KASUGA, M. [Insulin signaling and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus]. **Nihon Rinsho**, v. 64, n. 7, p. 1381-9, Jul 2006. ISSN 0047-1852 (Print) 0047-1852 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16838661> >.

OKYAR, A. et al. Effect of Aloe vera leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. **Phytother Res**, v. 15, n. 2, p. 157-61, Mar 2001. ISSN 0951-418X (Print) 0951-418X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268118> >.

OLAMOYEGUN, M. A.; OLUYOMBO, R.; ASAOLU, S. O. Evaluation of dyslipidemia, lipid ratios, and atherogenic index as cardiovascular risk factors among semi-urban dwellers in Nigeria. **Ann Afr Med**, v. 15, n. 4, p. 194-199, Oct-Dec 2016. ISSN 0975-5764 (Electronic) 0975-5764 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27853034> >.

OLIVEIRA, S. et al. Curcumin derivatives for Type 2 Diabetes management and prevention of complications. **Arch Pharm Res**, v. 43, n. 6, p. 567-581, Jun 2020. ISSN 0253-6269 (Print) 0253-6269 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32557163> >.

PASIEKA, A. M.; RAFACHO, A. Impact of Glucocorticoid Excess on Glucose Tolerance: Clinical and Preclinical Evidence. **Metabolites**, v. 6, n. 3, Aug 3 2016. ISSN 2218-1989 (Print) 2218-1989 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27527232> >.

PATRA, J. K. et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **J Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 71, Sep 19 2018. ISSN 1477-3155 (Electronic) 1477-3155 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30231877> >.

PIVARI, F. et al. Curcumin and Type 2 Diabetes Mellitus: Prevention and Treatment. **Nutrients**, v. 11, n. 8, Aug 8 2019. ISSN 2072-6643 (Electronic) 2072-6643 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31398884> >.

RADHAKUTTY, A.; BURT, M. G. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Critical review of the evidence underlying management of glucocorticoid-induced hyperglycaemia. **Eur J Endocrinol**, v. 179, n. 4, p. R207-R218, Oct 1 2018. ISSN 1479-683X (Electronic) 0804-4643 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30299889> >.

RAFACHO, A. et al. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 4, p. E681-9, Apr 2009. ISSN 0193-1849 (Print) 0193-1849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19158320>>.

RAFACHO, A. et al. Glucocorticoids in vivo induce both insulin hypersecretion and enhanced glucose sensitivity of stimulus-secretion coupling in isolated rat islets. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 85-95, Jan 2010. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19880808> >.

RAFACHO, A. et al. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. **J Endocrinol**, v. 223, n. 3, p. R49-62, Dec 2014.

ISSN 1479-6805 (Electronic) 0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271217> >.

REICH, E. et al. Involvement of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) in glucocorticoid-mediated beta cell death. **Diabetologia**, v. 55, n. 4, p. 1048-57, Apr 2012. ISSN 1432-0428 (Electronic) 0012-186X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22246375> >.

RIVIERE, S. et al. High Fructose Diet inducing diabetes rapidly impacts olfactory epithelium and behavior in mice. **Sci Rep**, v. 6, p. 34011, Sep 23 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27659313> >.

SALA, M. et al. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. **Int J Pharm**, v. 535, n. 1-2, p. 1-17, Jan 15 2018. ISSN 1873-3476 (Electronic) 0378-5173 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29111097> >.

SHEPARD, B. D. Sex differences in diabetes and kidney disease: mechanisms and consequences. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 317, n. 2, p. F456-F462, Aug 1 2019. ISSN 1522-1466 (Electronic) 1522-1466 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31241989> >.

SIMENTAL-MENDIA, L. E.; RODRIGUEZ-MORAN, M.; GUERRERO-ROMERO, F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. **Metab Syndr Relat Disord**, v. 6, n. 4, p. 299-304, Dec 2008. ISSN 1557-8518 (Electronic) 1540-4196 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19067533> >.

STONE, N. R. et al. Liposomal Amphotericin B (AmBisome((R))): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions. **Drugs**, v. 76, n. 4, p. 485-500, Mar 2016. ISSN 1179-1950 (Electronic) 0012-6667 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26818726> >.

STOPA, L. R. S. et al. Sex differences in glucocorticoids-induced anabolic effects in rats. **Physiol Behav**, v. 209, p. 112587, Oct 1 2019. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31247241> >.

SUKSOMBOON, N.; POOLSUP, N.; PUNTHANITISARN, S. Effect of Aloe vera on glycaemic control in prediabetes and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Pharm Ther**, v. 41, n. 2, p. 180-8, Apr 2016. ISSN 1365-2710 (Electronic) 0269-4727 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27009750> >.

THOMPSON, L. H. et al. Acute, muscle-type specific insulin resistance following injury. **Mol Med**, v. 14, n. 11-12, p. 715-23, Nov-Dec 2008. ISSN 1528-3658 (Electronic) 1076-1551 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19009015> >.

TIWARI, P.; AHMAD, K.; BAIG, M. H. Gymnema sylvestre for Diabetes: From Traditional Herb to Future's Therapeutic. **Curr Pharm Des**, v. 23, n. 11, p. 1667-1676, 2017. ISSN 1873-4286

(Electronic) 1381-6128 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27834124> >.

UNUOFIN, J. O.; LEBELO, S. L. Antioxidant Effects and Mechanisms of Medicinal Plants and Their Bioactive Compounds for the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes: An Updated Review. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2020, p. 1356893, 2020. ISSN 1942-0994 (Electronic) 1942-0994 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32148647> >.

WAGNER, V. et al. The emerging nanomedicine landscape. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 10, p. 1211-7, Oct 2006. ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17033654> >.

WESTERMARK, P.; ANDERSSON, A.; WESTERMARK, G. T. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. **Physiol Rev**, v. 91, n. 3, p. 795-826, Jul 2011. ISSN 1522-1210 (Electronic) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742788> >.

World Health Organization. Diabetes. [acesso em 2021 out. 11]. Disponível em < [https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab\\_3](https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_3) >

XU, G. et al. Prevalence of diagnosed type 1 and type 2 diabetes among US adults in 2016 and 2017: population based study. **BMJ**, v. 362, p. k1497, Sep 4 2018. ISSN 1756-1833 (Electronic) 0959-8138 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30181166> >.

YARIBEYGI, H. et al. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. **J Cell Physiol**, v. 234, n. 6, p. 8152-8161, Jun 2019. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30317615> >.

YUSUF, M.; SHARMA, V.; PATHAK, K. Nanovesicles for transdermal delivery of felodipine: Development, characterization, and pharmacokinetics. **Int J Pharm Investig**, v. 4, n. 3, p. 119-30, Jul 2014. ISSN 2230-973X (Print) 2230-9713 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25126525> >.

## 8. PATENTE

### 8.1. Título

#### COMPOSIÇÃO CONTENDO EXTRATO VEGETAL E USO NO TRATAMENTO DE DIABETES

### 8.2. Resumo

A presente invenção trata-se de uma composição contendo extrato de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) com ação hipoglicemiante, contribuindo na homeostase glicêmica de indivíduos acometidos com o diabetes mellitus, redução da intolerância a glicose e proteção contra a resistência à insulina. Em conjunto, esta invenção apresenta a associação do extrato em sistemas nanométricos para intensificar e melhorar essas atividades.

### 8.3. Relatório descritivo

#### Campo da Invenção

[01] A presente invenção trata-se de uma composição contendo extrato de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) associado a sistemas nanométricos com ação hipoglicemiante, contribuindo na homeostase glicêmica de indivíduos acometidos com o diabetes *mellitus*, redução da intolerância a glicose e proteção contra a resistência à insulina.

#### Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[02] O diabetes é uma doença metabólica crônica caracterizada por níveis elevados de glicose sanguínea. Disfunção esta que em função do tempo, promove sérios danos a órgãos e tecidos importantes do corpo, tais como o coração, vasos sanguíneos, olhos, rins e nervos. Dentre as formas do diabetes, temos o diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT 1) e tipo 2 (DMT 2). O diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é a forma mais comum, geralmente observada em adultos (Xu, Liu *et al.*, 2018).

[03] A diferença do diabetes tipo 1 para o diabetes tipo 2 está no fato de que, no primeiro caso, ocorre redução ou falta de produção de insulina; já no segundo, o organismo desenvolve uma resistência à ação desse hormônio (Tan, Mei Wong *et al.*, 2019). Também pode-se afirmar que o diabetes tipo 1 é uma doença de origem autoimune, normalmente isso acontece na infância ou na adolescência, e por isso também é chamado de Diabetes Juvenil. No caso do diabetes tipo 2, há uma grande influência genética agravada principalmente pelo estilo de vida, obesidade e sedentarismo (Ndisang, Vannacci *et al.*, 2017).

[04] Quando um paciente recebe diagnóstico de DMT2, orienta-se educação em saúde propondo mudanças no estilo de vida, através da realização de atividades físicas e de uma alimentação saudável. Além disso, ocorre a prescrição de um antidiabético oral com o intuito de promover a diminuição da glicemia e mantê-la normal (jejum <100mg/dl e pós-prandial <140mg/dl). Porém muito desses medicamentos prescritos acabam gerando efeitos adversos, dificultando a adesão do paciente ao tratamento. Isso ocorre, por exemplo, com alguns medicamentos que causam anemia e má absorção de vitamina B12, por atuar sobre a motilidade do intestino delgado diminuindo a absorção da vitamina B12 (De Oliveira, Gomes *et al.*, 2016).

[05] Atualmente o uso de plantas medicinais tem sido de grande importância para tratar diversas doenças. No caso do DMT2, o uso de alternativas terapêuticas, outras tais como o uso de plantas medicinais que proporcionem efeito hipoglicemiante. Assim como a redução dos efeitos colaterais e adversos em relação aos fármacos sintéticos (Santos *et al.*, 2014) é de grande importância para a saúde do paciente acometido com o DMT. O potencial terapêutico dos produtos naturais, seu baixo custo e efeitos colaterais mínimos vêm revolucionando e aprimorando o gerenciamento de novos medicamentos (Tiwari, Ahmad *et al.*, 2017).

[06] A fim de reduzir a glicose sanguínea, substâncias ativas de origem vegetal podem contribuir no tratamento do diabetes promovendo a redução dos níveis glicêmicos e o equilíbrio do mesmo, por exemplo, pode-se citar a mangiferina (2-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona), uma xantana de baixo peso molecular, encontrada principalmente em plantas superiores, tais como a manga. A mangiferina é um composto bioativo que possui potencial terapêutico antioxidante, hipoglicêmico e antidiabético, além de outros efeitos como ação antimicrobiana, antialérgica e imunomoduladora (Imran, Arshad *et al.*, 2017; Aswal, Kumar *et al.*, 2020).

[07] A curcumina, molécula bioativa presente no rizoma da cúrcuma vem sendo bastante estudada devido seus diferentes efeitos biológicos e farmacológicos anti-hiperglicêmicos e anti-hiperlipidêmico (Oliveira, Monteiro-Alfredo *et al.*, 2020). Em um estudo com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) os autores concluíram que a curcumina tem o potencial antidiabético e pode prevenir o desenvolvimento do DMT2 por atuar nas células β-pancreáticas, melhorando sua função secretora, bem como por diminuir a resistência periférica à insulina e dano hepático (Pivari, Mingione *et al.*, 2019).

[08] A babosa, pertencente à família Asphodelaceae, espécie *Aloe vera L.* possui alcaloides, flavonoides, taninos, fenóis, saponinas, carboidratos, vitaminas e minerais.

Recentemente estudos científicos têm dado suporte para a ação antidiabética e antioxidante dessa planta (Suksomboon, Poolsup *et al.*, 2016; Mckennon, Schauerhamer *et al.*, 2018).

[09] Nesse contexto do uso de plantas medicinais, o quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.), uma planta da família Malvacea, hortícola de alto valor alimentício, de fácil cultivo, contém na sua composição compostos fenólicos, incluindo quercetina, quercetina-3-O-glicosídeo (isoquercitrina) e rutina (Erfani Majd, Tabandeh *et al.*, 2018). Esses compostos fenólicos e as fibras solúveis podem atuar na homeostase glicêmica, já que estudos apontam que a fibra alimentar, comum em alimentos funcionais promovem efeitos importantes no controle dos níveis glicêmicos pós-prandial (Khatun, Rahman *et al.*, 2011). Então, uma forma de trazer a homeostase glicêmica em indivíduos portadores do diabetes é utilizar as fibras solúveis, compostos fenólicos e ingredientes antioxidantes presente no quiabo como opção de tratamento do diabetes (Bonifacio, Silva *et al.*, 2014).

[10] O uso da fração solúvel em água do extrato de quiabo sem associação em sistemas tecnológicos, quando administrado *in vivo* permitiu o controle dos níveis glicêmicos, reduziu a intolerância à glicemia, além de proteger contra resistência à insulina e controle no perfil lipídico, sendo uma alternativa para o controle do diabetes (Khatun, Rahman *et al.*, 2011). Além disso, 200 mg/kg de pó de quiabo administrado *in vivo* diminuiu os danos histológicos do pâncreas e melhorar o reparo das células beta pancreáticas (Erfani Majd, Tabandeh *et al.*, 2018).

[11] A patente concedida em 2013 (CN 103976293 A) envolve um método de produção de pó de frutas de quiabo, com efeito hipoglicêmico. E a patente concedida em 2013 (CN 103239490 A) apresentou um extrato de *abelmoschus manihot* utilizado para o tratamento de DMT2, nefropatia diabética e outras complicações da doença.

[12] A patente concedida em 2019 (CN 109646593 A) descreveu uma preparação dietética da medicina chinesa contendo componentes medicinais tradicionais chineses como o *Radix Ophiopogonis*, inhame chinês e associações a fim de reduzir a glicose sanguínea. Porém nenhuma dessas patentes envolveu a associação do extrato do quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) em nanoestruturas. Na patente (US 2016331795 A1), as partes comestíveis (opcionalmente processadas) de espécies do quiabo pertencente ao gênero *Abelmoschus* foram utilizadas na redução da absorção de gordura dietética e no tratamento do diabetes e outras síndromes metabólicas. O extrato de quiabo também apresentou aplicação cosmética na patente (TW 200930411 A). Essa refere-se ao extrato de *Abelmoschus esculentus* L. que possui função de preservação da umidade, podendo ser utilizada em materiais cosméticos como ingrediente primário de conservação de umidade. Novamente, nenhuma dessas

proteções intelectuais associaram o extrato a sistemas nanométricos como é o caso dessa invenção.

[13] A patente (CN 103919074 A) apresentou o preparo de *Abelmoschus esculentus* L. fritos com diferentes sabores. O preparado da invenção manteve cor, aroma, sabor e componentes nutricionais do quiabo e foram adequados para diferentes públicos, incluindo crianças, jovens, pessoas de meia-idade e idosos, pacientes com diabetes *mellitus* e semelhantes. A patente KR 102277058 B1 refere-se a uma composição farmacêutica para prevenção ou tratamento de diabetes *mellitus*, trombose, contendo um extrato de *Abelmoschus manihot* como ingrediente ativo. A patente CN 101313942 A, forneceu uma composição do ruibarbo e a flor de *Abelmoschus manihot* que são extraídos respectivamente e misturados, e a composição tem um efeito curativo óbvio em doenças renais, em particular nefropatia diabética, então, todas as patentes envolvem ativos não associados a sistemas tecnológicos, como é o caso do nosso trabalho.

[14] Nessa invenção, diferente das patentes citadas, utilizou-se apenas o fruto do quiabo para obter o extrato aquoso do *Abelmoschus esculentus* L. associado à nanoestrutura que proporcionou um efeito hipoglicemiante, proteção contra intolerância à glicose e resistência à insulina. Observou-se que a associação de extratos aquosos em carreadores formados por vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas concêntricamente em torno de um compartimento aquoso, bem como em outro tipo de nanoestrutura possibilitou o aumento da estabilidade e eficácia clínica de respectivos ativos. A maioria dos constituintes biologicamente ativos dos extratos, como por exemplo, flavonoides e taninos, são altamente solúveis em água, porém com baixa absorção, sendo incapazes de atravessar as membranas lipídicas das células, possuem tamanho molecular excessivamente alto ou são pouco absorvidos, resultando em perda de biodisponibilidade e eficácia (Bonifacio, Silva *et al.*, 2014). Diante desses obstáculos, tem sido proposto combinar ativos vegetais com nanotecnologia, pois nanossistemas são capazes de potencializar a ação de extratos vegetais, reduzindo a dose necessária e efeitos indesejáveis, além de fornecer o constituinte ativo em uma concentração suficiente durante todo o período de tratamento, uma vez que muitos tratamentos convencionais não proporcionam esses requisitos (Bonifacio, Silva *et al.*, 2014; Abu Lila e Ishida, 2017).

[15] Sistemas nanométricos podem ser constituídos de compostos biodegradáveis, mostram-se estáveis frente a determinada faixa de pH e temperatura e são muito bem recomendados em aplicações clínicas (Bonifacio, Silva *et al.*, 2014). Por exemplo os

lipossomas que são sistemas desenvolvidos com a associação de fosfolipídios em soluções aquosas podendo formar estruturas fechadas em bicamadas (Almeida, Nag *et al.*, 2020).

[16] Observam-se nessa invenção, as contribuições biológicas avaliadas e descritas usando os componentes presentes no extrato de *Abelmoschus esculentus* L. como um todo, sem qualquer isolamento de algum composto facilitou e reduziu custos perante a obtenção do extrato, bem como o desenvolvimento dos sistemas tecnológicos que são altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e a nível industrial.

#### Descrição detalhada da Invenção

[16] “A presente invenção trata-se de uma “COMPOSIÇÃO CONTENDO EXTRATO VEGETAL E USO NO TRATAMENTO DE DIABETES”, caracteriza-se pela aplicação do extrato de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) associado a nanoestruturas e poderão estar incorporados à bases líquidas, semissólidas ou sólidas. Essa composição possui ação hipoglicemiante, contribuindo na homeostase glicêmica de indivíduos acometidos com o diabetes *mellitus*, redução da intolerância a glicose e proteção contra a resistência à insulina.

[18] Os referidos sistemas nanométricos contêm compostos ativos vegetais podendo estar associados com agentes antioxidantes, tensoativos, agentes estruturantes, polímeros, fosfolipídios, colesterol, marcadores luminescentes, entre outros. Essa composição pode ser administrada sem associação e associadas a formas farmacêuticas líquidas como solução, suspensão, xarope, entre outros, e ainda pode ser incorporada em formas farmacêuticas sólidas como comprimidos, cápsulas, pós, drágeas, entre outros, na concentração de 0,3 a 50%, preferencialmente 1,5%.

[19] As nanoestruturas referidas nesta invenção estão envolvidas no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica (menores de 1000 nm) que variam desde nanopartículas poliméricas, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões entre outros.

[20] A presente invenção compreende em nanoestruturas contendo compostos ativos vegetais com ação hipoglicemiante, contribuindo na homeostase glicêmica de indivíduos acometidos com o diabetes *mellitus*, redução da intolerância a glicose e proteção contra a resistência a insulina, por exemplo, o extrato aquoso do quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) empregado na concentração de 0,3 a 50%, preferencialmente 1,5% de peso total.

[21] De acordo com esta invenção, as nanoestruturas podem compreender por agentes antioxidantes naturais e sintéticos, como os polifenóis, vitaminas, enzimas antioxidantes, tocoferol, ácido ascórbico, hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA),

entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0,001 a 5% de peso total.

[22] De acordo com esta invenção, os tensoativos que constam nas nanoestruturas compreendem um ou mais tensoativos aniônicos, um ou mais tensoativos catiônicos, também tensoativos anfóteros e não iônicos como por exemplo, Tween 20<sup>®</sup>, Tween 60<sup>®</sup>, Tween 80<sup>®</sup>, Span 20<sup>®</sup>, Span 60<sup>®</sup>, Span 80<sup>®</sup>, Triton-X, Amida 80<sup>®</sup>, Éter sulfocinato de sódio, Éter laurílico etoxilado, cloreto de benzalcônio, cloreto de cetil trimetil amônio, entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0,1 a 35% de peso total.

[23] De acordo com esta invenção, as nanoestruturas podem compreender óleos estruturantes como triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico, também aqueles de origem vegetal, como óleo de coco, óleo de semente de uva, óleo de mamona, óleo de oliva, óleo de pequi, óleo de manga, óleo de abacate, óleo de copaíba, entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0,01 a 50% de peso total.

[24] De acordo com esta invenção, as nanoestruturas podem apresentar polímeros na sua composição, como, por exemplo, poli(ácido láctico) (PLA), poli(i(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e da policaprolactona (PCL), derivados de metacrilato como eudragit RL<sup>®</sup>, eudragit RS<sup>®</sup>, eudragit R<sup>®</sup>, eudragit S<sup>®</sup>, quitosana e derivados de celulose, polietilenoglicol, entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0 a 50% de peso total.

[25] De acordo com esta invenção, as nanoestruturas podem apresentar lipídios como fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomielina, que tendem a ser estável em solução aquosa, colesterol, entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0 a 50% de peso total.

[26] De acordo com esta invenção, as nanoestruturas podem ser marcadas com compostos luminescentes, como por exemplo, o rutênio, 9-aminoacridina, auramina, cumarinas, 4',6'-diamino-2-fenil-indol, iodeto de propídio, azul de metileno, vermelho do Nilo, rodamina, quercetina, cádmio, selênio, telúrio, entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0 a 35% de peso total.

[27] Os auxiliares farmacêuticos presentes na invenção, compreendem adjuvantes ou excipientes utilizados em conjunto ou separadamente e são preferencialmente do tipo diluentes como talco, lactose, amido, celulose, entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0 a 90% de peso total.

[28] Os auxiliares farmacêuticos presentes na invenção, compreendem os umectantes como polivinilprolactona, gelatina, cetiol, glicerol, óleo mineral, óleos vegetais, entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0 a 50% de peso total.

[29] Os auxiliares farmacêuticos presentes na invenção, compreendem os desintegrantes e desagregantes como a celulose microcristalina, carmelose, amidos como o amido natural, amido modificado e amido pré-gelatinizado, alginato de sódio, entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0 a 50% de peso total.

[30] Os auxiliares farmacêuticos presentes nesta invenção, compreendem os lubrificantes como ácido esteárico, talco, estearato de magnésio, entre outros. Utilizados de 1,5% de peso total

[31] Os auxiliares farmacêuticos presentes nesta invenção compreendem os promotores de reologia como derivados da sílica, molhantes como lauril sulfato de sódio e polissorbato 80. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0 a 50% de peso total.

[32] Os auxiliares farmacêuticos presentes nesta invenção compreendem os revestidores como xarope, goma arábica, goma adraganta, polímeros entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0 a 50% de peso total.

[33] Os auxiliares farmacêuticos presentes na invenção, compreendem invólucro gelatinoso ou tapioca, à base de amido, também do tipo material plastificante, opacificantes entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0 a 50% de peso total.

[34] Os auxiliares farmacêuticos presentes nesta invenção compreendem os conservantes de origem natural ou sintético como metilparabeno, butilparabeno, ácido benzoico, benzoato de sódio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, imidazoilidilureia, entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0 a 8% de peso total.

[35] Os auxiliares farmacêuticos presentes nesta invenção compreendem os flavorizantes como sacarose, óleos essenciais, derivados de baunilha, mentol, framboesa, xaropes, entre outros. Utilizados separadamente ou combinados na concentração de 0 a 15% de peso total.

[36] As principais preparações e medicamentos antidiabéticos são representados por formas farmacêuticas líquidas como solução e sólidas como comprimidos, cápsulas, drágeas, entre outros. Aqui nesta invenção mostraremos formulações contendo nanoestruturas bem

como sua composição e resultados com a finalidade de demonstração de invenção, porém, sem limitações.

## EXEMPLO 1: PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS NANOMÉTRICOS

### 1.1 Preparação do sistema nanométrico

[37] Dentre os tipos de nanossistemas existentes, um exemplo desenvolvido nessa invenção é o lipossoma contendo quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) preparado através do método de evaporação em fase reversa (Mertins, Cardoso *et al.*, 2006), seguido de extrusão do filme lipídico. A fase orgânica contendo fosfatidilcolina, colesterol e clorofórmio e a fase aquosa preparada contendo solução salina tamponada em fosfato (pH 7,4) e polissorbato 80 foram preparadas separadamente. As fases foram vertidas, mantendo parte da fase aquosa para posterior utilização e remoção do solvente em evaporador rotatório à 25°C sob pressão reduzida até a formação de um filme fino. Este filme foi hidratado adicionando o restante da fase aquosa e submetido à agitação novamente.

[38] Os lipossomas contendo extrato do quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) apresentaram diâmetro médio de vesícula de 280 nm por difração de laser, índice de polidispersão de 1,39. Observou-se baixa variação no diâmetro médio dos lipossomas desenvolvidos, apresentando sistema monomodal e homogêneo. O potencial zeta igual a -31,46 e o pH permaneceu em torno de 7,0 demonstrando estabilidade do mesmo.

[39] Os lipossomas contendo extrato do quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) foram administrados em modelo experimental com ratos wistar (machos e fêmeas) diabéticos, na concentração de 1,5 mg/kg diariamente por 5 dias.

EXEMPLO 2. Composição hipoglicemiante na forma de solução.

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
Lipossomas contendo o extrato de ( <i>Abelmoschus esculentus</i> L.)	1,5 %
Solução tampão (pH 7,4) qsp	100 mL

[40] Preparação da composição líquida: O processo de preparação consiste na obtenção inicial das estruturas nanométricas e diluição direta em solução tampão com pH 7,4.

EXEMPLO 3: Composição hipoglicemiante na forma de comprimido

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
--------------------	-------------------

Lipossomas contendo o extrato de ( <i>Abelmoschus esculentus</i> L.) seco	1,5 %
Estearato de magnésio	0,25%
Talco	30%
Aerosil	1%
Lauril Sulfato de Sódio	2%
Lactose Monoidratada qsp	100%

[41] Preparação da composição sólida: O processo de preparação consiste na secagem do lipossoma por liofilização por 24 horas para posterior desenvolvimento dos comprimidos. Os comprimidos obtidos por granulação a seco, obtendo uma mistura inicial que é comprimido com auxílio de compressora.

EXEMPLO 4: Exemplo da aplicação das composições contendo os sistemas tecnológicos.

[42] A presente invenção pertence ao campo técnico de medicamentos e refere-se particularmente a composições inovadoras através das formulações contendo extrato do quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) nanoestruturados com ação hipoglicemiante, contribuindo na homeostase glicêmica de indivíduos acometidos com o diabetes mellitus, redução da intolerância a glicose e proteção contra a resistência à insulina.

[43] A presente invenção também diz respeito à aplicação das composições pela via oral como tratamento do diabete *mellitus*. As composições podem ser administradas pela via oral em casos de hiperglicemia com intuito de trazer a homeostase glicêmica, redução da intolerância a glicose e proteção contra a resistência à insulina.

[44] Para o desenvolvimento dessa invenção, ratos *Wistar* machos e fêmeas diabéticos fizeram o uso por via oral do extrato do quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) lipossomado com características homogêneas, aspecto leitoso e branco após aprovação do comitê de ética (Processo N° 23108.070797/2021-42) e desenvolvimento das formulações.

[45] Todos os animais de ambos os sexos tratados com extrato do quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) associado à nanoestrutura apresentaram redução na glicemia ao longo do experimento quando comparados aos demais grupos. Diante do teste de intolerância a glicose (ipGTT), a composição demonstrou efeitos benéficos com a redução da intolerância à glicemia, além da proteção frente a resistência à insulina em ambos os sexos.

[46] Conseqüentemente a potencialização do benefício terapêutico hipoglicemiante da composição pode ser explicada pela associação à nanossistemas contendo o extrato de *Abelmoschus esculentus* L.. No qual os ativos podem interagir com tecidos periféricos através de mecanismos de interação nanoestrutura/célula, adsorção, endocitose e fusão e intercâmbio. Assim, acredita-se que a encapsulação do *Abelmoschus esculentus* L. nesse estudo conseguiu atingir tecidos importantes na resposta à ação da insulina, como fígado, pâncreas, musculo e tecido adiposo. Reduzindo os níveis de glicemia muito próximos aos níveis normoglicêmicos. Acredita-se que os nanossistemas carregaram o extrato de *Abelmoschus esculentus* L. fazendo com que os ativos permanecessem por mais tempo em circulação, atingindo níveis plasmáticos elevados e ampla distribuição pelos tecidos sendo uma alternativa importante para melhorar a eficácia de medicamentos no tratamento do diabetes *mellitus*.

[47] Perante os documentos especificados, a invenção usa extrato de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) como princípio ativo contendo ação hipoglicemiante, contribuindo na homeostase glicêmica de indivíduos acometidos com o diabetes mellitus, redução da intolerância a glicose e proteção contra a resistência a insulina após ser associados a sistemas nanométricos.

### 8.3. Referências bibliográficas

ABU LILA, A. S.; ISHIDA, T. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. **Biol Pharm Bull**, v. 40, n. 1, p. 1-10, 2017. ISSN 1347-5215 (Electronic) 0918-6158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28049940> >.

ALMEIDA, B. et al. Recent Progress in Bioconjugation Strategies for Liposome-Mediated Drug Delivery. **Molecules**, v. 25, n. 23, Dec 1 2020. ISSN 1420-3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33271886> >.

ASWAL, S. et al. A Molecular Approach on the Protective Effects of Mangiferin Against Diabetes and Diabetes-related Complications. **Curr Diabetes Rev**, v. 16, n. 7, p. 690-698, 2020. ISSN 1875-6417 (Electronic) 1573-3998 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31584372> >.

BONIFACIO, B. V. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 1-15, 2014. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24363556> >.

DE OLIVEIRA, J. C. et al. Protein Restriction During the Last Third of Pregnancy Malprograms the Neuroendocrine Axes to Induce Metabolic Syndrome in Adult Male Rat Offspring. **Endocrinology**, v. 157, n. 5, p. 1799-812, May 2016. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27007071> >.

ERFANI MAJD, N. et al. Okra (*Abelmoschus esculentus*) Improved Islets Structure, and Down-Regulated PPARs Gene Expression in Pancreas of High-Fat Diet and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Cell J**, v. 20, n. 1, p. 31-40, Apr 2018. ISSN 2228-5806 (Print) 2228-5806 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29308616> >.

IMRAN, M. et al. Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders. **Lipids Health Dis**, v. 16, n. 1, p. 84, May 2 2017. ISSN 1476-511X (Electronic) 1476-511X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28464819> >.

KHATUN, H. et al. Water-soluble Fraction of *Abelmoschus esculentus* L Interacts with Glucose and Metformin Hydrochloride and Alters Their Absorption Kinetics after Coadministration in Rats. **ISRN Pharm**, v. 2011, p. 260537, 2011. ISSN 2090-6153 (Electronic) 2090-6145 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22389848> >.

MCKENNON, S. A. et al. Assessing pharmacy student confidence to answer patient questions regarding herbal medicines and natural product drugs. **Curr Pharm Teach Learn**, v. 10, n. 5, p. 643-650, May 2018. ISSN 1877-1300 (Electronic) 1877-1297 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29986825> >.

MERTINS, O. et al. Structural evaluation of phospholipidic nanovesicles containing small amounts of chitosan. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 6, n. 8, p. 2425-31, Aug 2006. ISSN 1533-4880 (Print) 1533-4880 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17037851> >.

NDISANG, J. F.; VANNACCI, A.; RASTOGI, S. Insulin Resistance, Type 1 and Type 2 Diabetes, and Related Complications 2017. **J Diabetes Res**, v. 2017, p. 1478294, 2017. ISSN 2314-6753 (Electronic). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29279853> >.

OLIVEIRA, S. et al. Curcumin derivatives for Type 2 Diabetes management and prevention of complications. **Arch Pharm Res**, v. 43, n. 6, p. 567-581, Jun 2020. ISSN 0253-6269 (Print) 0253-6269 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32557163> >.

PIVARI, F. et al. Curcumin and Type 2 Diabetes Mellitus: Prevention and Treatment. **Nutrients**, v. 11, n. 8, Aug 8 2019. ISSN 2072-6643 (Electronic) 2072-6643 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31398884> >.

SUKSOMBOON, N.; POOLSUP, N.; PUNTHANITISARN, S. Effect of Aloe vera on glycaemic control in prediabetes and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Pharm Ther**, v. 41, n. 2, p. 180-8, Apr 2016. ISSN 1365-2710 (Electronic) 0269-4727 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27009750> >.

TAN, S. Y. et al. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. **Diabetes Metab Syndr**, v. 13, n. 1, p. 364-372, Jan - Feb 2019. ISSN 1878-0334 (Electronic) 1871-4021 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30641727> >.

TIWARI, P.; AHMAD, K.; BAIG, M. H. Gymnema sylvestre for Diabetes: From Traditional Herb to Future's Therapeutic. **Curr Pharm Des**, v. 23, n. 11, p. 1667-1676, 2017. ISSN 1873-4286 (Electronic) 1381-6128 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27834124> >.

XU, G. et al. Prevalence of diagnosed type 1 and type 2 diabetes among US adults in 2016 and 2017: population based study. **BMJ**, v. 362, p. k1497, Sep 4 2018. ISSN 1756-1833 (Electronic) 0959-8138 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30181166> >.

ZHIA, L, K. “Composition comprising okra for use in reducing dietary fat absorption”, US 2016331795 A1. Nov. 17, 2016.

ZHONGHUA, L. “Production process for frying abelmoschus esculentus with different tastes at low temperature in vacuum”, CN 103919074 A. Aug. 19, 2015.