

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Camille Gaube Guex

AVALIAÇÃO DAS TOXICIDADES AGUDA E SUBAGUDA DA *Olea europaea* L. E SEU EFEITO NO METABOLISMO DE RATOS DIABÉTICOS

Santa Maria, RS
2016

Camille Gaube Guex

AVALIAÇÃO DAS TOXICIDADES AGUDA E SUBAGUDA DA *Olea europaea* L. E SEU EFEITO NO METABOLISMO DE RATOS DIABÉTICOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Liliane de Freitas Bauermann
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Gilberti Helena Hübscher Lopes

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Guex, Camille Gaube

AVALIAÇÃO DAS TOXICIDADES AGUDA E SUBAGUDA DA *Olea europaea* L. E SEU EFEITO NO METABOLISMO DE RATOS DIABÉTICOS / Camille Gaube Guex.-2016.

87 p.; 30cm

Orientadora: Liliane de Freitas Bauermann

Coorientadora: Gilberti Helena Hübscher Lopes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2016

1. Diabetes Mellitus 2. Folhas 3. Oliva 4. Toxicidade
I. Bauermann, Liliane de Freitas II. Lopes, Gilberti
Helena Hübscher III. Título.

Camille Gaube Guex

AVALIAÇÃO DAS TOXICIDADES AGUDA E SUBAGUDA DA *Olea europaea* L. E SEU EFEITO NO METABOLISMO DE RATOS DIABÉTICOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovado em 04 de março de 2016:

Liliane de Freitas Bauermann, Dr.^a (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Gilberti Helena Hübscher Lopes, Dr.^a (UFSM)
(Coorientadora)

Maria Amália Pavanato, Dr.^a (UFSM)

Michel Mansur Machado, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS
2016

*À minha família e amigos,
pelo amor e apoio incondicionais,
dedico este trabalho.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais e irmãos, sempre presentes durante todo o processo de pesquisa, me incentivando e inspirando a buscar sempre mais. Meu muito obrigada por proporcionarem a oportunidade e o apoio para estar aqui hoje.

Aos colegas que, durante o período, tive a honra de tê-los como amigos: Fernanda (miga, sua loca), obrigada por toda a ajuda prestada, pelos finais de semana no laboratório, por todos os cálculos, mas, principalmente, pela amizade e incansáveis risadas que, com certeza, deixaram nossos experimentos mais “de boa”. Robson (Rob!), com certeza aprendi muito mais do que estatística contigo, obrigada pela amizade e por sempre querer ensinar! Com vocês, o caminho percorrido se tornou muito mais fácil!

Aos ajudantes “pra toda hora”, Dida, Patrícia e Pedro, amigos que ganhei, obrigada por toda ajuda e companheirismo!

À grande revisora Juliana (*brow Ju*), mas mais que isso, uma amiga, parceira de muitas risadas, muito obrigada pela ajuda (e pelas risadas)!

Aos amigos de longa data, Felipe (obrigada por toda assistência técnica!), Ana Elize e Daiane, obrigada pela amizade!

Aos colegas do LaFEx pela ajuda em experimentos e muitas risadas no laboratório.

À minha orientadora e professora Liliane, mas muito mais que isso, uma amiga com o coração do tamanho do mundo! Obrigada pelo acolhimento, pelos ensinamentos e ajuda para que pudesse estar aqui.

À professora Gilberti, que tive a honra de tê-la como coorientadora, obrigada pela amizade e conhecimento adquirido.

Aos professores que contribuíram para minha formação acadêmica, fazendo com que buscasse cada vez mais conhecimento.

À secretária do curso de pós-graduação em Farmacologia, Zeli, pelas incontáveis dúvidas sempre respondidas com um sorriso no rosto!

Ao laboratório de análises clínicas LABIMED, pela ajuda prestada para que os testes pudessem ser realizados.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de ensino e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Eu acredito no impossível, sim. Algumas coisas eu não consegui alcançar: algumas não, muitas! E não acho isso ruim, não. É bonito saber que nem tudo está ao nosso alcance, que nem tudo será nosso quando a gente desejar. Isso deixa a humildade sempre educada e evita que o seu ego cresça mais do que você.

Pedro Gabriel, Eu Me Chamo Antônio

RESUMO

AVALIAÇÃO DAS TOXICIDADES AGUDA E SUBAGUDA DA *Olea europaea* L. E SEU EFEITO NO METABOLISMO DE RATOS DIABÉTICOS

AUTORA: Camille Gaube Guex

ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann

COORIENTADORA: Gilberti Helena Hübscher Lopes

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia, resistência à insulina e dislipidemia. É amplamente distribuída pelo mundo e afeta milhões de pessoas, podendo causar sérias complicações. A oliva (*Olea europaea* L.) possui importantes atividades farmacológicas, entre elas, antioxidante, anti-inflamatória e hipoglicêmica. Entretanto, estudos sobre sua toxicidade ainda são limitados na literatura. Assim, o objetivo do trabalho foi investigar as toxicidades oral aguda e subaguda da tintura das folhas de oliva (TOL) e avaliar o efeito da TOL no metabolismo de ratos diabéticos induzidos por dieta hipercalórica e baixa dose de estreptozotocina (STZ). Na toxicidade aguda, uma única dose 2000 mg/kg de TOL foi administrada e a observação foi feita durante 14 dias e incluiu mudanças de comportamento e sinais de toxicidade. No estudo subagudo, a TOL foi administrada durante 28 dias nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. Ambos tratamentos foram via oral (gavagem) em ratos machos e fêmeas e o peso corporal foi registrado. Ao final dos experimentos, o sangue foi coletado para análises bioquímicas e hematológicas. A dose de 2000 mg/kg não induziu mortalidade ou sinais de toxicidade. Os animais expostos às doses repetidas não apresentaram anormalidades ou mudanças hematológicas. Na dose de 400 mg/kg, a TOL aumentou os níveis de ureia e reduziu a atividade da AST em machos quando comparado aos diferentes grupos. Os níveis de glicose reduziram em machos e fêmeas tratados com TOL em diferentes doses quando comparados ao grupo controle. Não foi observada mudança significativa no peso corporal dos animais nos tratamentos agudo e subagudo. Para indução do DM, os animais foram alimentados com dieta hipercalórica durante 4 semanas e, então, administrado STZ (35 mg/kg), via i.p., enquanto que o grupo controle recebeu ração padrão e apenas o tampão citrato, via i.p. Os ratos que apresentaram glicemia maior que 200 mg/dL foram considerados diabéticos. Os animais foram divididos em 5 grupos: grupo I. controle negativo; grupo II. diabéticos tratados com etanol; grupo III. diabéticos tratados com metformina (250 mg/kg) e grupos IV e V. diabéticos tratados com TOL (200 mg/kg e 400 mg/kg, respectivamente). A administração foi via oral, diariamente, durante 10 semanas. Análises bioquímicas e hematológicas foram realizadas, assim como a peroxidação lipídica e atividade antioxidante. A atividade da ALT foi reduzida nos grupos tratados com metformina e TOL (200 mg/kg) quando comparada ao grupo controle e um aumento da ureia foi observado no grupo tratado com TOL (200 mg/kg) em comparação ao controle. O tratamento com TOL melhorou os níveis dos marcadores inflamatórios (IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ) e das adipocinas (leptina, adiponectina e resistina) quando comparados aos animais diabéticos. Não houve diferença significativa nos níveis de MDA, bem como nenhuma alteração foi observada nas atividades antioxidante. Esses resultados indicam que a exposição à uma única ou repetidas doses não induziu toxicidade e uma potencial atividade anti-diabética da tintura das folhas de oliva, porém mais estudos são necessários para validar seus efeitos clínicos e sua segurança para uso em humanos.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus. Oliva. Folhas. Toxicidade.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF ACUTE AND SUBACUTE TOXICITIES OF *Olea europaea* L. AND ITS EFFECT IN METABOLISM OF DIABETIC RATS

AUTHOR: Camille Gaube Guex
ADVISOR: Liliane de Freitas Bauermann
CO-ADVISOR: Gilberti Helena Hübscher Lopes

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia, insulin resistance and dyslipidemia. It is widely distributed worldwide, affecting millions of people and can lead to serious complications. Olive (*Olea europaea* L.) has important pharmacological activities, including antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic. However, studies about its toxicity are still limited in the literature. Therefore, the aim of this study was to investigate the acute and subacute oral toxicities of the tincture of olive leaves (TOL) and evaluate the effect of TOL in metabolism of diabetic rats induced by high-fat diet and low dose of streptozotocin (STZ). In acute toxicity, a single dose of 2000 mg/kg of TOL was administered and observation was during 14 days, including behavior changes and signs of toxicity. In subacute study, TOL was administered for 28 days in the doses of 100, 200 and 400 mg/kg. Both treatments were by oral gavage in male and female rats and body weight was recorded. At the end of the experiment, blood was collected for biochemical and hematological analyses. The dose of 2000 mg /kg did not induce mortality or signs of toxicity. Animals exposed to repeated doses did not show abnormalities or hematological changes. At dose of 400 mg/kg, TOL increased levels of urea and reduced AST activity in males when compared to the different groups. Glucose levels decreased in males and females treated with TOL at different doses compared to controls. There was no significant change in body weight of animals in acute and subacute treatments. For the induction of experimental DM, animals were fed with a high-fat diet for 4 weeks and then was administered streptozotocin (35 mg/kg), via i.p., while the control group received regular diet and only citrate buffer via i.p. Rats with glucose levels above 200 mg/dL were considered diabetic. The animals were divided into 5 groups: Group I. negative control; Group II. diabetic treated with ethanol (51%); group III. diabetic treated with metformin (250 mg/kg) and groups IV and V. diabetic treated with TOL (200 mg/kg and 400 mg/kg, respectively). The administration was by oral gavage, daily, for 10 weeks. Hematologic and biochemical analyses were performed, as well as lipid peroxidation and antioxidant activity. The ALT activity was reduced in the groups treated with metformin and TOL (200 mg/kg) when compared to the control group and an increase in urea was observed in the group treated with TOL (200 mg/kg) compared to the control group. Treatment with TOL improved the levels of inflammatory markers (IL-6, IL-10, TNF- α and INF- γ) and adipokines (leptin, adiponectin and resistin) when compared to diabetic animals. There was no significant difference in MDA levels and no changes were observed in antioxidant activities. These results indicate that the exposure to a single or repeated doses did not induce toxicity and a potential anti-diabetic activity of tincture of olive leaves, but more studies are needed to validate its clinical effects and its safety for use in humans.

Keywords: Diabetes Mellitus. Olive. Leaves. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1. *Olea europaea* L. (oliva) – Aspecto geral. Disponível em: <<http://umtrilhonaflorista7b.blogspot.com.br/2011/01/oliveira.html>>...17

MANUSCRITO 1

Figure 1. Percentage inhibition of DPPH by different concentrations of olive tincture compared with standard ascorbic acid.....42

MANUSCRITO 2

Figure 1. Effect of TOL on body weight of animals (n=5)67

Figure 2. Effect of TOL on insulin level in rats. Columns represent the mean \pm standard deviation (SD) (n = 5). *Significantly different from diabetic group: $p < 0.0001$68

Figure 3. Effect of TOL on glucose (A) and HbA1c (B) level in rats. Columns represent the mean \pm SD (n = 5). #Significantly different from control group: $p < 0.0001$. *Significantly different from diabetic group: $p < 0.0001$69

Figure 4. Effect of TOL on inflammatory biomarkers. (A) IL-6 and IL-10, (B) TNF- α (expressed in pg/mL) and IFN- γ (expressed in μ g/mL). Columns represent the mean \pm SD (n = 5). #Significantly different from control group: $p < 0.0001$. *Significantly different from diabetic group: $p < 0.0001$70

Figure 5. Effect of TOL on adipokines in rats. (A) Leptin (expressed in ng/mL) and ghrelin (expressed in pg/mL), (B) Adiponectin and resistin. Columns represent the mean \pm SD (n = 5). #Significantly different from control group: $p < 0.0001$. *Significantly different from diabetic group: $p < 0.0001$71

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

- Table 1. Total polyphenols content and total flavonoids in the tincture of *Olea europaea* L. leaves expressed on mg gallic acid (GAE)/g dry fraction and mg rutin (RE)/g dry fraction, respectively. 50% Inhibitory Concentration (IC₅₀) determined by DPPH method. Data are expressed as mean ± standard deviation (S.D).....42
- Table 2. Hematological parameters in rats treated with *Olea europaea* L. at single dose of 2000 mg/kg. The results are expressed as mean ± standard deviation (S.D), *n*=3 (*per gender*). *Significantly different from control group: *p*<0.05.....43
- Table 3. Biochemical parameters in rats treated with *Olea europaea* L. at single dose of 2000 mg/kg. The results are expressed as mean ± standard deviation (S.D), *n*=3 (*per gender*). *Significantly different from control group: *p*<0.05.....44
- Table 4 Hematological parameters of male rats after 28 days treatment with *Olea europaea* L. at doses of 100, 200 and 400 mg/kg. The results are expressed as mean ± standard deviation (S.D), *n*=5. No significant differences were observed.....44
- Table 5. Hematological parameters of female rats after 28 days treatment with *Olea europaea* L. at doses of 100, 200 and 400 mg/kg. The results are expressed as mean ± standard deviation (S.D), *n*=5. No significant differences were observed.....45
- Table 6. Biochemical parameters of male rats after 28 days treatment with *Olea europaea* L. at doses of 100, 200 and 400 mg/kg. The results are expressed as mean ± standard deviation (S.D), *n*=5. * Significantly different from control: *p*<0.05. #Significantly different from 100 mg/kg: *p*<0.05. **Significantly different from groups: *p*<0.05.....46
- Table 7. Biochemical parameters of female rats after 28 days treatment with *Olea europaea* L. at doses of 100, 200 and 400 mg/kg. The results are expressed as mean ± standard deviation (S.D), *n*=5. #Significantly different from 400 mg/kg group: *p*<0.05.....46

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- ALT** – Alanina aminotransferase, do ingls *alanine aminotransferase*
ANOVA – Análise de varincia, do ingls *analysis of variance*
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST – Aspartato aminotransferase, do inglês *aspartate aminotransferase*
BUN – Níveis de ureia, do inglês *blood urea nitrogen levels*
CAT – Catalase
CHOL – Colesterol total, do inglês *total cholesterol*
CRE – Creatinina, do inglês *creatinine*
DM – Diabetes mellitus
DMT1 – Diabetes mellitus tipo 1
DMT2 – Diabetes mellitus tipo 2
DNA – cido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*
DPPH – 2,2-difenil,1-picrihidrazila
EROs – Espécies reativas de oxignio
GAE – Equivalente de ácido gálico, do inglês *gallic acid equivalent*
GLU – Glicose, do inglês *glucose*
GLUT-2 – Transportador de glicose 2, do inglês *glucose transporter 2*
HbA1c – Hemoglobina glicada
HCT – Hematócrito, do inglês *hematocrit*
HGB – Hemoglobina, do inglês *hemoglobin*
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IC₅₀ – Concentrao inibitria 50%, do ingls *50% inhibitory concentration*
IFN-γ – Interferon-gama
LD₅₀ – Dose letal mdia, do ingls *median lethal dose*
MCHC – Concentrao de hemoglobina corpuscular mdia, do ingls *mean corpuscular hemoglobin concentration*
MCV – Volume corpuscular mdio, do ingls *mean corpuscular volume*
MDA – Malondialdedo
OECD – Organizao para Cooperao Econmica e Desenvolvimento, do inglês *Organization for Economic Cooperation and Development*
OH[•] – Radical hidroxila
O₂^{•-} – nion superóxido
PLT – Plaquetas, do inglês *platelets*
RBC – Eritrócitos, do inglês *red blood cells*
RE – Equivalente de rutina, do inglês *rutin equivalent*
RL – Radicais livres
SOD – Superóxido dismutase
STZ – Estreptozotocina, do inglês *streptozotocin*
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*
TNF-α – Fator de necrose tumoral, do inglês *tumor necrosis factor*
TOL – Tintura das folhas de oliva
Via i.p. – Via intraperitoneal
WBC – Leucócitos, do inglês *white blood cells*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA	14
1.1.2 Metabólitos secundários de plantas	15
1.1.3 Espécie <i>Olea europaea</i> L.	15
1.2 TOXICIDADE	17
1.2.1 Toxicidades aguda e subaguda	18
1.3 DIABETES MELLITUS	19
1.3.1 Modelo de indução de diabetes mellitus	20
1.3.2 Adipocinas e citocinas	22
1.3.3 Estresse oxidativo	23
1.3.4 Plantas medicinais no tratamento de diabetes mellitus	24
1.5 OBJETIVOS	24
1.5.1 Objetivo geral	24
1.5.2 Objetivos específicos	25
2 MANUSCRITOS	25
2.1 MANUSCRITO 1 - ACUTE AND SUB-ACUTE (28 DAYS) ORAL TOXICITIES OF THE TINCTURE OF <i>Olea europaea</i> L. LEAVES IN WISTAR RATS	25
Abstract	27
1 Introduction	28
2 Materials and methods	29
2.1. <i>Plant material</i>	29
2.2 <i>Chemical and reagents</i>	29
2.3 <i>Determination of total phenolics content</i>	29
2.4 <i>Determination of total flavonoids content</i>	29
2.5 <i>Radical-Scavenging Activity – 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Assay</i>	30
2.6 <i>Animals</i>	30
2.7 <i>Toxicity studies</i>	31
2.7.1 <i>Acute toxicity</i>	31
2.7.2 <i>Sub-acute toxicity</i>	32
2.8 <i>Hematological and biochemical parameters</i>	32
2.9 <i>Statistical analysis</i>	33
3 Results	33
3.1 <i>DPPH, total polyphenolics and flavonoids content</i>	33
3.2 <i>Acute toxicity</i>	33
3.3 <i>Sub-acute toxicity</i>	34
3.3.1 <i>Hematological parameters</i>	34
3.3.2 <i>Biochemical parameters</i>	34
4 Discussion	35
References	38
2.2 MANUSCRITO 2 - ANTIDIABETIC EFFECTS OF <i>Olea europaea</i> L. IN DIABETIC RATS INDUCED BY HIGH-FAT DIET AND LOW-DOSE STREPTOZOTOCIN	47
1 Introduction	49
2 Material and methods	50
2.1 <i>Chemical and reagents</i>	50
2.2 <i>Animals</i>	50
2.3 <i>Induction of diabetes mellitus type 2</i>	51
2.4 <i>Experimental design</i>	51
2.5 <i>Biochemical and hematological parameters</i>	52

2.6 Lipid peroxidation/ <i>In vivo</i> antioxidant activity.....	53
2.7 δ -aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) activity.....	53
3 Results	54
3.1 Body weight.....	54
3.2 Biochemical and hematological parameters.....	54
3.3 Lipid peroxidation/ <i>in vivo</i> antioxidant activity.....	56
3.4 δ -aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) activity.....	56
4 Discussion.....	56
5 Conclusion.....	62
References.....	62
3 DISCUSSÃO	72
4 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFSM	85
ANEXO B - LAUDO DE ANÁLISE DA TINTURA DAS FOLHAS DE OLIVEIRA	86
ANEXO C – COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO À REVISTA <i>FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY</i>	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças é uma prática antiga muito comum na população. A disseminação do uso de plantas medicinais, assim como a automedicação deve-se principalmente ao baixo custo e fácil acesso à grande parcela da população e a crença de que estas substâncias são isentas de efeitos nocivos à saúde (BARATA, 2008). Atualmente, tem-se dado grande importância à fitoterapia e estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados direta ou indiretamente de plantas medicinais, principalmente por meio da aplicação de tecnologias modernas ao conhecimento tradicional (BRASIL, 2012). Por isso, a relevância de estudos sobre plantas, não só para verificar os efeitos positivos, mas também os efeitos tóxicos à saúde da população. É imprescindível diferenciar planta medicinal de fitoterápico. De acordo com Veiga Junior *et al.* (2005), planta medicinal é *"todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos"*. Já o fitoterápico é um medicamento tecnicamente obtido, com formulação específica, empregando-se apenas matéria prima de fonte vegetal, cujo efeito tenha sido comprovado cientificamente (KALLUF, 2008).

O Ministério da Saúde através da Portaria nº 971 de 2006 recomenda a fitoterapia (uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos), como opções terapêuticas e preventivas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS). Além disso, em levantamento realizado em 2004, afirma que 116 municípios de 22 estados brasileiros fazem uso da fitoterapia em combinação com fármacos convencionais (BRASIL, 2006). Assim, os fitoterápicos podem atuar como forma alternativa de terapêutica levando em consideração o menor custo, cujos benefícios complementam-se aos da terapia convencional. Para isso, são necessárias pesquisas científicas nessa área de modo a levar à comprovação da eficácia dessas espécies garantindo a segurança na sua utilização (BORGES *et al.*, 2008).

1.1.2 Metabólitos secundários de plantas

As plantas são conhecidas por sua habilidade em produzir uma grande variedade de metabólitos primários e secundários. Os metabólitos secundários são produtos de baixo peso molecular, que se diferenciam dos primários por não serem essenciais à vida da planta (DOMINGO & LÓPEZ-BREA, 2003). Estes metabólitos são biossintetizados pelas plantas para diferentes finalidades, como a regulação do crescimento, interações intra e interespecíficas, proteção contra radiação UV e defesa contra predadores e infecções (VERPOORTE, 1998; WILLS *et al.*, 2000; GOBBONETO & LOPES, 2007). São responsáveis pelas propriedades bioativas de interesse farmacológico, que servem como potenciais derivativos de novas drogas. Dentre os principais compostos derivados desse metabolismo estão: polifenóis, alcalóides, cumarinas, antraquinonas, taninos, óleos essenciais e saponinas (SANTOS *et al.*, 2010). Os flavonoides pertencem ao grupo dos compostos polifenólicos e são pigmentos comuns às plantas. Os polifenóis são encontrados na maioria das plantas comestíveis e são conhecidos por serem benéficos à saúde, estando associados com o consumo de chocolate, chá verde e vinho tinto (DE BOCK *et al.*, 2012). Dentre as espécies com importantes atividades biológicas devido seus constituintes ativos está a *Olea europaea* L.

1.1.3 Espécie *Olea europaea* L.

A família Oleaceae inclui 25 gêneros e cerca de 600 espécies. Entre os gêneros conhecidos, destaca-se o gênero *Olea*, que registra cerca de 35 espécies com destaque à espécie *Olea europaea* L., popularmente conhecida como oliveira. Comum em várias partes do mundo, a oliveira é uma árvore perene de longa duração, sendo cultivada, principalmente, na bacia do Mediterrâneo, porém sua área de distribuição está sendo ampliada para diversos países do mundo, como Austrália, China e países da América do Sul (RUGINI, 1995; RUGINI & GUTIÉRREZ-PESCE, 2006). Seus frutos são utilizados para fins ornamentais, produção de azeitonas de mesa e também para a produção do azeite de oliva (FARES *et al.*, 2011; LALAS *et al.*, 2011).

Os frutos e o azeite de oliva são particularmente conhecidos por seus efeitos benéficos à saúde humana. De acordo com Tuck & Haybal (2002), o consumo do azeite contribui para a baixa incidência de doenças cardíacas e alguns cânceres.

Assim como seu azeite, as folhas possuem amplas propriedades farmacológicas e têm sido usadas tradicionalmente para o tratamento de várias doenças (BRAHMI *et al.*, 2012; KIRITSAKIS *et al.*, 2010; LEONARDIS *et al.*, 2008), além de estarem disponíveis a um baixo custo e serem de fácil obtenção (LI *et al.*, 2011). Suas atividades biológicas são atribuídas aos constituintes fenólicos de suas folhas, em especial a oleuropeína e seus derivados hidroxitirosol e tirosol (KAEIDI *et al.*, 2011). Além destes, também são encontrados ácido cafeico, ácido *p*-cumarínico, ácido vanílico, luteolina, diosmetina, rutina, luteolina-7-glucosídeo, apigenina-7-glucosídeo e diosmetina-7-glucosídeo (BIANCO & UCCELLA, 2000; FARAG *et al.*, 2003; RYAN *et al.*, 2002; SAMUELSSON, 1951; TASIOULA-MARGARI & OLOGERI, 2001). As extensas mudanças quantitativas e qualitativas em compostos fenólicos são dependentes do ciclo biológico da oliveira (BRAHMI *et al.*, 2013). A origem, condições de armazenamento, condições climáticas, teor de umidade e grau de contaminação do solo são alguns fatores que podem alterar a composição química das folhas de oliva (EL & KARAKAYA, 2009).

Dentre as propriedades farmacológicas da oliva, estão: antioxidante, anti-hipertensiva, antiaterogênica, anti-inflamatória, hipoglicêmica e hipocolesterolêmica (EL & KARAKAYA, 2009). Segundo Tuck & Hayball (2002), a atividade antioxidante da oliva pode ser explicada pela presença da estrutura ortodifenólica (catecólica) encontrada nos seus constituintes fenólicos. Particularmente, a oleuropeína está associada com a melhora no metabolismo da glicose, demonstrando ter um efeito inibidor sobre o aumento pós-prandial da glicose no sangue em pacientes e em ratos diabéticos. Entre os possíveis mecanismos sugeridos para explicar o efeito hipoglicemiante da folha da oliveira, estão a maior liberação de insulina induzida pela glicose e o aumento da captação periférica de glicose, sendo um potencial tratamento para o diabetes (AL-AZZAWIE & ALHAMDANI, 2006). Portanto, é útil investigar sua influência nesta doença, assim como avaliar sua toxicidade aguda e subaguda em modelos experimentais, visto que poucos estudos estão associados com a toxicidade de *Olea europaea* L. (figura 1).



Figura 1. *Olea europaea* L. (oliva) – Aspecto geral. Disponível em: <<http://umtrilhonaflorista7b.blogspot.com.br/2011/01/oliveira.html>>

1.2 TOXICIDADE

Os estudos toxicológicos têm por finalidade prever os possíveis efeitos adversos, que podem se manifestar quando da exposição humana à determinada substância química, podendo ser um medicamento, um agente químico ou outros (KOETER, 1993; STOKES, 2002; MEYER, 2003). Os testes toxicológicos normalmente requeridos com propósito regulatório incluem: toxicidade aguda, toxicidade subaguda, toxicidade crônica, mutagênese, carcinogênese, reprodução e teratogênese, toxicocinética, efeitos locais sobre a pele e olhos, sensibilização cutânea e ecotoxicidade (BARROS & DAVINO, 2003; SPIELMANN, 2002).

As condições de exposição, como dose administrada, tempo e frequência de exposição (doses únicas ou repetidas) e via de administração podem determinar a presença ou ausência de toxicidade de uma substância (OGA, 2008). Quando aplicados em animais de laboratório e em condições adequadas, os estudos toxicológicos permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias em humanos ou animais (OGA, 2008).

As plantas medicinais desempenham um papel muito importante na medicina moderna, podendo fornecer inúmeros fármacos, porém muitas destas plantas podem apresentar substâncias que desencadeiam reações adversas. Por isso, o uso popular de plantas medicinais, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validá-las como medicamentos eficazes e seguros (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006; AGRA *et al.*, 2007; 2008). Podemos citar a *Baccharis trimera* (carqueja) que, popularmente, é

utilizada para o tratamento de gastroenterites, anorexia, gripe, resfriado, além de ter ação digestiva e diurética. Porém, seu principal efeito tóxico relatado na literatura é a indução de aborto (VERDI *et al.*, 2005), além de baixa toxicidade e efeitos antimutagênicos (NAKASUGI & KOMAI, 1998). A *Lantana camara* (cambará) é utilizada na medicina popular como diurético, expectorante, antipirético e antirreumático. No entanto, pode ser tóxica após ingestão de seus frutos por bovinos, que apresentaram diminuição do apetite, icterícia, inquietação, lesões de fotossensibilização, apatia, intensa salivação e desorientação (COSTA *et al.*, 2009; TOKARNIA *et al.*, 1999). De acordo com dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), no ano de 2010, no Brasil foram registrados 1377 casos de intoxicação humana por uso de plantas sendo que desses, 5 foram a óbito (SINITOX, 2010).

Atualmente, existem protocolos com especificações acerca dos ensaios a serem desenvolvidos. Entre eles, encontra-se a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD). Dentre os estudos de toxicidade preconizados pela OECD, há os protocolos para os testes de toxicidades oral aguda e subaguda (OECD 423 e 407, respectivamente). O uso indiscriminado de animais na pesquisa tem sido motivo de discussões, principalmente de caráter ético, visto o grande número de animais requerido e do sofrimento causado durante alguns tipos de experimento (WHITE, 2001; MEYER, 2003). Depois de reavaliações nos protocolos, estes cumprem a meta de reduzir o número e o sofrimento dos animais e podem fornecer informação adequada para a classificação toxicológica das substâncias estudadas (DIPASQUALE & HAYES, 2001).

1.2.1 Toxicidades aguda e subaguda

O teste de toxicidade aguda é definido como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após administração de dose única, ou doses múltiplas, administradas em 24 horas (OGA, 2008). Normalmente avalia-se a mortalidade ou a imobilidade dos animais e é possível determinar a dose letal (LD₅₀). A LD₅₀ é definida como a quantidade de substância química que, quando ingerida em uma só dose oral (expressa em mg de substância/kg de peso animal), causa a morte de 50% dos animais expostos a substância (COSTA *et al.*, 2008). Os efeitos aparecem de imediato ou no período de 14 dias (PIMENTEL *et al.*, 2006; AMARAL & SILVA, 2007).

Já o estudo de toxicidade subagudo refere-se aos efeitos nocivos, cumulativos, decorrentes de uma exposição repetida, de preferência oral, em um período limitado de exposição ao longo do tempo (RHIOUANI *et al.*, 2008; OGA, 2008; BETTI *et al.*, 2012). Neste tipo de teste são utilizadas, pelo menos, três doses experimentais. A partir dele é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos na fisiologia do animal, hematológicas, bioquímicas, anato e histopatológicas (ANVISA, 2013).

Frente ao uso de plantas medicinais pela população e sua crença de que não causam efeitos tóxicos, torna-se necessário investigar quais os possíveis efeitos tóxicos dessas plantas em modelos experimentais.

1.3 DIABETES MELLITUS

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença de grande preocupação de saúde para as pessoas devido às sérias complicações que pode desencadear. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 5% da população mundial possui essa doença e esse número pode duplicar até o ano de 2025 devido ao crescimento populacional, envelhecimento e hábitos de vida não saudáveis (KAEIDI *et al.*, 2011). Se não tratado adequadamente, o DM pode desencadear complicações, como neuropatia podendo levar a ulcerações no pé e amputações, doenças coronarianas, nefropatia, retinopatia, entre outros (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA, 2011). Um fato preocupante é que parte das pessoas não tem conhecimento que possuem esta síndrome e, além disso, metade das pessoas diagnosticadas já apresentam sinais de complicações da doença.

O DM ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou esta é incapaz de exercer adequadamente seus efeitos nos tecidos alvos, resultando em um distúrbio no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES – SBD, 2013-2014). A insulina é um hormônio que controla a concentração de glicose no sangue e alterações em sua ação e/ou secreção pode levar ao desenvolvimento de DM. Muitos estudos mostram que o nível de insulina circulatória é aumentado e não diminuído em indivíduos com glicose sanguínea alta em desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (MALECKI, 2004; PERRY *et al.*, 2014; TAYLOR, 2012). A hiperglicemia (aumento da concentração de glicose) é um efeito comum no DM e está associado ao

desenvolvimento de complicações devido seus efeitos tóxicos, que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e sobrevida dos pacientes, além de envolver altos custos no seu tratamento (SBD, 2007). O controle glicêmico é crucial, pois tende a diminuir os riscos de desenvolvimento de complicações crônicas ou retardar sua progressão.

O DM pode ser classificado em diferentes categorias e o diagnóstico de um indivíduo geralmente depende das circunstâncias presentes no momento (ADA, 2008). As duas principais classes são classificadas como Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) e Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2), sendo que 90 a 95% dos pacientes apresentam DMT2 (SKYLER, 2004; LIU *et al.*, 2013). O DMT1 é resultado da destruição das células- β pancreáticas (de origem autoimune ou idiopática), que usualmente leva à deficiência absoluta de insulina. Geralmente encontra-se em crianças e adolescentes, podendo ocorrer em qualquer idade e corresponde a apenas 5% a 10% dos casos de diabetes (ADA, 2008). Já o DMT2 caracteriza-se por um declínio progressivo da ação da insulina, levando a resistência à insulina, seguida pela incapacidade de compensar esta resistência, que ocorre devido à disfunção das células- β pancreáticas, responsáveis por sintetizar e secretar a insulina. Essa forma de diabetes pode passar sem ser diagnosticada por longo período de tempo, visto que a hiperglicemia se desenvolve gradualmente e a maioria dos pacientes apresenta sobrepeso ou obesidade (ADA, 2008).

A prevalência do DMT2 está crescendo rapidamente no mundo, tornando-se um importante problema de saúde associado a grandes taxas de morbidade e mortalidade (MALECKI, 2004). Em 2012, 4,8 milhões de pessoas morreram devido ao diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - IDF, 2012) e sua prevalência deverá aumentar para 552 milhões de pessoas em 2030 (IDF, 2011). O envelhecimento da população, a urbanização crescente e a adoção de estilos de vida pouco saudáveis como sedentarismo, dieta inadequada e obesidade são os grandes responsáveis pelo aumento da prevalência do diabetes, especialmente o tipo 2 (FERREIRA & FERREIRA, 2009).

1.3.1 Modelo de indução de diabetes mellitus

Recentemente, modelos não-genéticos de roedores têm sido desenvolvidos através da combinação de uma dieta hipercalórica associada a uma baixa dose de

estreptozotocina (STZ). A STZ foi isolada de um micro-organismo de solo conhecido como *Streptomyces achromogenes*, que mostrou um amplo espectro de atividade antibiótica (REUSSER, 1971). Desde sua descoberta em 1959, tem sido extensamente utilizada para a indução do diabetes em animais experimentais e em estudos pré-clínicos (GOUD *et al.*, 2015). Ratos tratados com dieta hipercalórica associada a STZ, tornam-se significativamente hiperglicêmicos, hiperlipidêmicos e desenvolvem ganho de peso (MU *et al.*, 2006; SRINIVASAN *et al.*, 2004). A dieta hipercalórica não induz a hiperglicemia em ratos alimentados com ela, talvez pela hiperinsulinemia compensatória, porém a administração de STZ em baixa dose leva à danos nas células β produtoras de insulina, o que leva ao desenvolvimento de hiperglicemia (HOLMES *et al.*, 2015). Além disso, os níveis de insulina plasmática são notavelmente reduzidos em animais tratados com STZ quando comparado aos animais tratados apenas com veículo e dieta hipercalórica. Esses modelos têm-se tornado populares por refletirem as alterações estruturais, funcionais e bioquímicas usualmente observadas em pacientes diagnosticados com DMT2.

Primariamente, a STZ foi utilizada como agente alquilante na quimioterapia de tumores metastáticos das ilhas pancreáticas e apenas depois sua atividade diabetogênica foi evidenciada (ELEAZU *et al.*, 2013). A administração de STZ resulta em citotoxicidade nas células β pancreáticas. Por ser um análogo da glicose, a STZ entra nas células β através do transportador GLUT-2 e acumula-se intracelularmente, formando um agente alquilante, o diazometano, que causa a metilação do DNA, com consequente ação diabetogênica (LENZEN, 2008). Além deste, também pode apresentar outros mecanismos, como auto-oxidação da glicose, aumento da geração de radicais livres de oxigênio, secreção de citocinas, entre outros (GONZÁLEZ *et al.*, 2000; GIACCO & BROWNLEE, 2010).

A dose e a duração da STZ são importantes fatores na indução de determinado tipo de diabetes, por isso conhecer a patogênese dos diferentes tipos de DM é uma grande preocupação. Para a indução do DMT1 acredita-se que uma única dose de STZ é suficiente (JUNOD *et al.*, 1969; YIN *et al.*, 2006). Enquanto que o DMT2 tem sido induzido por vários mecanismos como injeção de STZ seguido de administração de nicotinamida (WU *et al.*, 2008; SZKUDELSKI, 2012), dieta hipercalórica após baixa dose de STZ e injeção de STZ durante o período neonatal (PATIL *et al.*, 2014; PORTHA *et al.*, 1988; WU & YAN, 2015).

1.3.2 Adipocinas e citocinas

O DM tem mostrado ser uma doença de caráter inflamatório e dentre os marcadores inflamatórios, podemos citar as citocinas. As citocinas são proteínas solúveis sintetizadas por células imunes ou não, que mediam a comunicação intracelular por transmitirem informações as células-alvo através de interações com receptores específicos (PRADO *et al.*, 2009). As interleucinas IL-1 e IL-6, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o interferon- γ (IFN- γ) são citocinas de caráter pró-inflamatório, enquanto que a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória.

O tecido adiposo é conhecido por possuir funções como armazenamento de energia e termogênese, porém estudos têm demonstrado que este tecido tem um importante papel como órgão produtor de hormônios, que regulam o metabolismo e atuam em diversos sistemas (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). As adipocinas, que podem ser ou não citocinas, são sintetizadas e liberadas pelos adipócitos, entre as mais conhecidas podemos citar a leptina, adiponectina e resistina, que estão envolvidas no controle do metabolismo (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). A grelina também é uma adipocina importante no controle do metabolismo, porém é produzida pelo estômago.

A expansão severa do tecido adiposo é associada a inflamação adiposa e perfil alterado de adipocinas (HAN & LEVINGS, 2013). Mudanças nas concentrações séricas das adipocinas possuem um papel importante no desenvolvimento do DM (GUIMARÃES *et al.*, 2007), visto que podem possuir ação no metabolismo da glicose e/ou são associadas a resistência à insulina. Também estão associadas à obesidade, geralmente encontrada no DMT2. A expressão das adipocinas é controlada por diversas substâncias como a insulina e citocinas pró-inflamatórias (ROMERO & ZANESCO, 2006), sendo assim as concentrações das citocinas e adipocinas estão estritamente relacionadas. Estudos mostram que a resposta anti-inflamatória da adiponectina parece ser mediada pelas concentrações da IL-6 e o TNF- α . De acordo com PRADO *et al.*, (2009) indivíduos que apresentam alta concentração de adiponectina são menos suscetíveis a desenvolver DMT2 em relação aos que apresentam hipoadiponectinemia. Por outro lado, a hiperleptinemia é encontrada no DM, sendo atribuída a alterações no receptor de leptina ou a uma deficiência em seu sistema de transporte na barreira hemato-cefálica, fator denominado resistência à

leptina (ROMERO & ZANESCO, 2006). Portanto, torna-se útil investigar as atividades desses marcadores no DM.

1.3.3 Estresse oxidativo

A geração de radicais livres (RL) é um processo contínuo e fisiológico, que possui importantes funções biológicas e pode ocorrer no citoplasma, na membrana plasmática, nas mitocôndrias, entre outros. Entretanto, quando há a produção excessiva pode causar danos às proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. As principais espécies reativas de oxigênio (EROs) são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e sua presença nos organismos pode ter efeitos deletérios (PREMKUMAR & BOWLUS, 2003). As EROs causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas e possuem grande influência no processo etiológico de algumas doenças como aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer (GREEN *et al.*, 2004). O estresse oxidativo decorre do desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, a partir da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção destes (BARBOSA *et al.*, 2010). Define-se por antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato (SOUSA *et al.*, 2007).

A produção de EROs altera a defesa antioxidante e prejudica o metabolismo da glicose no sistema biológico, por causar aumento da peroxidação lipídica (BALASUBASHINI *et al.*, 2004). O nível de malondialdeído (MDA) é utilizado para definir o grau de peroxidação lipídica, sendo que quanto maior o conteúdo de MDA maior será a peroxidação lipídica, indicando um maior índice de danos às membranas celulares (KASHYAP *et al.*, 2005). A superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) são algumas das enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo, sendo a primeira defesa endógena de neutralização das EROs (ROHENKOHL *et al.*, 2011).

O consumo de antioxidantes naturais presentes em diversos alimentos está associado à baixa incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (BEHERA *et al.*, 2008). Dentre eles, podemos encontrar flavonoides e polifenóis, que estão sendo utilizados no tratamento de diabetes e dislipidemia (MARTINELLO *et al.*, 2006). Os polifenóis, bem como outros metabólitos secundários com propriedades antioxidantes, exercem um efeito anti-diabético benéfico por melhorar distúrbios

oxidativos nas condições diabéticas (ABDELMOATY *et al.*, 2010; TIWARI & RAO, 2002). Visto que o estresse oxidativo está associado na patologia e complicações do DM, são importantes estudos envolvendo antioxidantes no tratamento e/ou prevenção da doença.

1.3.4 Plantas medicinais no tratamento de diabetes mellitus

Os fármacos utilizados atualmente para o tratamento do DM possuem alto custo e muitos efeitos colaterais. Uma vez que muitos indivíduos escolhem a suplementação dietética e terapias alternativas como as plantas medicinais, há um aumento nas pesquisas referentes aos efeitos de substâncias naturais na redução dos níveis de glicose sanguínea (RATES, 2001).

Várias espécies vegetais têm sido estudadas como benéficas no controle do DM. A informação etnobotânica relata cerca de 800 plantas que podem possuir propriedades antidiabéticas e mais de 1200 espécies de plantas têm sido testadas com base na etnofarmacologia (GROVER *et al.*, 2002; MARLES & FARNS-WORTH, 1995). Entre as plantas que já possuem confirmação através de estudos científicos da sua atividade hipoglicemiante, estão: *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja), *Bauhinia forficata* Link. (pata-de-vaca), *Salvia Officinalis* L. (sálvia), *Mormodica charantia* L. (melão-de-São Caetano), *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) e *Myrcia sphaerocarpa* DC (ROSA *et al.*, 2012). A maioria destas plantas contém compostos bioativos, que estão relacionados com os diversos mecanismos que originam ação antidiabética como fenólicos, glicosídeos, alcaloides, terpenos e flavonoides (PATEL *et al.*, 2012). Estes podem agir aumentando a liberação de insulina, modificando o metabolismo da glicose, inibindo fatores hiperglicemiantes, inibindo ou estimulando a síntese de enzimas ou atenuando as complicações do diabetes (DORNAS *et al.*, 2009).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade aguda e subaguda da tintura das folhas de oliva (*O. europaea* L.) em ratos *Wistar* e induzir um modelo experimental de diabetes mellitus

tipo 2 através de dieta hipercalórica e baixa dose de estreptozotocina para analisar o efeito da tintura no metabolismo de ratos *Wistar*.

1.5.2 Objetivos específicos

- Avaliar o conteúdo de polifenóis totais, flavonoides e a capacidade antioxidante da tintura das folhas de oliva;
- Avaliar a toxicidade aguda *ex vivo* da tintura das folhas de oliva seguindo o Guia OECD 423 em ratos *Wistar*;
- Avaliar a toxicidade subaguda *ex vivo* da tintura das folhas de oliva seguindo o Guia OECD 407 em ratos *Wistar*;
- Induzir o diabetes mellitus tipo 2 em ratos machos *Wistar* através da administração de baixa dose de estreptozotocina (STZ) associado a uma dieta hipercalórica;
- Comparar a glicemia e o peso corporal dos animais em seus diferentes grupos;
- Analisar o efeito antidiabético da tintura das folhas de oliva através da peroxidação lipídica, atividade antioxidante enzimática, marcadores inflamatórios e concentrações de adipocinas;
- Analisar os parâmetros hematológicos e bioquímicos.

2 MANUSCRITOS

Os materiais e métodos e resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de dois manuscritos. Cada manuscrito está estruturado de acordo com as normas das revistas científicas escolhidas para a submissão ou publicação do mesmo.

2.1 MANUSCRITO 1

ACUTE AND SUB-ACUTE (28 DAYS) ORAL TOXICITIES OF THE TINCTURE OF *Olea europaea* L. LEAVES IN WISTAR RATS

O presente manuscrito foi submetido à Revista *Food and Chemical Toxicology*.

**ACUTE AND SUB-ACUTE (28 DAYS) ORAL TOXICITIES OF THE TINCTURE OF
Olea europaea L. LEAVES IN WISTAR RATS**

Camille Gaube Guex^a, Fernanda Ziegler Reginato^a, Andreia Regina Haas da Silva^a,
Kássia Caroline Figueredo^a, Robson Borba de Freitas^a, Roberta da Silva Jesus^b,
Cibele Lima Lhamas^c, Gilberti Helena Hübscher Lopes^d, Liliane de Freitas Bauermann^a

^aDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^bDepartamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade
Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^cDepartamento de Clínica Médica de Pequenos Animais, Hospital Veterinário
Universitário, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^dDepartamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais,
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Postal address: Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, nº 1000,
Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97105-900

E-mail address of authors: camilleguex@yahoo.com.br, fernanda_zr@yahoo.com.br,
andreiaregina_silva@yahoo.com.br, kassia.tquimica@yahoo.com.br,
robsonborbaf@gmail.com, robertasj@hotmail.com, cibelelhmas@gmail.com,
gilberti@gilbertinutri.com.br, lgfbauermann@gmail.com

Corresponding author:

Camille Gaube Guex

E-mail: camilleguex@yahoo.com.br

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Santa Maria, RS.

Telefone: (55) 3220 9380

Abstract

Olea europaea L., popularly known as olive, is a plant widely used worldwide. Its leaves, fruit and oil are extensively consumed and possess important pharmacological properties. However, studies about its toxicity are still limited in the literature. Therefore, the aim of the study was to investigate the acute and subacute (28 days) oral toxicities of the tincture of *O. europaea* L. leaves (TOL) in *Wistar* rats through biochemical and hematological parameters. In acute study, a single dose of 2000 mg/kg of TOL was administered by oral gavage in male and female rats. In subacute study, TOL was administered during 28 days at different doses to male and female rats. Body weight of the animals was recorded during treatment period. At the end of the experiments, blood was collected for hematological and biochemical parameters. Single dose of 2000 mg/kg did not induce mortality or any signs of toxicity in animals treated. Animals exposed to TOL during 28 days did not present sign of abnormalities. Results demonstrate that tincture of *O. europaea* L. leaves did not induce toxicity after exposition to a single or repeated doses. However, more studies are needed to have complete information about its safety for use in humans.

Highlights:

Medicinal plants have been used worldwide due to their therapeutic properties.

Even though natural products, can lead to adverse effects to users.

Olive is used worldwide due to its biological activities.

Olive did not show any signs of toxicity or abnormalities.

Keywords: Olive. Toxicity. Leaves. Acute. Subacute.

1 Introduction

Medicinal plants have been used for therapeutic purposes for many years and its worldwide consumption, as well as self-medication, is mainly due to the low cost and free access to the large portion of the population (Ekor, 2014). Contrary to the belief that natural products are safe and free of toxicity, these substances may have moderate to severe effects to the users due to its chemical complexity (Bhushan *et al.*, 2014). Then, it is important establish the safety of medicinal plants through toxicity studies in appropriate conditions (Oga, 2008). The olive tree (*Olea europaea* L.), which belongs to the Oleaceae family, is a fruit tree characteristic of the Mediterranean region (Fares *et al.*, 2011; Lalas *et al.*, 2011) and it is known to possess fruit, oil and leaves with a history of nutritional, medicinal and ceremonial uses (Soni *et al.*, 2006). The olive leaf tea is the most common and traditional used between people of the Mediterranean to cure certain diseases (El & Karakaya, 2009). The olive fruit, its oil and the leaves have high levels of phenolic compounds, which are associated with important pharmacological properties as antioxidant, antihypertensive, antiatherogenic, anti-inflammatory, hypoglycemic and hypocholesterolemic (El & Karakaya, 2009). Also possess biologic activities including antioxidant, antimicrobial and antiproliferative due to its bioactive compounds such as oleuropein, verbascoside, rutin, tyrosol and hydroxytyrosol (Rahmanian *et al.*, 2015). Since information about toxicity of olive leaf are limited, it is important it is important to conduct new studies regarding the safety of exposure to olive leaves. Therefore, the aim of this study was to investigate the acute and subacute (28 days) oral toxicities of the tincture of olive leaves (TOL) in *Wistar* rats by biochemical and hematological parameters.

2 Materials and methods

2.1. Plant material

Tincture of *Olea europaea* leaves was purchased from Flores e Ervas Com. Farm. Ltda. (Piracicaba, São Paulo, Brazil) in 2015. The leaves were macerated with an initial alcohol content of 60% (v/v) and final of 51% (v/v).

2.2 Chemical and reagents

All chemical were of analytical grade. Acetic acid, acetonitrile and methanol were acquired from Merck (Darmstadt, Germany) while gallic, caffeic, chlorogenic acids, rutin and quercetin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA).

2.3 Determination of total phenolics content

The determination of total phenolic content of TOL was performed by the Folin–Ciocalteu method with slightly modifications performed by Chandra & Meja, 2004. The samples were read at 730 nm in spectrophotometer. The total phenolics content was expressed in milligrams gallic acid equivalent (GAE)/g dry fraction. The equation obtained for the calibration curve of gallic acid in the range of 0.005 - 0.030 mg/mL was $y = 0.002x + 0.001$ ($r = 0.998$). The experiment was conducted in triplicate. Data are expressed as mean \pm standard deviation.

2.4 Determination of total flavonoids content

The determination of flavonoids in TOL was performed as described by Woisky & Salatino, 1998. The absorbance was determined by spectrophotometer at 420 nm. Ethanol was used as a blank. The equation obtained for the calibration curve of rutin in the range of 0.005 a 0.04 mg/mL was $Y = 0.0275x + 0.0226$ ($r = 0.998$). The content of flavonoids was established as milligrams rutin equivalent (RE)/g dry fraction. The experiment was conducted in triplicate.

2.5 Radical-Scavenging Activity – 2, 2 diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Assay

The radical scavenging activity of TOL was quantified in the presence of DPPH• stable radical, according to a slightly modified method (Choi *et al.*, 2002). Spectrophotometric analysis was used to measure the free radical-scavenging capacity (RSC) and to determine the scavenging concentration or inhibitory concentration (IC₅₀). The DPPH scavenging ability was expressed as IC₅₀ (the tincture concentration (µg/mL) required to inhibit 50% of the DPPH in the assay medium).

TOL was tested at six different ethanol dilutions at 7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125 and 250 µg/mL. Each sample was mixed with 1.0 mL of DPPH 0.3 mM in ethanol solution. After 30 minutes, the absorption was measured at 518 nm. A solution of DPPH (1 mL, 0.3 mM) in ethanol (2.5 mL) was used as a negative control and ascorbic acid in the same concentrations used for the TOL provided the positive control. The test was performed in triplicate and the calculation of the antioxidant activity followed the equation:

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [((\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100]$$

Where: Abs_{sample} is absorbance of each fraction; Abs_{blank} is absorbance of TOL without adding the DPPH; Abs_{control} is absorbance the solution of ethanol in DPPH. After calculation of inhibition of DPPH radical in percentage, it was produced an inhibition percentage graphic versus the concentration of the tincture used, having as standard the ascorbic acid.

2.6 Animals

Male and female *Wistar* rats (weighing 150 – 200 g) were obtained from animal house of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) and randomly housed in polypropylene cages according to gender at different experimental groups. Animals were acclimatized for a week before the commencement of the experiment and

maintained under controlled temperature (22 ± 2 °C) with a constant 12 h light/dark cycle. All animals were allowed free access to food (standard diet) and water and handled in accordance with the ethical principles for animal experimentation developed by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). This study was approved by the Comitê de Ética no Uso de Animais from UFSM under the number 121/2014.

2.7 Toxicity studies

Acute and sub-acute toxicity studies were performed according to OECD guidelines (Organisation for Economic Co-operation and Development) 423 and 407, respectively (OECD, 2001; 2008).

2.7.1 Acute toxicity

TOL was administered in a single dose of 2000 mg/kg by oral gavage in three males and three females (n=6). A negative control group was established by administering a 51% ethanol solution (10 mL/kg) to both males and females (n=6). The experiment was performed in duplicate. After administration, animals were observed individually during the first 30 minutes and then daily for 14 days. Observations included mortality and changes in skin and fur, eyes and mucous membranes, and also respiratory, circulatory, autonomic and central nervous systems, and somatomotor activity and behaviour pattern. Attention should be directed to observations of tremors, convulsions, salivation, diarrhea, lethargy, sleep and coma (OECD, 2001). Besides, the body weights of animals were recorded during the treatment period. At the end of the treatment, animals were fasted overnight, but allowed free access to water. They were then anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg, intraperitoneally - i.p.) associated with lidocaine hydrochloride (10 mg/mL) and blood collected with and without anticoagulant (ethylene diamine tetra acetate) by

cardiac puncture for hematologic and biochemical analyzes, liver and kidney were removed and examined macroscopically.

2.7.2 Sub-acute toxicity

Animals were divided into 4 groups of 10 each (5 males and 5 females) and their body weights were recorded during the treatment period. Control group received ethanol 51% (10 mL/kg), while treated groups received TOL at doses of 100, 200 and 400 mg/kg once a day for 28 days by oral gavage. Doses were decided according to previous studies of our research group (da Silva *et al.*, 2016). Animals were observed for signs of abnormalities during the treatment period. At the end of the treatment, animals were fasted overnight, but allowed free access to water. They were then anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg, i.p.) associated with lidocaine hydrochloride (10 mg/mL) and blood collected with and without anticoagulant (ethylene diamine tetra acetate) by cardiac puncture for hematologic and biochemical analyzes, liver and kidney were also removed and examined macroscopically.

2.8 Hematological and biochemical parameters

Blood without anticoagulant was allowed to clot before centrifugation (4000 rpm for 10 min) to obtain serum, which was utilized for the assessment of glucose (GLU), total cholesterol (CHOL), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE) levels and alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities, using a commercial kit (Diagnostic Kits Laboratory Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil) and semi-automatic biochemical analyzer (Genz, Bioplus: Bio-2000).

Total blood was analyzed immediately for hematological parameters: red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean cell corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelets (PLT) and

leukocyte total count were determined by using an automatic counter veterinary Mindray BC 2800.

2.9 Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation (S.D.). All the results were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey *post-hoc* test. The differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

3 Results

3.1 DPPH, total polyphenolics and flavonoids content

DPPH, total polyphenolics and flavonoids content results are presented in table 1. Tincture showed a concentration of total polyphenols of 263.66 ± 3.47 mg/g gallic acid equivalent (GAE). Regarding the flavonoid content, the tincture showed a concentration of 22.04 ± 0.50 mg/g rutin equivalent (RE). Antioxidant activity determined by DPPH method showed IC_{50} of 0.0458 ± 0.18 mg/mL (IC_{50} = Concentration required to inhibit 50% of DPPH radical).

3.2 Acute toxicity

Oral administration of TOL at dose of 2000 mg/kg did not cause any mortality or sign of toxicity during the treatment period. Body weight of both genders did not show significant difference and animals exposed presented no behavioral changes. No abnormality was found in the liver and kidneys at necropsy. Hematological parameters RBC, HGB, MCV, PLT and WBC were significantly different when compared with the control group (table 2). Blood concentration of ALT and GLU significantly increased in TOL treated females as compared to control group, as well as significant decrease in CRE. In males, a significant decrease was observed in CHOL (table 3).

3.3 *Sub-acute toxicity*

During the 28 days of treatment no sign of toxicity or mortality was observed in animals treated with different doses of TOL. Body weight of both genders exhibited a normal trend and no abnormality was found in the liver and kidneys at necropsy. Also, animals treated with TOL presented no behavioral changes during the experiment period.

3.3.1 *Hematological parameters*

Prolonged exposure to TOL at different doses (100, 200 and 400 mg/kg) did not alter any of the measured hematological parameters (RBC, HGB, HCT, MCV, MCHC, PLT and WBC) in treated animals when compared to control (table 4 and 5).

3.3.2 *Biochemical parameters*

Among hepatic enzymes measured (ALT and AST), only AST showed a significant decrease in its activity in males treated with TOL at dose of 400 mg/kg when compared to the groups. Levels of blood urea nitrogen (BUN) significantly increased in males treated with TOL at doses of 100, 200 and 400 mg/kg when compared with the control, whereas in females there was no significant difference. In females treated with TOL at dose of 200 mg/kg there was a significant decrease in blood glucose level when compared with the group treated with TOL 400 mg/kg, while in males glucose decreased significantly in treated animals (200 and 400 mg/kg) when compared to the control group. Glucose levels of males treated with TOL at dose of 200 mg/kg also reduced when compared to the group treated with 100 mg/kg. Blood concentration of CRE and CHOL had no significant changes in rats treated with TOL when compared to the control group, both in males and females (table 6 and 7).

4 Discussion

In this study, we investigated acute and subacute oral toxicities of tincture of *Olea europaea* L. leaves through hematological and biochemical parameters. Medicinal plants have been widely used to prevent and treat diseases, since they can provide valuable pharmacological properties due to their bioactive compounds (Bahmani *et al.*, 2015). The olive leaves have been used for treatment of diabetic hyperglycemia, hypertension and infectious diseases and is widely recognized as a traditional drug in Europe (Komaki *et al.*, 2003). According to Erbay & Icier, 2010, the major phenolic compounds found in olive leaves are oleuropein and its derivative, hydroxytyrosol. At lower concentrations are also found tyrosol, caffeic acid, p-coumaric acid, vanillic acid, vanillin, luteolin, rutin, luteolin-7-glucoside, apigenin-7-glucoside and diosmetin-7-glucoside (Tasioula-Margari & Ologeri, 2001). Analysis performed with extracts from leaves of different species of olive by HPLC-DAD revealed the presence of phenolic compounds like phenyls alcohols (hydroxytyrosol and tyrosol), secoiridoids (oleuropein, ligstroside, and nuzheinide) and flavonoids (quercetin and luteolin) (Khlif *et al.*, 2015).

Many of the compounds from medicinal plants such as polyphenols have antioxidant activity and are able to neutralize the action of free radicals and other reactive species, preventing cells and tissues from damage. This activity is related to the ability to protect a biological system from potentially harmful reactions that cause excessive oxidation (Mensor *et al.*, 2001). In literature performed by Hashmi *et al.* (2015) was demonstrated the presence of large amount of phenolic compounds and flavonoids, as well as other classes of secondary metabolites in olive. That justifies the results found in this study, since olive tincture had a significant amount of flavonoids and polyphenols compared to the respective standards of rutin and gallic acid. The

evaluation of the antioxidant capacity by DPPH method, the plant sample showed satisfactory results when compared (IC_{50} of 45.86 $\mu\text{g/mL}$) with ascorbic acid standard (15.98 $\mu\text{g/mL}$) (figure 1). Khlif and colleagues (2015) evaluated the antioxidant capacity of extracts from different polarities of *O. europaea* L. and the ethyl acetate fraction showed an IC_{50} of 45.00 $\mu\text{g/mL}$, similar to the tincture tested in this study, however these results can vary according to the sample, since factors such as temperature, preparation method and sample source can influence the efficacy of the extraction. In addition, the structural carbohydrate and nitrogen content in olive leaves depends on factors such as the variety of olive, climatic conditions, year, wooden ratio, etc (Molina-Alcaide & Yanez-Ruiz, 2008; Martin-Garcia & Molina-Alcaide, 2008). Study performed by Papoti & Tsimidou (2009) indicated a large amount of oleuropein, verbascoside and hydroxytyrosol in the leaves of olive. These constituents are responsible for the biological activity able to attenuate or prevent the symptoms of some diseases (Kaeidi *et al.*, 2011).

Olive leaves are known to possess beneficial effects on metabolism when used as a therapeutic agent, however studies on its toxic effects are limited in the literature. Changes in body weight have been used as parameter of adverse effects of the test substance (Berenguer-Rivas *et al.*, 2013). Animals exposed to TOL showed no significant changes in body weight during the acute and subacute treatments. Treatment with TOL in a single dose of 2000 mg/kg caused no signs of toxicity and no mortality was recorded. Changes in hematological and biochemical parameters were not the same in both sexes. Some hematological parameters (RBC, HGB, MCV, PLT and WBC) and some biochemical (CRE, CHOL, GLU and ALT) showed significant differences compared to the control group. These differences may be due to experimental variations and were not related to the treatment. Therefore, the oral

toxicity of this tincture can be classified in category 5, wherein the acute lethal toxicity is greater than 2000 mg/kg, according to the Harmonised Overall System OECD.

Prolonged treatment is important to determine the safety of any substance (OECD, 2008). In this study, after 28 days of treatment with TOL, the animals showed no signs of toxicity or behavioral changes. Also, no mortality was reported in any of the tested doses. Hematological parameters are important to determine the physiological and pathological state in human and animals, since they are susceptible targets of toxic substances (Li *et al.*, 2010). The results showed no significant difference in any of the parameters investigated when compared between groups. Biochemical measurements are important to investigate major toxic effects in tissues. The liver is a major organ in which the activities of AST and ALT are being associated with liver damage, so they are used as biomarkers to predict possible toxicity of a substance (Huang *et al.*, 2006; Ojiako & Nwanyo, 2006). Results show that AST activity at a dose of 400 mg/kg decreased significantly in males when compared with the control group. The antioxidant effect of flavonoids combined with the action of saponin might have lessened the metabolic burden on the liver, culminating in the hepatoprotection (Gao *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2006). This reduction may be associated with a possible hepatoprotective effect of tincture of olive leaves. TOL treatment at a dose of 400 mg/kg significantly increased the level of urea, an important marker of renal damage, in males compared with the control group. Despite this difference, the value remained within the normal level for *Wistar* rats according to Lima *et al.*, 2014. The observed decrease in glucose level in males and females treated with TOL in different doses may be associated with hypoglycemic action of oleuropein found in the leaves of olive. This action, reported in diabetic mice, can be explained by two mechanisms:

potentiation of glucose induced insulin release and the effect of increasing peripheral glucose uptake (Al-Azzawie & Alhamdani, 2006).

In conclusion, data show that tincture of *Olea europaea* L. leaves did not cause any sign of toxicity on the experimental model used and no mortality was recorded in the administered doses (single or repeated). Measured hematological and biochemical parameters corroborated the results, since they did not show any abnormalities, irrespective of the gender and age of the studied animals. However, more experimental analyses regarding the safety of the use of *O. europaea* L. leaves are needed.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank CAPES, UFSM and Bioclin/Quibasa for the financial assistance.

References

- Al-Azzawie, H.F., Alhamdani, M.S., 2006. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences* 78, 1371–1377.
- Bahmani, M., Saki, K., Shahsavari, S., Rafieian-Kopaei, M., Sepahvand, R., Adineh, A., 2015. Identification of medicinal plants effective in infectious diseases in Urmia, northwest of Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5, 858-864.
- Berenguer-Rivas, C.A., Castillo, A.A., Martinez, H.S., Zapata, E.P., Hernandez, J.B., Tasse, Y.M., 2013. Acute oral toxicity of *Azadirachta indica* (Neem Tree). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 18, 502–507.
- Bhushan, B., Sardana, S., Bansal, G., 2014. Acute and sub-acute toxicity study of *Clerodendrum inerme*, *Jaminum mesnyi* Hence and *Callistemon citrinus*. *Journal of Acute Disease* 3, 324-327.
- Chandra, S., Mejia, E.G., 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3583 – 3589.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S, Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. *Plant Science* 163, 1161-1168.

da Silva, A.R.H., Reginato, F.Z., Guex, C.G., Figueredo, K.C., da C. Araldi, I.C., de Freitas, R.B., Boligon, A.A., Athayde, M.L., de A. Mazzanti, C.M., Hübscher, G.H., de F. Bauermann, L., 2016. Acute and sub-chronic (28 days) oral toxicity evaluation of tincture *Baccharis trimera* (Less) Backer in male and female rodent animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 64, 170-177.

Ekor, M., 2014. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology* 4, article 177, doi: 10.3389/fphar.2013.00177.

El, S.N., Karakaya, S., 2009. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews* 67, 632–638.

Erbay, Z., Icier, F., 2010. The importance and potential uses of olive leaves. *Food Reviews International* 26, 319–334.

Fares, R., Bazzi, S., Baydoun, S.E., Roula, M., Massih, A., 2011. The antioxidant and anti-proliferative activity of the lebanese *Olea europaea* extract. *Plant Foods for Human Nutrition* 66, 58-63.

Gao, J., Chen, J., Tang, X., Pan, L., Xu, L., Zhao, L., Xu, Q., 2006. Mechanism underlying mitochondrial protection of Asiatic acid against hepatotoxicity in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, 227–233.

Hashmi, M.A., Khan, A., Hanif, M., Farooq U., Perveen, S., 2015. Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015, Article ID 541591, 29 pages.

Huang, X., Choi, Y., Im, H., Yarimaga, O., Yoon, E., Kim, H., 2006. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors* 6, 756–782.

Kaeidi, A. Esmaeili-Mahani, S., Sheibani, V., Abbasnejad, M., Rasouljan B., Hajjalizadeh Z., Afrazi, S., 2011. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: In vitro and in vivo studies. *Journal of Ethnopharmacology* 136 (1), 188-196.

Khelif, I., Jellali, K., Michel, T., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.L., Allouche, N., 2015. Characteristics, phytochemical analysis and biological activities of extracts from Tunisian Chetoui *Olea europaea* variety. *Journal of Chemistry*, Article ID 418731, 11 pages.

Komaki, E., Yamaguchi, S., Maru, I., Kinoshita, M., Kakehi, K., Ohta, Y., Tsukada, Y., 2003. Identification of anti- α -amylase components from olive leaf extracts. *Food Science and Technology Research* 9, 35–39.

Lalas, S., Athanasiadis, V., Gortzi, O., Bounitsi, M., Giovanoudis, I., Tsaknis, J., Bogiatzis, F., 2011. Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry* 127, 1521-1525.

- Li, X., Luo, Y., Wang, L., Li, Y., Shi, Y., Cui, Y., Xue, M., 2010. Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 131, 110–115.
- Lima, C.M., Lima, A.K., Melo, M.G.D., Dória, G.A.A., Leite, B.L.S., Serafini, M.R., Albuquerque-Júnior, R.L.C., Araújo, A.A.S., 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena* 10, 034601.
- Martin-Garcia, A.I., Molina-Alcaide, E., 2008. Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 142, 317–329.
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., dos Santos, T.C., Coube, C.S., Leitão, S.G., 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* 15, 127-130.
- Molina-Alcaide, E., Yanez-Ruiz, D.R., 2008. Potential use of olive by-products in ruminant feeding: a review. *Animal Feed Science and Technology* 147, 247–264.
- Morrison, I. M., Asiedu, E.A., Stuchbury, T., Powell A.A., 1995. Determination of lignin and tannin contents of cowpea seed coats. *Annals of Botany* 76, 287-290.
- OECD, 2001. Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. Adopted: 17 December 2001.
- OECD, 2008. Guidelines for the testing of chemicals. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. Adopted: 3 October 2008.
- Oga, S. (Ed.) - Fundamentos de Toxicologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu. 2008.
- Ojiako, O.A., Nwanyo, H.U., 2006. Is *Vernonia amygdalina* hepatotoxic or hepatoprotective? Response from biochemical and toxicity studies in rats. *Journal of Biotechnology* 5, 745–750.
- Papoti, V.T., Tsimidou, M.Z., 2009. Impact of Sampling Parameters on the Radical Scavenging Potential of Olive (*Olea europaea* L.) Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3470–3477
- Rahmanian, N., Jafari S.M., Wani, T.A., 2015. Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science & Technology* 42, 150-172.
- Roy, C.K., Kamath, J.V., Asad, M., 2006. Hepatoprotective activity of *Psidium guajava* Linn. *Indian Journal of Experimental Biology* 44, 305–311.
- Soni, M.G., Burdock. G.A., Christian, M.S., Bitler, C.M., Crea, R., 2006. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology* 44, 903–915.

Tasioula-Margari, M., Ologeri, O., 2001. Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC/MS. *Journal of Food Science* 66, 530–534.

Woisky, R.G., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal Apicultural Research* 37, 99-105.

Figure legends

Figure 1. Percentage inhibition of DPPH by different concentrations of olive tincture compared with standard ascorbic acid.

Table legends

Table 1. Total polyphenols content and total flavonoids in the tincture of *Olea europaea* L. leaves expressed on mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry fraction and mg rutin equivalent (RE)/g dry fraction, respectively. 50% Inhibitory Concentration (IC₅₀) determined by DPPH method. Data are expressed as mean ± standard deviation (S.D).

Table 2. Hematological parameters in rats treated with *Olea europaea* L. at single dose of 2000 mg/kg. The results are expressed as mean ± standard deviation (S.D), *n*=3 (per gender). * Significantly different from control group: *p* < 0.05.

Table 3. Biochemical parameters in rats treated with *Olea europaea* L. at single dose of 2000 mg/kg. The results are expressed as mean ± standard deviation (S.D), *n*=3 (per gender). * Significantly different from control group: *p* < 0.05.

Table 4. Hematological parameters of males rats after 28 days treatment with *Olea europaea* L. at doses of 100, 200 and 400 mg/kg. The results are expressed as mean ± standard deviation (S.D), *n*=5. No significant differences were observed.

Table 5. Hematological parameters of females rats after 28 days treatment with *Olea europaea* L. at doses of 100, 200 and 400 mg/kg. The results are expressed as mean ± standard deviation (S.D), *n*=5. No significant differences were observed.

Table 6. Biochemical parameters of males rats after 28 days treatment with *Olea europaea* L. at doses of 100, 200 and 400 mg/kg. The results are expressed as mean ± standard deviation (S.D), *n*=5. * Significantly different from control: *p* < 0.05. # Significantly different from 100 mg/kg: *p* < 0.05. ** Significantly different from groups: *p* < 0.05.

Table 7. Biochemical parameters of females rats after 28 days treatment with *Olea europaea* L. at doses of 100, 200 and 400 mg/kg. The results are expressed as mean ± standard deviation (S.D), *n*=5. # Significantly different from 400 mg/kg group: *p* < 0.05.

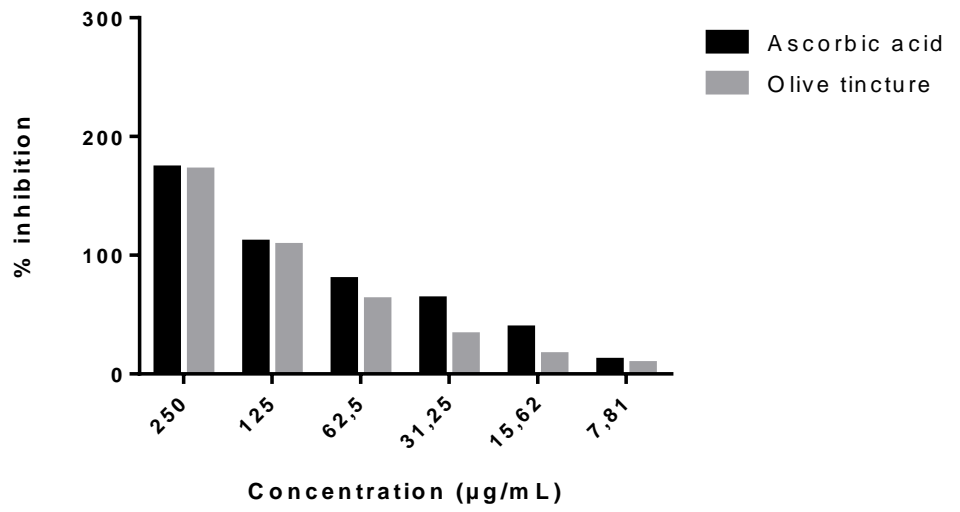


Figure 1

Table 1

Tincture of <i>Olea europaea</i> L.	
PT (mg EAG/g)	263.66 ± 3.47
FT (mg ER/g)	22.04 ± 0.50
IC ₅₀ (µg/mL)	0.0458 ± 0.18
Ascorbic acid (µg/mL)	0.0159 ± 0.36

Table 2

Gender	Parameters	Group	
		Control	2000 mg/kg
Males	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	7.36 ± 0.34	7.20 ± 0.24
	HGB (g/dL)	15.60 ± 0.54	$14.60 \pm 0.54^*$
	HCT (%)	50.80 ± 1.30	49.0 ± 1.58
	MCV (fL(μm^3))	64.80 ± 0.83	$62.20 \pm 1.78^*$
	CHCM (g/dL)	32.40 ± 0.89	32.80 ± 0.83
	RDW (%)	15.94 ± 0.25	16.0 ± 0.26
	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	1501.2 ± 216.71	$1259.2 \pm 70.38^*$
	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	12.82 ± 1.04	$10.63 \pm 1.12^*$
Females	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	7.75 ± 0.32	$7.11 \pm 0.43^*$
	HGB (g/dL)	15.88 ± 0.46	$14.35 \pm 0.75^*$
	HCT (%)	50.40 ± 1.81	47.0 ± 2.82
	MCV (fL(μm^3))	63.20 ± 1.30	62.0 ± 1.15
	CHCM (g/dL)	32.20 ± 0.83	32.50 ± 0.57
	RDW (%)	14.40 ± 0.89	14.50 ± 0.57
	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	1317.4 ± 247.38	1293.0 ± 106.69
	WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	9.76 ± 1.59	10.08 ± 1.28

Table 3

Gender	Parameters	Group	
		Control	2000 mg/kg
Males	ALT (U/L)	52.25 ± 9.94	67.0 ± 13.29
	AST (U/L)	100.50 ± 3.31	115.50 ± 16.66
	CRE (mg/dL)	0.70 ± 0.07	0.66 ± 0.11
	BUN (mg/dL)	56.50 ± 4.12	50.50 ± 2.88
	CHOL (mg/dL)	118.75 ± 4.34	97.50 ± 9.67*
	GLU (mg/dL)	173.50 ± 24.67	217.50 ± 35.59
Females	ALT (U/L)	32.50 ± 1.0	40.25 ± 5.67*
	AST (U/L)	99.60 ± 5.81	96.60 ± 13.46
	CRE (mg/dL)	0.78 ± 0.04	0.68 ± 0.04*
	BUN (mg/dL)	61.40 ± 9.26	61.60 ± 8.84
	CHOL (mg/dL)	117.0 ± 24.46	108.80 ± 21.84
	GLU (mg/dL)	183.75 ± 29.53	246.75 ± 16.66*

Table 4

Parameters	Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
RBC (10 ⁶ /μL)	8.44 ± 0.25	8.17 ± 0.28	8.54 ± 0.55	8.18 ± 0.45
HGB (g/dL)	16.44 ± 0.53	15.70 ± 0.46	16.46 ± 0.69	16.04 ± 0.63
HCT (%)	49.60 ± 1.51	47.40 ± 1.51	49.40 ± 1.81	47.80 ± 1.30
MCV (fL(μm ³))	58.70 ± 1.35	58.12 ± 1.84	57.92 ± 1.92	58.58 ± 2.37
CHCM (g/dL)	33.14 ± 0.24	33.04 ± 0.19	33.24 ± 0.29	33.46 ± 0.75
PLT (10 ³ /μL)	1128.4 ± 111.73	990.2 ± 64.36	1021.0 ± 59.03	1006.0 ± 78.27
WBC (10 ³ /μL)	11.85 ± 0.38	11.85 ± 0.51	9.36 ± 0.87	11.4 ± 1.27

Table 5

Parameters	Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	7.40 ± 0.54	7.50 ± 0.57	7.80 ± 0.44	7.20 ± 0.54
HGB (g/dL)	14.78 ± 0.56	14.80 ± 0.85	15.22 ± 0.59	14.28 ± 0.72
HCT (%)	44.20 ± 1.92	44.50 ± 2.64	45.80 ± 1.64	42.80 ± 2.68
MCV (fL(μm^3))	57.36 ± 1.60	57.50 ± 1.54	58.50 ± 1.83	57.66 ± 3.11
CHCM (g/dL)	33.40 ± 0.29	33.15 ± 0.20	33.14 ± 0.26	33.34 ± 0.59
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	1240.6 ± 271.02	1029.0 ± 108.24	1174.4 ± 132.30	1151.0 ± 114.85
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	8.32 ± 0.94	9.72 ± 2.57	8.97 ± 1.20	8.36 ± 1.80

Table 6

Parameters	Group			
	Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
ALT (U/L)	39.40 ± 4.50	43.80 ± 5.01	38.80 ± 6.61	38.75 ± 4.99
AST (U/L)	88.40 ± 6.58	89.0 ± 5.70	88.50 ± 6.85	72.0 ± 10.86 **
CRE (mg/dL)	0.74 ± 0.05	0.78 ± 0.04	0.72 ± 0.08	0.68 ± 0.08
BUN (mg/dL)	36.0 ± 4.08	54.50 ± 5.06*	47.75 ± 4.64*	55.66 ± 2.51*
CHOL (mg/dL)	62.40 ± 4.66	60.50 ± 7.04	60.0 ± 9.56	50.0 ± 9.09
GLU (mg/dL)	243.75 ± 18.75	235.25 ± 19.18	191.25 ± 11.44*#	203.25 ± 17.95*

Table 7

Parameters	Group			
	Control	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
ALT (U/L)	34.40 ± 5.41	43.20 ± 9.41	32.0 ± 8.18	34.20 ± 6.64
AST (U/L)	90.25 ± 12.09	112.75 ± 25.11	93.0 ± 8.28	88.75 ± 3.50
CRE (mg/dL)	0.72 ± 0.04	0.68 ± 0.08	0.68 ± 0.16	0.70 ± 0.14
BUN (mg/dL)	49.0 ± 6.44	50.20 ± 7.04	57.80 ± 4.14	48.75 ± 8.05
CHOL (mg/dL)	69.25 ± 13.96	60.40 ± 10.28	77.20 ± 11.75	65.80 ± 5.89
GLU (mg/dL)	208.75 ± 23.12	210.50 ± 33.07	166.50 ± 16.34#	222.25 ± 22.60

2.2 MANUSCRITO 2

ANTIDIABETIC EFFECTS OF *Olea europaea* L. IN DIABETIC RATS INDUCED BY HIGH-FAT DIET AND LOW-DOSE STREPTOZOTOCIN

O presente manuscrito será submetido à revista *Journal of Functional Foods*.

ANTIDIABETIC EFFECTS OF *Olea europaea* L. IN DIABETIC RATS INDUCED BY HIGH-FAT DIET AND LOW-DOSE STREPTOZOTOCIN

Camille Gaube Guex^a, Fernanda Ziegler Reginato^a, Patrícia Romualdo de Jesus^a,
Gilberti Helena Hübscher Lopes^b, Liliane de Freitas Bauermann^a

^aDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^bDepartamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Postal address: Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, nº 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97105-900

E-mail address of authors: camilleguex@yahoo.com.br, fernanda_zr@yahoo.com.br, patriciardejesus@gmail.com, gilberti@gilbertinutri.com.br, lgfbauermann@gmail.com

Corresponding author:

Camille Gaube Guex

E-mail: camilleguex@yahoo.com.br

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Santa Maria, RS. Telefone: (55) 3220 9380

Abstract: Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia, insulin resistance and dyslipidemia. It is widely distributed worldwide and affects millions of people and can cause serious complications. Olive (*Olea europaea* L.) has important pharmacological roles, including anti-inflammatory, antioxidant and hypoglycemic activities. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of the tincture of olive leaves (TOL) in metabolism of diabetic rats induced by high fat diet and low dose of streptozotocin (STZ). Animals treated with TOL showed an improvement in glucose levels, as well as improved levels of inflammatory and metabolic markers when compared to diabetic animals. These results indicate a potential anti-diabetic activity of olive leaves, but more studies are needed to validate its clinical effects.

Keywords: Diabetes mellitus. Olive. High fat diet. Streptozotocin.

Highlights:

Diabetes mellitus is a widespread disease worldwide;

It is associated with high rates of mortality and morbidity due to its complications;

Medicinal plants possess bioactive constituents that are important in diseases prevention and treatment;

Olive has important biological activities that may be useful in the treatment of diabetes mellitus.

1 Introduction

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia, resulting in defects in insulin secretion and/or action, and dyslipidemia. DM can be classified into two main classes: type 1 diabetes mellitus (T1DM) and type 2 diabetes mellitus (T2DM), with T2DM affecting about 5% of the population (Wang *et al.*, 2009). Being associated with long-term damage, dysfunction and failure of organs, T2DM is currently one of the most costly chronic diseases in the world (American Diabetes Association, 2011; Constantino *et al.*, 2013) and is associated with obesity and insulin resistance, as well as defects in pancreatic β -cell function and mass (Skovsø, 2014). The increase of diabetic patients has been partly associated with the consumption of a high calorie diet, sedentary lifestyle and obesity (Klein *et al.*, 2007).

Many drugs have been used for treatment of diabetes, however their high cost associated with adverse effects has increased the search for alternative therapies. Recently, evidence about complementary treatments for T2DM through plants and their bioactive compounds have increased (Mirmiran *et al.*, 2014). About 80% of people with diabetes in the world depend on medicinal plants for a successful treatment (Oloyede *et al.*, 2015). Among them, *Olea europaea* L., popularly known as olive tree, has fruit, leaves and oil with a history of commercial, medicinal and nutritional purposes (Soni *et al.*, 2006). Its leaves are considered low raw materials, which provide constituents with extensive pharmacological properties as antiarrhythmic, spasmolytic, immune-stimulant, and liver, kidney and heart protective effects. Moreover, anti-atherosclerotic, hypotensive, anti-inflammatory, antioxidant, anti-thrombotic and hypoglycemic effects were reported (Visioli *et al.*, 1998; Andrikopoulos *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008; Wainstein *et al.*, 2012; Kumral *et al.*, 2015). Its bioactive compounds such as oleuropein, verbascoside, rutin, tyrosol and hydroxytyrosol may also be

responsible for the biologic activities of this plant, such as antioxidant, antimicrobial and antiproliferative effects (Rahmanian *et al.*, 2015). Due to its hypoglycemic activity, new studies regarding the olive and its potential treatment for T2DM play an important role in the health science field. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of tincture of olive leaves on metabolism of rats with high-fat-diet- and streptozotocin induced diabetes.

2 Material and methods

2.1 Chemical and reagents

Streptozotocin (STZ) was purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA). Tincture of *Olea europaea* L. leaves (TOL - v/v 51%) was purchased from Flores e Ervas Com. Farm. Ltda. (Piracicaba, São Paulo, Brazil).

2.2 Animals

Male *Wistar* rats (weighing 100-150 g) were obtained from the animal house of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) and randomly housed in polypropylene cages at different experimental groups. Animals were acclimatized for a week before the commencement of the experiment and maintained under controlled temperature (22 ± 2 °C) with a constant 12 h light/dark cycle. All animals were allowed free access to food (regular or special diet) and water. Also, they were handled in accordance with the ethical principles for animal experimentation developed by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). This study was approved by the Comitê de Ética no Uso de Animais from UFSM under the number 121/2014.

2.3 Induction of diabetes mellitus type 2

Animals were fed with high-fat diet consisted of 70% standard laboratory chow, 15% sucrose, 10% lard and 5% yolk powder (Wu *et al.*, 2012) for an initial period of four weeks. Normal control group animals received standard laboratory chow. Streptozotocin was administered intraperitoneally at low dose (35 mg/kg) dissolved in vehicle (0.01 M sodium citrate buffer, pH 4.5) according to Srinivasan *et al.* (2005), while only the vehicle was administered to the control normal group. Fasting blood glucose was measured one day before and seven days after administration of STZ by manual glucometer (CONTOUR™TS, Bayer HealthCare LLC, Mishawaka, EUA). Animals with fasting glucose levels above 200 mg/dL were considered diabetic. Both groups continued to receive their respective diets for another 4 weeks before the initiation of treatment with TOL and body weight was measured weekly.

2.4 Experimental design

Animals were divided into 5 groups with 5 animals each (n = 25) and all treatments were by oral gavage, daily for 10 weeks. Groups were divided as follows: Group I. normal control: animals received regular diet and treated with ethanol (tincture's vehicle - 10 mL/kg); Group II diabetic control: diabetic animals treated with ethanol (10 mL/kg); Group III: positive control: diabetic animals treated with metformin (250 mg/kg); Groups IV and V: diabetic animals treated with TOL (200 mg/kg and 400 mg/kg, respectively). Animals continued to receive their respective diets during the treatment. At the end of the treatment, animals were fasted overnight, but allowed free access to water. They were then anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg, intraperitoneally - i.p.) associated with lidocaine hydrochloride (10 mg/mL) and blood

collected with and without anticoagulant (ethylene diamine tetra acetate) by cardiac puncture for hematologic and biochemical analyses and kidney was removed for posterior analyses.

2.5 Biochemical and hematological parameters

Blood without anticoagulant was allowed to clot before centrifugation (4000 rpm for 10 min) to obtain serum, which was utilized for the assessment of total cholesterol (CHOL), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE) levels, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities, using a commercial kit (Diagnostic Kits Laboratory Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil) and semi-automatic biochemical analyzer (Genz, Bioplus: Bio-2000). Blood glycosylated hemoglobin (HbA1c) was estimated by a commercial Kit (BioSystem SA, Barcelona, Spain) according to manufacturer method. A rat-specific insulin ELISA kit (Spi-Bio, Bertin Pharma, France) was used to measure serum insulin levels, spectrophotometric reading was performed between 405 and 414 nm. Glucose concentrations were measured by using ACCU-Chek Active (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Cytokines (interleukins 6 and 10, tumor necrosis factor and interferon- γ) and adipokines (leptin, ghrelin, adiponectin and resistin) were also measured by routine kit (R & D Systems kit, USA).

Total blood was analyzed immediately for hematological parameters: red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volum (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM), platelets (PLT) and leukocyte total count were determined by using an automatic counter veterinary Mindray BC 2800.

2.6 Lipid peroxidation/*In vivo* antioxidant activity

Kidney (KD) lipoperoxidation (LPO) estimation was performed using TBARS method, where the colorimetric reaction of the LPO product malondialdehyde (MDA) with thiobarbituric acid (TBA) is quantified. This reaction produces a colored compound that absorbs maximally at 532 nm as described by Buege and Aust (1987). Catalase (CAT) activity was determined in KD by measuring the decrease in hydrogen peroxide (H₂O₂) absorption. It is based on the consumption of H₂O₂ by CAT and loss of absorbance at 240 nm according to Aebi (1984). Superoxide dismutase activity was determined by its ability to inhibit the auto-oxidation of epinephrine determined in absorbance at 480 nm as described by Sun & Zigman (1978). The reaction mixture (3 ml) contained 2.95 ml 0.05 M sodium carbonate buffer pH 10.2, 0.02 ml of the KD and 0.03 ml of epinephrine in 0.005 N HCl, was used to initiate the reaction.

2.7 δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity

Renal δ -ALA-D activity was assayed by the modified method of Sassa (1982) by measuring the rate of formation of porphobilinogen (PBG), in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 and 2.4 mM of aminolevulinic acid (ALA) were used (Barbosa *et al.*, 1998). Incubations of KD were carried out for 60 min at 37 °C. The reaction product was determined by using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of 6.1×10^4 /M for the Ehrlich-porphobilinogen salt.

2.8 Statistical analysis

All the results were assessed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey *post-hoc* test. The differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Body weight

Body weight of animals during the treatment showed a normal trend during 15 weeks of treatment, however from the 16th there was a significant decrease in diabetic animals treated with ethanol and TOL compared to the control group (figure 1).

3.2 Biochemical and hematological parameters

AST activity was significantly reduced in groups treated with metformin and TOL at dose of 200 mg/kg ($p < 0.05$) compared to the control group. There was no significant change in ALT activity between different groups. BUN levels significantly increased in animals treated with TOL at dose of 200 mg/kg ($p < 0.05$) compared to the control group, while CRE levels did not show changes. There were no significant changes in CHOL levels between groups. Figure 2 shows the insulin levels, which had reduced in diabetic animals in their different groups compared to the control group ($p < 0.0001$). Level of glucose was significantly elevated in diabetic group ($p < 0.0001$) compared to control group and a significant reduction was observed in animals treated with

metformin and TOL at dose of 200 and 400 mg/kg ($p < 0.0001$). Hb1Ac levels were not significantly different between groups (figure 3).

As shown in figure 4, interleukin-6 (IL-6) significantly increased in diabetic animals ($p < 0.0001$) compared to the control group. The treatment with metformin and TOL at dose of 400 mg/kg was able to significantly decrease their levels ($p < 0.0001$) compared to the diabetic group. In the control group, IL-10 was significantly higher ($p < 0.0001$) compared to diabetic group, while the animals treated with TOL at dose of 400 mg/kg had their levels increased significantly ($p < 0.0001$). Figure 4 also shows tumor necrosis factor concentrations (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ). Both inflammatory markers showed significant increase in diabetic animals compared to the control group ($p < 0.0001$) and treatment with metformin and TOL at both doses reduced TNF- α levels ($p < 0.0001$). Animals treated with metformin and TOL at dose of 400 mg/kg showed significantly reduced concentrations of IFN- γ ($p < 0.0001$).

Leptin levels increased significantly in diabetic animals ($p < 0.0001$) compared to the control group, while the animals treated with metformin and TOL at both doses had their levels reduced ($p < 0.0001$). There were no significant changes in ghrelin levels. A significant reduction in adiponectin levels ($p < 0.0001$) was observed in diabetic group compared to the control group. The treatments with metformin and TOL at 400 mg/kg were able to raise the levels of adiponectin ($p < 0.0001$). Diabetic animals showed increased levels of resistin ($p < 0.0001$) when compared to control group. The treatments with metformin and TOL (200 mg/kg and 400 mg/kg) were able to reduce the levels of resistin ($p < 0.0001$) (Figure 5).

The hematological analyses of diabetic animals treated with TOL, at both doses, presented a significant increase in platelets when compared to the control and diabetic

groups. The other parameters analyzed showed no significant changes (data not shown).

3.3 Lipid peroxidation/in vivo antioxidant activity

Animal's kidneys malondialdehyde levels showed no significant difference between the groups, as well as CAT and SOD activities (data not shown).

3.4 δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) activity

δ -ALA-D enzyme activity was not significantly different between groups (data not shown).

4 Discussion

Diabetes mellitus is a disease that is highly prevalent worldwide and is associated with high indices of mortality and morbidity. When not treated properly, it can trigger serious complications such as neuropathy, nephropathy, cardiovascular diseases, etc (American Diabetes Association, 2011). In this study, we induced T2DM through high fat diet associated with a low dose of streptozotocin in rats because this model is able to reflect the clinical symptoms observed in human diagnosed with the disease (Skovsø, 2014). The study of plants in the treatment of diabetes has become important due to its bioactive constituents with therapeutic potential. Olive is known to improve metabolic disorders and have antidiabetic properties (Bennabi-Kabchi *et al.*, 2000; Keys, 1995). In study performed by Khelif *et al.* (2015) with extracts from leaves of different species of olive, the HPLC-DAD analysis revealed the presence of phenolic

compounds (hydroxytyrosol and tyrosol), secoiridoids (oleuropein) and flavonoids (quercetin and luteolin). The biological activities of olive's species are attributed mainly to the oleuropein and phenolic constituents of its leaves (Kaeidi *et al.*, 2011). Flavonoids are widely known for their ability to improve diabetic conditions by reducing blood glucose levels (Rauter *et al.*, 2010). Body weight of individuals with DM also affects present modifications. While T1DM can cause a sudden loss of weight, this scenario is rarely observed on T2DM diagnosis, except when there are no diagnosis and no proper treatment, when a significant loss weight over time is observed (Skovsø, 2014). Our results show a significant weight reduction from 16th week of diabetic rats treated with ethanol and TOL at both doses when compared to the control group animals. Insulin deficiency can lead to a catabolism of proteins in muscular tissue, which can explain the reduction on body weight (Sundaram *et al.*, 2013). Raising the dose and duration of treatment with TOL may be important factors to maintain the body weight of animals.

Increase in glucose, the first characteristic presented by patients, and circulating insulin levels may indicate a higher degree of insulin resistance (Wu *et al.*, 2002). HbA1c reflects the average blood glucose values during the last 2-3 months and it has been used to determine the metabolic control in DM and also the risk of complications (Escribano Serrano *et al.*, 2010; López-Tinoco *et al.*, 2006). The transition from a healthy state to a pre-diabetes is usually characterized by obesity, hyperinsulinemia, insulin resistance, dyslipidemia, inflamed and dysfunctional adipose tissue and failure of β -cells (Tabak *et al.*, 2009; Nolan *et al.*, 2011; Sattar *et al.*, 2007). After treatment with STZ and high fat diet, rats presented hyperglycemia, elevated HbA1c and reduced insulin levels. Diabetic animals showed significant increase in blood glucose compared to the control group. Treatment for 10 weeks with metformin and TOL significantly

reduced glucose levels compared to the diabetic group treated only with ethanol. Although rats treated with TOL have presented a smaller decrease compared to metformin group, it is important to analyze time and dose chosen in this work, and a better result may be increase-dependent of these factors. The animals treated with high fat diet and low dose of STZ exhibited hyperglycemia, insulin resistant, moderate impairment of insulin secretion and abnormalities in lipid metabolism, characteristics of later-stage T2DM (Srinivasan *et al.*, 2005). In our study, diabetic animals showed a significant reduction in insulin levels when compared with the control group. The treatment with TOL showed improvement when compared with animals treated with metformin, although it was not significant. According to (Sato *et al.*, 2007) the mechanism for the olive leaves and oleuropein act in DM can be explained by increased peripheral glucose utilization and improved glucose stimulated insulin release.

For most diabetics, values of HbA1c lower than 7% are considered as indicative of good glycemic control (ADA, 2014). Although HbA1c levels were not significantly different between groups, we observed an increase in diabetic groups compared to the control, exceeding the desirable value of 7%. Rats treated with metformin had a reduction in their levels when compared to the diabetic group, although it was not able to reverse their levels to less than 7%. Treatment with TOL did not attenuate HbA1c levels, but since this is a test that evaluates a long-term blood glucose, it is important to be dosed at least twice a year (Alonso-Fernández *et al.*, 2015) to obtain insurance results.

Olive antioxidant activity is also associated with its antidiabetic properties (Al-Azzawie & Alhamdani, 2006). Oxidative stress can be resulted from an inadequate glycemic control with glucose levels above normality. Clinical evidence has shown that

the DM is closely related to oxidative stress, resulting in an increased production of free radicals or a reduction in antioxidant defense system (Susztak *et al.*, 2006). Reactive oxygen species react with the lipids, resulting in increased lipid peroxidation, such as MDA (Rishi *et al.*, 2009), which is responsible for causing damage to cells and tissues. STZ administration in experimental animals showed increased levels of MDA and reduced antioxidant enzymes activity catalase and superoxide dismutase (Laaksonen *et al.*, 2002; Vergani *et al.*, 2004; Eleazu *et al.*, 2013). The antioxidant intake through natural products has become an important ally in the treatment of certain diseases to alleviate the damage caused by oxidative stress. In a study developed by Al-Azzawie & Al Hamdani (2006) using diabetic rabbits induced by alloxan, oleuropein shown to increase the activities of antioxidant enzymes such as SOD and CAT. In this work, we evaluated the activities of CAT and SOD, but it was not possible to observe significant changes between the groups. As well we found no differences between groups when analyzing the MDA level through the TBARS method. δ -Aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) is a sulfhydryl-containing enzyme that is sensitive to oxidizing agents (Farina *et al.*, 2003) and plays a fundamental role in heme biosynthesis. Thus, it is also a good parameter for assessing the toxicity of xenobiotics. Besides, the decreased activity of δ -ALA-D is related to in experimental and human diabetes (Fernandez-Cuartero *et al.*, 1999). However in our work no change was observed in the δ -ALA-D enzyme activity.

Renal markers BUN and CRE were analyzed, showing significant increase in urea levels in the group treated with TOL at dose of 200 mg/kg when compared to the control group. This result can demonstrate kidney injury, but more tests are needed to validate this result. AST enzyme is found in a variety of tissues such as liver, heart and brain, whereas the ALT is normally found in the liver in higher proportions. When found

in the blood, it is usually the result of liver damage, being an important marker of liver health. The liver has an important role in the balance of blood glucose levels through glucose uptake and storage via glycogenesis and glucose release via glycogenolysis and gluconeogenesis (Nordlie *et al.*, 1999). Our results showed no significant differences in ALT activity between groups, while AST significantly reduced in the groups treated with metformin and TOL at dose of 200 mg/kg, when compared to the control group, implying that there was no liver damage in animals. Regarding to hematological parameters, the significant increased values of platelets observed in groups of animals treated with TOL in relation to other groups is within the normal levels for the species (Lima *et al.*, 2014).

Adipocytes have a regulatory role in development of insulin resistance, which can produce adipokines (Muoio & Newgard, 2008), having an important role in development of diabetes. Adiponectin contributes to the regulation of glucose and lipid metabolism (Tsao *et al.*, 2002) and their concentration is decreased in serum of individuals and obese or insulin resistant rodents (Guimarães *et al.*, 2007). Adiponectin levels of diabetic animals were reduced compared to the other groups and the treatment with TOL at dose of 400 mg/kg increased their levels compared to the diabetic group. According to Guimarães *et al.*, (2007), the increase in adiponectin is capable of reducing the blood glucose and improving insulin resistance in diabetic rats. Its activity in the improvement of DM can be explained by the fact that it activate the kinase monophosphate adenine enzyme in the liver, resulting in a reduction in hepatic glucose production (Yamauchi *et al.*, 2002). Resistin is expressed in white adipose tissue and its secretion is related to insulin resistance (Steppan *et al.*, 2002). In obese and diabetic animals the concentrations of resistin are increased, similarly to the results found in this work. A significant reduction of resistin was observed in animals

treated with metformin and TOL when compared to diabetic animals. Leptin is associated with food intake, exercising beneficial effect on the energy balance, insulin action and vascular protection. The diabetic animals have high levels of leptin corroborating with Romero & Zanesco (2006) where hyperleptinemia, found in diabetes mellitus, is attributed to alterations in the leptin receptor or to a deficiency in their transport system in the blood-brain barrier. Ghrelin influences the pancreatic endocrine function and glucose metabolism and our results showed no significant differences between groups. These results corroborate with study performed by Han & Levings (2013) where severe expansion of adipose tissue is associated with adipose inflammation and an altered profile of adipokines, marked by high levels of leptin and low adiponectin mainly. Improved profile of adipokines is an important factor in the treatment of diabetes, and the results obtained with treatment with TOL is a potential therapeutic target, since it was able to improve the changes in adipokines caused by diabetes.

DM has been demonstrated to be an inflammatory disease (Donath & Shoelson, 2011). IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ were the analyzed inflammatory markers. The cytokines IL-1 and IL-6 have pro-inflammatory nature, whereas IL-10 is an anti-inflammatory cytokine. Therefore, in the control group, the concentration of IL-10 increased compared to different groups. The IL-6 levels in diabetic animals was significantly increased compared to the control group, showing an inflammatory process. According to Guimarães *et al.* (2007), IL-6 exerts a direct action on insulin sensitivity by altering insulin signaling in hepatocytes by inhibiting the insulin receptor autophosphorylation-dependent, developing resistance to the action of the hormone in the tissue. TNF- α is associated with improvement in insulin resistance, present in high levels in obesity and reduced with weight loss (Fruhbeck *et al.*, 2001). Studies show

that the increased TNF- α gene expression in adipose tissue, as well as its high plasma concentration could lead to obesity by altering the release in blood circulation of other adipocytokines. Reduced adiponectin levels found in diabetic animals can be explained by the fact that TNF- α and IL-6 are potent inhibitors of its expression and secretion. Our results showed decrease in IL-6, IFN- γ and TNF- α levels and increase in IL-10 levels in animals treated with TOL. Similarly, Liu *et al.* (2014) and Park *et al.* (2013) demonstrated that oleuropein-rich extract reduced the secretion of the proinflammatory cytokine such as TNF, IFN- γ , IL-6, IL-1 β and IL-17A, whereas it increased the levels of the antiinflammatory cytokine IL-10 in streptozotocin-induced diabetic mice.

5 Conclusion

This study demonstrated that tincture of olive leaves have an important influence on diabetes mellitus, by having benefits on blood glucose and adipokine concentrations in diabetic animals. Its has also been able to attenuate the inflammatory markers, important in pathogenesis of DM. However, more studies are needed to validate the clinical improvement of olive in experimental model of T2DM.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank CAPES, UFSM and Bioclin/Quibasa for the financial assistance.

References

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105, 121–126.

Al-Azzawie, H.F., Alhamdani, M.S., 2006. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences* 78, 1371–1377.

Alonso-Fernández, M., Mancera-Romero, J., Mediavilla-Bravo, J.J., Comas-Sampere, J.M., López-Simarro, F., Pérez-Unanue, M.P., Iturralde-Iriso, J., 2015. Glycemic control and use of A1c in primary care patients with type 2 diabetes mellitus. *Primary Care Diabetes* 9, 385-391.

American Diabetes Association, 2011. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34, S62-S69.

American Diabetes Association (ADA), 2014. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 37 (Suppl. 1), S21–S26.

Andrikopoulos, N.K., Antonopoulou, S., Kaliora, A.C., 2002. Oleuropein inhibits ldl oxidation induced by cooking oil frying byproducts and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *LWT - Food Science and Technology* 35, 479–484.

Barbosa, N.V., Rocha, J.B.T., Zeni, G., Emanuelli, T., Beque, M.C., Braga, A.L., 1998. Effect of organic forms of selenium on aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 149, 243–253.

Buege, J.A., Aust, S.D., 1987. Microsomal peroxidation. *Methods in Enzymology* 52, 302–310.

Constantino, M.I., Molyneaux, L., Limacher-Gisler, F., Al-Saeed, A., Luo, C., Wu, T., Wong, J., 2013. Long-term complications and mortality in young-onset type 2 diabetes is more hazardous and lethal than type 1 diabetes. *Diabetes Care* 36 (12), 3863-3869.

Donath, M.Y., Shoelson, S.E., 2011. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* 11 (2), 98-107.

Eleazu, C.O., Eleazu, K.C., Chukwuma, S., Essien, U.N., 2013. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 12, 60-67.

Escribano Serrano, J., García Domínguez, L., Díaz Pintado, M.T., 2010. Glycohemoglobin HbA1c. First part: to know it. *Semergen* 36, 82–88.

Farina, M., Brandão, R., Lara, F.S., Soares, F.A., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2003. Mechanisms of the inhibitory effects of selenium and mercury on the activity of δ -aminolevulinic acid dehydratase from mouse liver, kidney and brain. *Toxicology Letters* 139, 55–66.

Fernandez-Cuartero, B., Rebollar, J.L., Batle, A., Enriquez de Salamanca, R., 1999. Delta aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 479–88.

Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F.J., Burrell, M.A., 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 280 (6), E827-47.

Guimarães, D.E.D., Sardinha, F.L.C., Mizurini, D.M., Tavares do Carmo, M.G., 2007. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. *Revista de Nutrição* 20 (5), 549-559.

Han, J.M., Levings, M.K., 2013. Immune regulation in obesity associated adipose inflammation. *Journal of Immunology* 191, 527–532.

Kaeidi, A. Esmaeili-Mahani, S., Sheibani, V., Abbasnejad, M., Rasoulia B., Hajjalizadeh, Z., Afrazi, S., 2011. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: In vitro and in vivo studies. *Journal of Ethnopharmacology* 136 (1), 188-196.

Khlif, I., Jellali K., Michel, T., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.L., Allouche, N., 2015. Characteristics, Phytochemical Analysis and Biological Activities of Extracts from Tunisian Chetoui *Olea europaea* Variety. *Journal of Chemistry*, Article ID 418731, 11 pages.

Klein, G., Kim, J., Himmeldirk, K., Cao, Y., Chen, X., 2007. Antidiabetes and anti-obesity activity of *Lagerstroemia speciosa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 4 (4), 401–407.

Kumral, A., Giris, M., Soluk-Tekkes_in, M., Olgac, V., Dogru-Abbasoglu, S., Turkoglu, U., Uysal, M., 2015. Effect of olive leaf extract treatment on doxorubicin-induced cardiac, hepatic and renal toxicity in rats. *Pathophysiology* 22, 117–123.

Laaksonen, D.E., Atalay, M., Vider, L., Hänninen, O., 2002. Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* 12, 163-170.

Lima, C.M., Lima, A.K., Melo, M.G.D., Dória, G.A.A., Leite, B.L.S., Serafini, M.R., Albuquerque-Júnior, R.L.C., Araújo, A.A.S., 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena* 10, 034601.

Liu, Y.-N., Jung, J.-H., Park, H., Kim, H. S., 2014. Olive leaf extract suppresses mRNA expression of pro-inflammatory cytokines and enhances IRS-1 expression in the rats with streptozotocin and high-fat diet induced diabetes. *Nutrition Research* 34, 450–457, doi:10.1016/j.nutres.2014.04.007.

López-Tinoco, C., Vergara-Chozas, J., Aguilar-Diosdado, M., 2006. Laboratory parameters in patients with diabetes mellitus. *Endocrinology and Nutrition* 53, 418–426.

- Mirmiran, P., Bahadoran, Z., Azizi, F., 2014. Functional foods-based diet as a novel dietary approach for management of type 2 diabetes and its complications: a review. *World Journal of Diabetes* 5 (3), 267-281.
- Muoio, D.M.; Newgard, C.B., 2008. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 193–205.
- Nordlie, R.C., Foster, J.D., Lange, A.J., 1999. Regulation of glucose production by the liver. *Annual Review of Nutrition* 19, 379–406.
- Nolan, C.J., Damm, P., Prentki, M., 2011. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 378, 169–181.
- Oloyede, H.O.B., Bello, T.O., Ajiboye, T.O., Salawua, M.O., 2015. Antidiabetic and antidyslipidemic activities of aqueous leaf extract of *Dioscoreophyllum cumminsii* (Stapf) Diels in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 166, 313–322.
- Park, J.-H., Jung, J.-H., Yang, J.-Y., Kim, H.-S., 2013. Olive leaf down-regulates the oxidative stress and immune dysregulation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Nutrition Research* 33, 942–951.
- Rahmanian, N., Jafari, S.M., Wani, T.A., 2015. Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science & Technology* 42, 150-172.
- Rauter, A.P., Martins, A., Borges, C., Filipe, H.M., Pinto, R., Sepodes, B., Justino, J., 2010. Antihyperglycemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research* 24, S133–8.
- Rishi, P., Mavi S.K., Bharrhan, S., Shukla, G., Tewari, R., 2009. Protective efficacy of probiotic alone or in conjunction with a prebiotic in Salmonella-induced liver damage. *FEMS Microbiology Ecology* 69, 222–30.
- Romero, C.E.M, Zanesco, A., 2006. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. *Revista de Nutrição* 19 (1), 85-91.
- Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28, 133–145.
- Sato, H. Genet, C., Strehle A., Thomas, C., Lobstein, A., Wagner, A., Mioskowski, C., Auwerx, J., Saladin, R., 2007. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362, 793–798.
- Sattar, N., McConnachie, A., Ford, I., Gaw, A., Cleland, S.J., Forouhi, N.G., McFarlane, P., Shepherd, J., Cobbe, S., Packard, C., 2007. Serial metabolic measurements and conversion to type 2 diabetes in the west of Scotland coronary prevention study: specific elevations in alanine aminotransferase and triglycerides suggest hepatic fat accumulation as a potential contributing factor. *Diabetes* 56, 984–991.

Skovsø, S., 2014. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation* 5, 349-358.

Soni, M. G., Burdock, G. A., Christian, M. S., Bitler, C. M., Crea, R., 2006. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology* 44, 903–915.

Srinivasan, K.; Viswanad, B.; Asrat, L.; Kaul, C.L.; Ramarao, P., 2005. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research* 52, 313–320.

Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., Lazar, M.A., 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-12.

Sun, M., Zigman, S., 1978. An Improved Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Based on Epinephrine Autoxidation. I *Analytical Biochemistry* 90, 81-89.

Sundaram, R., Naresh, R., Shanthi, P., Sachdanandam, P., 2013. Modulatory effect of green tea extract on hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin and high fat diet induced diabetic rats. *Phytomedicine* 20, 577–584.

Susztak, K., Raff, A.C., Schiffer, M., Böttinger, E.P., 2006. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* 55, 225–233.

Tabak, A.G., Jokela, M., Akbaraly, T.N., Brunner, E.J, Kivimäki, M., Witte, D.R., 2009. Trajectories of glycemia, insulin sensitivity and insulin secretion preceding the diagnosis of type 2 diabetes: The Whitehall II Study. *Lancet* 373, 2215–2221.

Tsao, T.S., Lodish, H.F., Fruebis, J., 2002. ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *European Journal of Pharmacology* 440, 213–221.

Vergani, L., Floreani, M., Russell, A., Ceccon, M., Napoli, E., Cabrelle, A., Valente, L., Bragantini, F., Leger, B., Dabbeni-Sala, F., 2004. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *European Journal of Biochemistry* 271, 3646-3656.

Visioli, F., Bellasta, S., Galli, C., 1998. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sciences* 62, 541–546.

Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., *et al.*, 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* 8 (11), 1288-95.

Wang, L., Geng, C., Jiang, L., Gong, G., Liu, D., Yoshimura, H., Zhong, L., 2008. The anti-atherosclerotic effect of olive leaf extract is related to suppressed inflammatory response in rabbits with experimental atherosclerosis. *European Journal of Nutrition* 47, 235–243.

Wang, C., Li, J., Lv, X., Zhang, M., Song, Y., Chen L., Liu, Y., 2009. Ameliorative effect of berberine on endothelial dysfunction in diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin. *European Journal of Pharmacology* 620, 131–137.

Wainstein, J., Ganz, T., Boaz, M., Bar, Dayan, Y., Dolev, E., Kerem, Z., Madar, Z., 2012. Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Journal of Medicinal Food* 15, 605–610.

Wu, T., Dorn, J.P., Donahue, R.P., Sempos, C.T., Trevisan, M., 2002. Associations of serum C-reactive protein with fasting insulin, glucose, and glycosylated hemoglobin: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *American Journal of Epidemiology* 155, 65–71.

Wu, D., Wen, W., Qi, C.-L, Zhao, R.-X., Lü, J.-H., Zhong, C.-Y., Chen, Y.-Y., 2012. Ameliorative effect of berberine on renal damage in rats with diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Phytomedicine* 19, 712–718.

Figure and legends

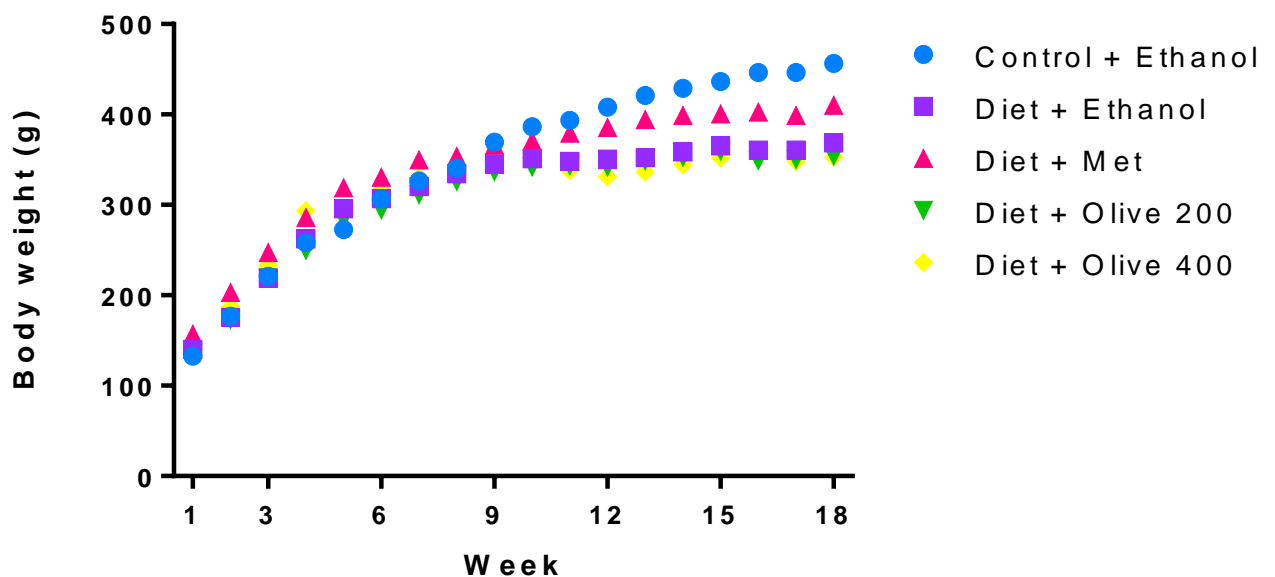


Figure 1. Effect of TOL on body weight of animals (n=5).

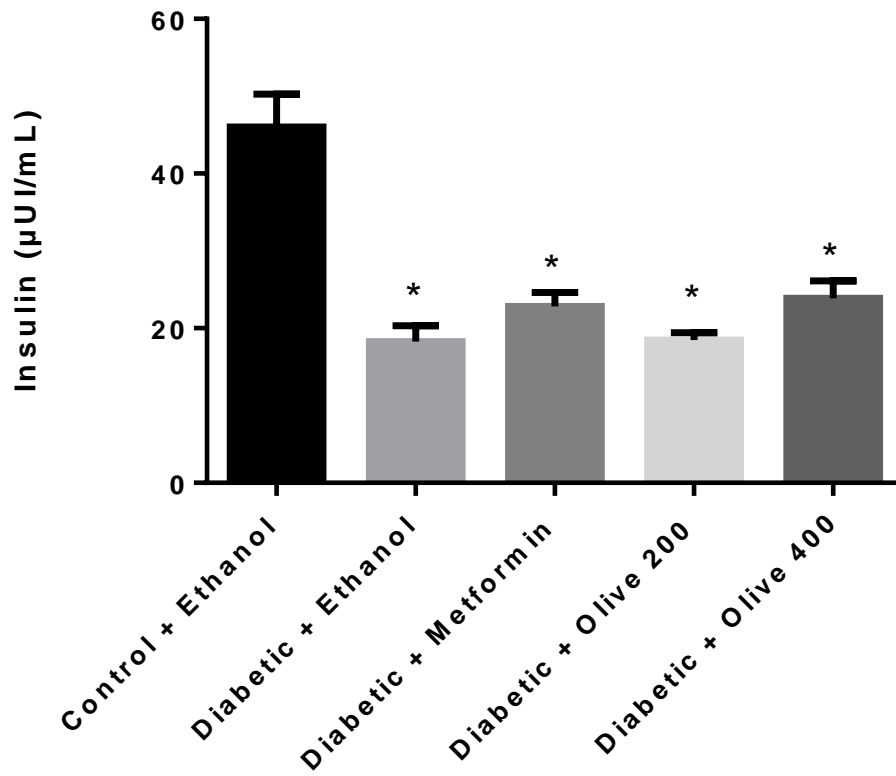


Figure 2. Effect of TOL on insulin level in rats. Columns represent the mean \pm standard deviation (SD), (n=5). *Significantly different from diabetic group: $p < 0.0001$.

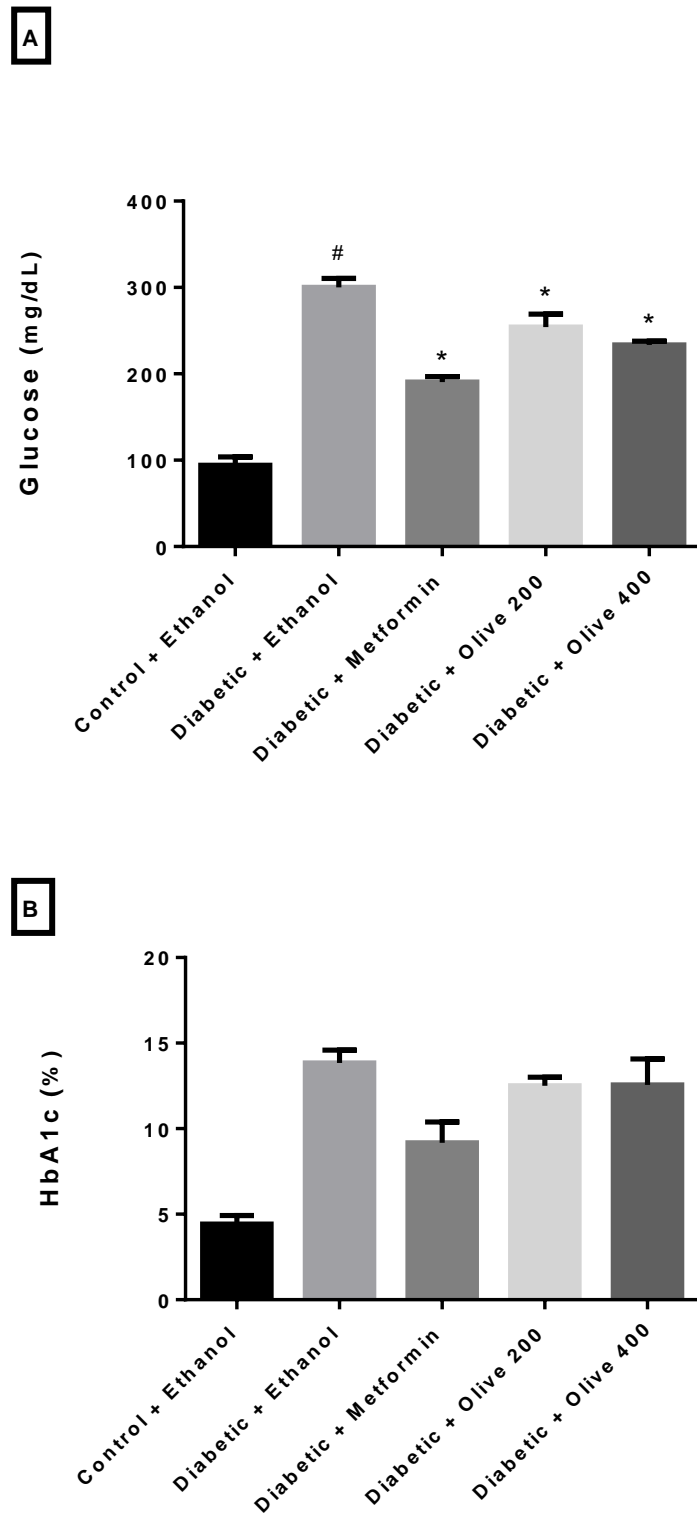


Figure 3. Effect of TOL on glucose (A) and HbA1c (B) levels in rats. Columns represent the mean \pm SD (n=5). [#]Significantly different from control group: $p < 0.0001$. ^{*}Significantly different from diabetic group: $p < 0.0001$.

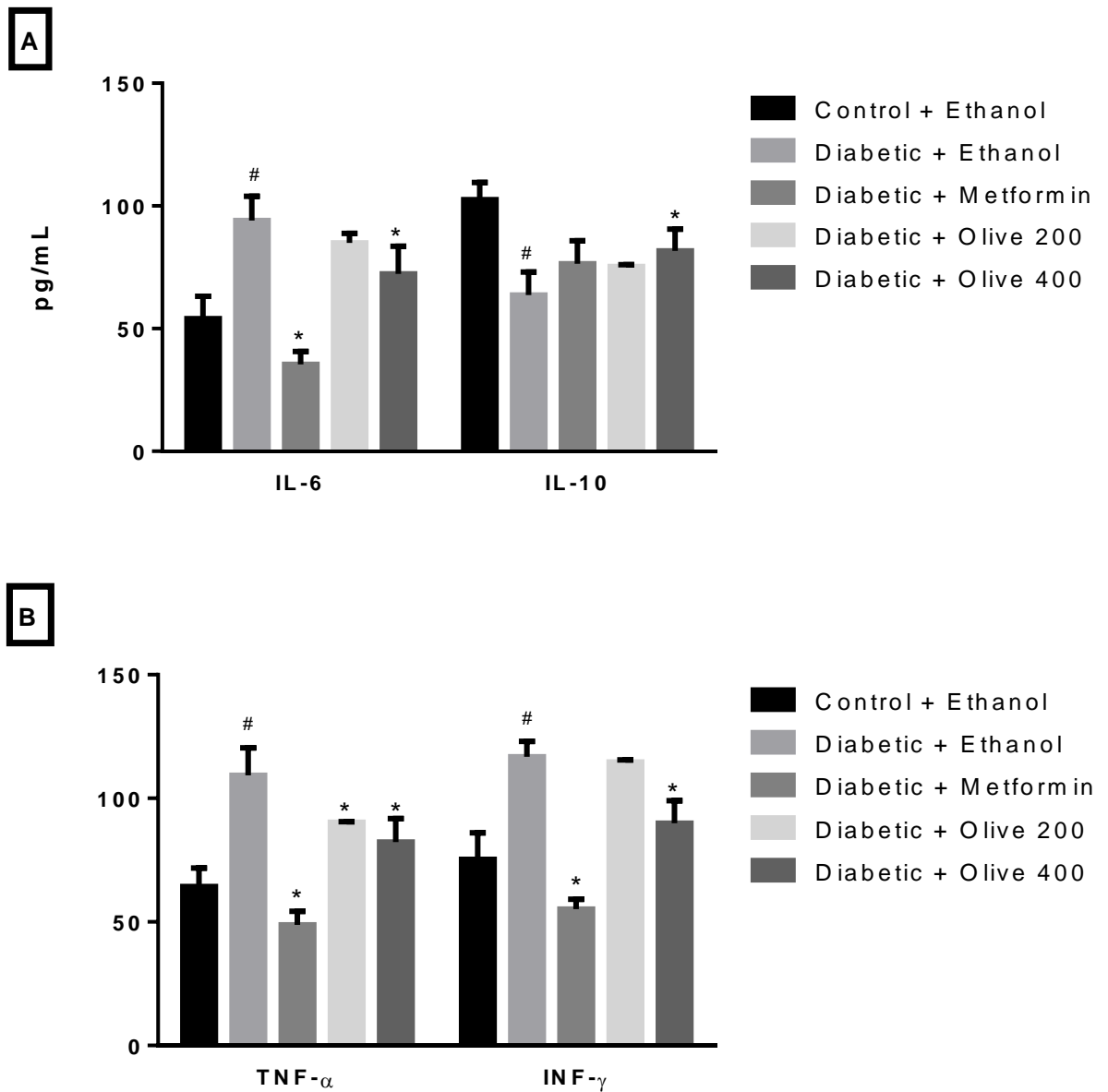


Figure 4. Effect of TOL on inflammatory biomarkers levels in rats. (A) IL-6 and IL-10, (B) TNF- α (expressed in pg/mL) and INF- γ (expressed in μ g/mL). Columns represent the mean \pm SD (n=5). [#]Significantly different from control group: $p < 0.0001$. ^{*}Significantly different from diabetic group: $p < 0.0001$.

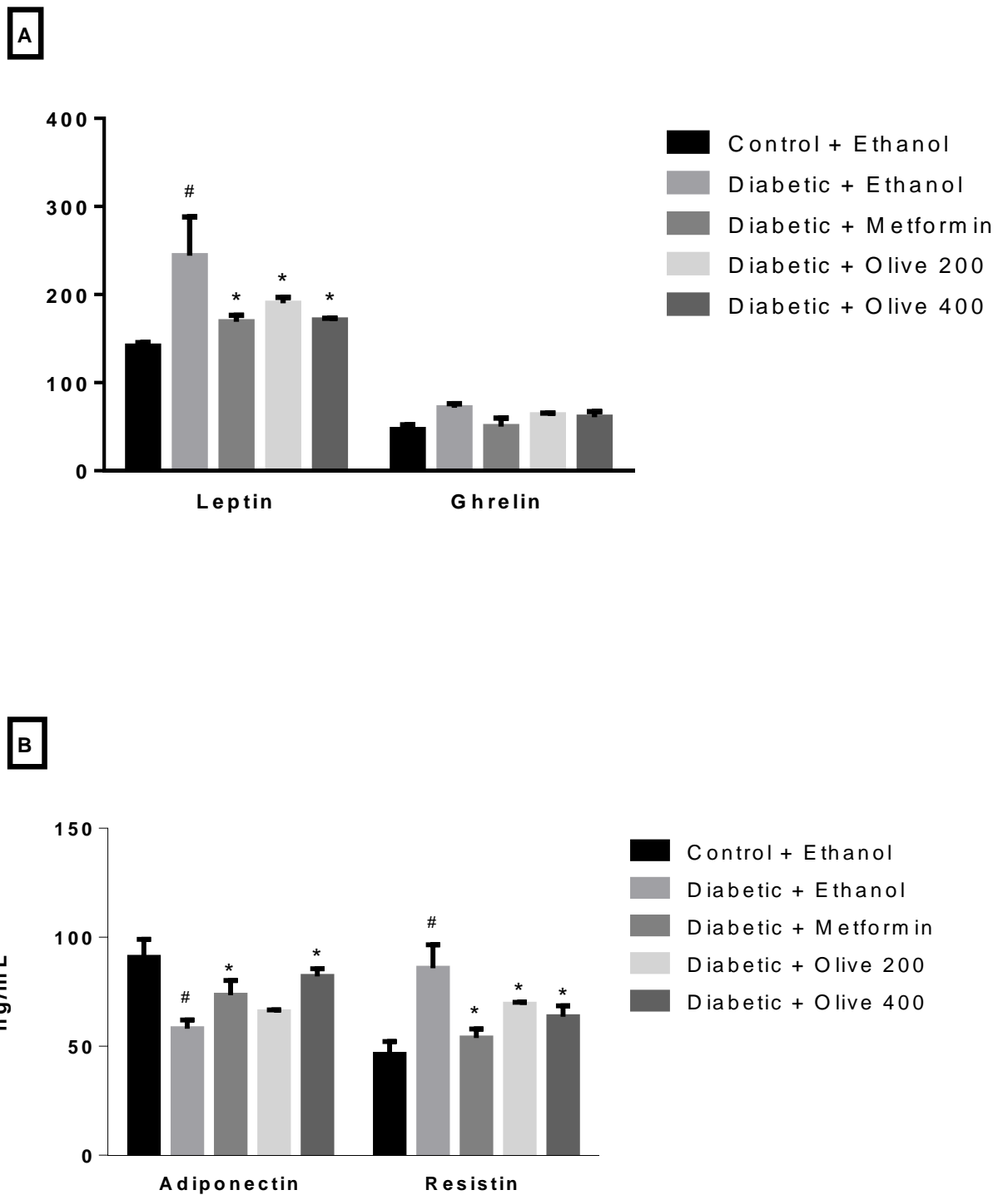


Figure 5. Effect of TOL on adipokines levels in rats. (A) Leptin (expressed in ng/mL) and ghrelin (expressed in pg/mL), (B) Adiponectin and resistin. Columns represent the mean \pm SD (n=5). #Significantly different from control group: $p < 0.0001$. *Significantly different from diabetic group: $p < 0.0001$.

3 DISCUSSÃO

As plantas medicinais são importantes no tratamento e prevenção de doenças, porém muitas vezes o uso pela população é feito sem conhecimento farmacológico com a crença de que, por ser um produto natural, não irá trazer malefícios à saúde. Estudos toxicológicos são importantes para validar a segurança e eficácia de determinada substância. Neste trabalho, avaliamos as toxicidades aguda e subaguda da tintura das folhas de oliva em ratos *Wistar*, através dos protocolos da OECD 407 e 423, respectivamente. Como citado anteriormente, o estudo agudo avalia a toxicidade de uma substância em uma única dose administrada no período de 24 horas, enquanto que no subagudo são utilizadas pelos menos três doses por um período prolongado. A dose de TOL escolhida para o tratamento agudo foi de 2000 mg/kg e a observação dos animais durou 14 dias e incluiu mortalidade, mudanças comportamentais e fisiológicas. As análises bioquímicas e hematológicas realizadas não apresentaram relevância clínica e nenhuma mortalidade ou anormalidades foram registradas. Assim, a toxicidade oral da TOL pode ser classificada na categoria 5, onde a toxicidade aguda letal é maior que 2000 mg/kg (OECD, 2008). O tratamento subagudo teve uma duração de 28 dias, onde a TOL foi administrada diariamente em três diferentes doses (100, 200 e 400 mg/kg) em ratos *Wistar* machos e fêmeas. Nenhuma alteração significativa foi encontrada nos parâmetros hematológicos avaliados, assim como no peso corporal. Não foi observada alteração comportamental e nenhuma mortalidade foi registrada. Redução nos níveis de glicose foi observada em machos e fêmeas tratados com TOL, e a AST apresentou-se reduzida nos machos tratados em relação ao grupo controle. Os níveis de ureia aumentaram nos machos tratados com TOL na dose de 400 mg/kg em relação ao grupo controle, mostrando uma possível lesão renal. Esses resultados sugerem que a toxicidade da TOL pode ser considerada baixa, porém mais estudos são necessários para validar sua segurança e eficácia.

O uso de plantas para o tratamento de doenças, como no diabetes mellitus, é muito observado na população. O diabetes mellitus afeta milhões de pessoas no mundo todo, representando cerca de 9% de casos de mortalidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A longo-prazo pode trazer sérias complicações aos pacientes como neuropatia, nefropatia e doenças vasculares.

O estado de pré-diabetes é caracterizado pela presença de hiperinsulinemia, resistência à insulina, dislipidemia, tecido adiposo inflamado e disfuncional e falência das células- β (SKOVSE, 2014). Além disso, na condição de DMT2 pode ocorrer um desequilíbrio entre a produção excessiva de radicais livres e redução das defesas antioxidantes, ocasionando o estresse oxidativo, que pode causar danos às células e tecidos (SUSZTAK *et al.*, 2006). O modelo de indução de DMT2 em animais experimentais através de dieta hipercalórica associada a uma baixa dose de STZ tem-se tornado importante no estudo da doença, visto que é capaz de refletir os sintomas observados em pacientes diagnosticados. Os animais utilizados neste modelo apresentam hiperglicemia, resistência à insulina, insuficiência moderada da secreção de insulina e anormalidades no metabolismo de lipídios, que são as características do estado tardio do DMT2 (SRINIVASAN *et al.*, 2005). Através dos resultados obtidos, é importante utilizar este modelo para avaliar inúmeras substâncias, como fitoterápicos e plantas medicinais.

O estudo sobre plantas medicinais é importante para determinar sua segurança e eficácia, visto que possuem constituintes bioativos com potencial alvo terapêutico. A oliveira, botanicamente conhecida como *Olea europaea* L., possui importantes atividades farmacológicas como antioxidante, anti-hipertensiva, anti-aterogênica e anti-inflamatória devido aos constituintes fenólicos encontrados em seu fruto, óleo e folhas (EL & KARAKAYA, 2009). Os compostos bioativos oleuropeína, verbascosídeo, rutina, tirosol e hidroxitirosol estão associados às atividades antimicrobiana e antiproliferativa da oliveira (RAHMANIAN *et al.*, 2015). A tintura das folhas de oliveira foi utilizada no tratamento dos animais experimentais deste trabalho, em doses de 200 mg/kg e 400mg/kg. A metformina é um agente anti-hiperglicêmico que melhora a tolerância à glicose em pacientes com DMT2. Tem sido recomendado como agente de primeira linha, por ser de baixo custo, eficaz e seguro (ADA, 2015). Nesse estudo, metformina foi usada como controle positivo (250 mg/kg).

Os animais que receberam dieta hipercalórica associada a baixa dose de STZ apresentaram hiperglicemia, níveis elevados de Hb1Ac e reduzidos de insulina, além de alterações nos níveis dos marcadores inflamatórios (IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ) e das adipocinas (leptina, adiponectina e resistina). O

mecanismo para as folhas de oliva e a oleuropeína agirem no DM pode ser explicado pelo aumento da utilização da glicose periférica e por melhorarem a secreção de insulina estimulada pela glicose (SATO *et al.*, 2007). O tratamento com a metformina e TOL reduziu significativamente os níveis de glicose nos animais diabéticos quando comparados ao grupo controle. A Hb1Ac é importante, pois mede a glicemia dos últimos 2-3 meses e seu nível desejável para indivíduos saudáveis é de que não exceda 7% (ADA, 2014). Embora nossos resultados não tenham sido significativamente diferentes, é possível observar que os animais diabéticos dos diferentes grupos apresentaram níveis acima de 7% em relação ao grupo controle. A atividade antioxidante da oliva também pode ter atividade no tratamento do DM. Em estudos realizados por Al-Azzawie & Alhamdani (2006) foi observado um decréscimo nos níveis de MDA e aumento das enzimas antioxidantes CAT e SOD em animais tratados com oleuropeína. Nossos resultados não mostraram alterações significativas nesses marcadores. Por também possuir um caráter inflamatório, foram analisados alguns marcadores que apresentam alterações no DM. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória e mostrou-se aumentada nos animais diabéticos quando comparada ao grupo controle, efeito contrário foi observado nos níveis da IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória. Alterações nos níveis de TNF- α e IFN- γ também foram observadas. O tratamento com metformina e TOL sob os marcadores inflamatórios foi capaz de melhorar seus níveis. Em estudo realizado por (LIU *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2013) em camundongos diabéticos induzidos por STZ, foi determinado que o extrato rico em oleuropeína reduziu a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-6, enquanto aumentou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. As adipocinas, produzidas pelos adipócitos, possuem um papel regulatório no desenvolvimento da resistência à insulina (MUOIO & NEWGARD, 2008). Alterações em seus níveis podem ter importante papel do desenvolvimento do DM (GUIMARÃES *et al.*, 2007). A leptina, grelina, adiponectina e resistina foram as adipocinas de escolha para estudo. Com exceção da grelina, os ratos diabéticos apresentaram mudanças significativas em seus níveis quando comparados ao grupo controle e foi observado um restabelecimento nos animais tratados com metformina e TOL.

4 CONCLUSÃO

- Os doseamentos de polifenóis totais e flavonoides da TOL apresentaram resultados relevantes quando comparados ao padrão. Quanto à capacidade antioxidante, realizada através do método de captura de radicais livres (DPPH), a TOL apresentou resultado satisfatório, porém inferior quando comparado ao padrão ácido ascórbico.
- Os animais tratados com a TOL, em dose única ou repetidas, não apresentaram anormalidades ou mudanças de comportamento quando comparados com os animais do grupo controle. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos, além de nenhuma mudança significativa no peso corporal, corroboram com os resultados, evidenciando baixa toxicidade. Assim, a toxicidade oral da TOL pode ser classificada na categoria 5, onde a toxicidade aguda letal é maior que 2000 mg/kg, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado OECD.
- O modelo de indução do DMT2 escolhido foi capaz de refletir os sintomas apresentados por pacientes diagnosticados;
- Os animais diabéticos tratados apenas com etanol apresentaram glicemia elevada em relação aos outros grupos e o tratamento com TOL foi capaz de reduzir seus níveis. O peso corporal apresentou mudança nas semanas finais do experimento, evidenciando uma perda de peso nos animais diabéticos em relação ao controle;
- A peroxidação lipídica, bem como a atividade antioxidante da TOL não apresentaram mudanças entre os diferentes grupos. O tratamento com a TOL foi capaz de melhorar os níveis dos marcadores inflamatórios e adipocinas alterados pelo DM nos animais;
- As análises bioquímicas e hematológicas apresentaram alterações em alguns parâmetros, porém não indicam relevância clínica;

PERSPECTIVAS FUTURAS

Mais estudos, através de análises histológicas e genotóxicas, por exemplo, são importantes para validar a atividade anti-diabética das folhas de oliva, bem como sua eficácia e segurança no uso em humanos.

REFERÊNCIAS

- ABDELMOATY, M.A. *et al.* Confirmatory studies on the antioxidant and antidiabetic effect of quercetin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 25, p. 188-92, 2010.
- AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- AGRA, M.F. *et al.* Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.
- AL-AZZAWIE, H. F.; ALHAMDANI, M.S.S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sciences**, v.78, p. 1371-1377, 2006.
- AMARAL, E.A.; SILVA, R.M.G. Avaliação da toxicidade aguda de angico (*Anadenanthera falcata*), pau-santo (*Kilmeyera coreacea*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e cipó-de-são-joão (*Pyrostegia venusta*), por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **Revista Eletrônica da Pesquisa**. 2007. Disponível em: <http://perquirere.unipam.edu.br/documents/23456/34929/artigo_eni.pdf>. Acesso em 3 de dezembro de 2015.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Clinical practice recommendations. **Diabetes Care**, New York, v. 31, p. S1-S96, Supplement 1, 2008.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 34, n. 1, p. S62-S69, 2011.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, p. S21-S26, Supplement 1, 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Approaches to glycemic treatment. **Diabetes Care**, v. 38, p. S41-S48, Supplement 1, 2015.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, 31 de janeiro de 2013 – Versão 2.

BALASUBASHINI, M.S. *et al.* Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 310–4, 2004.

BARATA, J. **Terapêuticas alternativas de origem botânica - efeitos adversos e interações medicamentosas**. Lisboa: Lidel edições, 2008.

BARBOSA, K.B.F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 23, n.4, p. 629-643, 2010.

BARROS, S.B.M; DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 1.5. p. 57-68.

BEHERA, B.C. *et al.* Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 776-784, 2008.

BETTI, A.H. *et al.* Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (Guttiferare) in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2349–2355, 2012.

BIANCO, A.; UCCELLA, N. Biophenolic components of olives. **Food Research International**, v. 33, p. 475–485, 2000.

BORGES, K.B.; BAUTISTA, H.B.; GUILERA, S. Diabetes - utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.5, n.2, p.12-20, 2008.

BRAHMI, F. *et al.* The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 146-152, 2012.

BRAHMI, F. *et al.* Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 256-264, 2013.

BRASIL. Ministério da saúde. Portaria nº 971 de 3 de maio de 2006. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2012. **Práticas integrativas e complementares**, 2012. Disponível em <http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/geral/miolo_CAP_31.pdf > Acesso em 10 de dezembro de 2015.

COSTA, C.R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, n.7, p. 1820-1830, 2008.

COSTA, J.G.M. *et al.* Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 710-714, 2009.

DE BOCK, M.; DERRAIK, J.G.B.; CUTFIELD, W. Polyphenols and glucose homeostasis in humans. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, p. 808-815, 2012.

DIPASQUALE, L.C.; HAYES, A.W. Acute toxicity and eye irritancy. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. 4.ed. London: Taylor & Francis, 2001. cap. 18, p. 853-916.

DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. **Revista española de Quimioterapia**, v. 16, n. 4, p. 385-393, 2003.

DORNAS, W.C. *et al.* Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19 (2A), p. 488-500, 2009.

EL, S.N.; KARAKAYA, S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. **Nutrition Reviews**, v. 67, p. 632-638, 2009.

ELEAZU, C.O. *et al.* Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, p. 60-67, 2013.

FARAG, R.S.; EL-BAROTY, G.S.; BASUNY, A.M. Safety evaluation of olive phenolic compounds as natural antioxidants. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 54, p. 159-174, 2003.

FARES, R., *et al.* The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* extract. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, p. 58-63, 2011.

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

FONSECA-ALANIZ, M.H. *et al.* O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation research**, v. 107, p. 1058-1070, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GONZÁLEZ, E. *et al.* Gimeno, Pancreatic nitric oxide and oxygen free radicals in the early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1335-1342, 2000.

GOUD, B.J.; DWARAKANATH, V.; CHIKKA SWAMY, B. K. Streptozotocin-A Diabetogenic Agent in Animal Models. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 253-269, 2015.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. S110-8, 2004.

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

GUIMARÃES, D.E.D. *et al.* Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n.5, p. 549-559, 2007.

HAN, J.M.; LEVINGS, M.K. Immune regulation in obesity associated adipose inflammation. **Journal of Immunology**, v. 191, p. 527–532, 2013.

HOLMES, A. *et al.* Rat models of diet-induced obesity and high fat/low dose streptozotocin type 2 diabetes: effect of reversal of high fat diet compared to treatment with enalapril or menhaden oil on glucose utilization and neuropathic endpoints. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, Article ID 307285, 8 pages, 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2011. IDF Bridges Report 2011.Brussels: IDF.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2012. IDF Diabetes Atlas Update. IDF, Brussels p. 2012.

JUNOD, A. *et al.* Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **Journal of Clinical Investigation**, v. 48, p. 2129, 1969.

KAEIDI, A. *et al.* Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: *In vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 188-196, 2011.

KALLUF, L.J.H. **Fitoterapia funcional**: dos princípios ativos à prescrição de fitoterápicos. 1.ed. São Paulo: VP Editora, 2008. 304p.

KASHYAP, M.K. *et al.* Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 277, p. 89-99, 2005.

KIRITSAKIS, K. *et al.* Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, p. 369-376, 2010.

KOETER, H.B. Test guideline development and animal welfare: regulatory acceptance of in vitro studies. **Reproductive Toxicology**, v. 7, supl. 1, p. 117-123, 1993.

LALAS, S. *et al.* Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1521-1525, 2011.

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

LEONARDIS, A. *et al.* Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 653-659, 2008.

LI, C. *et al.* Simultaneous separation and purification of flavonoids and oleuropein from *Olea europaea* L. (olive) leaves using macroporous resin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, n.15, p. 2826-2834, 2011.

LIU, Y.-N. *et al.* Olive leaf extract suppresses mRNA expression of pro-inflammatory cytokines and enhances IRS-1 expression in the rats with streptozotocin and high-fat diet induced diabetes. **Nutrition Research**, v. 34, p. 450–457, doi:10.1016/j.nutres.2014.04.007, 2014.

LIU, Z. *et al.* Antidiabetic effects of malonyl ginsenosides from *Panax ginseng* on type 2 diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 233-240, 2013.

MALECKI, M.T. Type 2 diabetes mellitus and its complications: from the molecular biology to the clinical practice. **Review of Diabetic Studies**, v. 1, n. 1, p. 5-8, 2004.

MARLES, R.J.; FARNSWORTH, N.R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine**, v. 8, p. 137-89, 1995.

MARTINELLO, F. *et al.* Hypolipidemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 810-8, 2006.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicology Letters**, v. 140-141, p. 21-30, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Diabetes mellitus**. Cadernos de Atenção Básica - n.16. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Editora MS, 2006.

MU, J. *et al.* Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 55, p. 1695–704, 2006.

MUOIO, D.M.; NEWGARD, C.B. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 193–205, 2008.

NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2560-2564, 1998.

OECD. **Guidelines for testing of chemical**. Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD (Ed.): Paris, 2008.

OGA, S. (Ed.) - Fundamentos de Toxicologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu. 2008.

PARK, J.-H. *et al.* Olive leaf down-regulates the oxidative stress and immune dysregulation in streptozotocin-induced diabetic mice. **Nutrition Research**, v. 33, p. 942–951, 2013.

PATEL, D. *et al.* Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. 239-250, 2012.

PATIL, M.A. *et al.* Evaluation of neonatal streptozotocin induced diabetic rat model for the development of cataract. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, Article ID 463264, 10 pages, 2014.

PERRY, R.J. *et al.* The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 510, p. 84–91, 2014.

PIMENTEL, L.C.F. *et al.* O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. **Química Nova**, v.29, n.5, p.1138-1149, 2006.

PORTHA, B. *et al.* The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. **Diabete & Metabolisme**, v. 15, p. 61-75, 1988.

PRADO, W.L. *et al.* Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378-383, 2009.

PREMKUMAR, K.; BOWLUS, C.L. Ascorbic Acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 542, p. 99-103, 2003.

RAHMANIAN N., JAFARI, S.M., WANI, T.A. Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. **Trends in Food Science & Technology**, v. 42, p. 150-172, 2015.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-13, 2001.

REUSSER, F. Mode of action of streptozotocin. **Journal of bacteriology**, v. 105, p. 580-588, 1971.

RHIOUANI, H. *et al.* Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 378–386, 2008.

ROHENKOHL, C.C.; CARNIEL, A.P.; COLPO, E. Antioxidants consumption during chemotherapy treatment. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, n. 2, p. 107-112, 2011.

ROMERO, C.E.M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 85-91, 2006.

ROSA, R.L.; BARCELOS, A.L.V.; BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste -SC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 306-310, 2012.

RUGINI, E. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In: JAIN, S.M.; GUPTA, K.; NEWTON, J. (Ed.). Somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht: Kluwer, p.171-189, 1995.

RUGINI, E.; GUTIÉRREZ-PESCE, P. Genetic improvement of olive. **Pomologia Croatica**, v. 12, p. 43-74, 2006.

RYAN, D. *et al.* Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. **Scientia Horticulturae**, v. 92, p. 147-176, 2002.

SAMUELSSON, G. The blood pressure lowering factor in leaves of *Olea europaea*. **Farmaceutisk Revy**, v. 15, p. 229–239, 1951.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, p.403-434, 2010.

SATO, H. *et al.* Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, p. 793–798, 2007.

SINITOX, Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por Agente e por Região. Brasil, 2010. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b3.pdf>. Acesso em 24 de novembro de 2015.

SKOVSDØ, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 5, n. 4, p. 349-358, 2014.

SKYLER, J.S. Diabetes mellitus: pathogenesis and treatment strategies. **Journal of Medicine Chemistry**, v. 47, p. 4113-4177, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes SBD 2007. Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus.** Disponível em: <http://www.cff.org.br/userfiles/file/noticias/Diretrizes_SBD_2007%5B1%5D.pdf> Acesso em 18 de dezembro de 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013-2014.** Disponível em: <<http://www.nutritotal.com.br/diretrizes/files/342--diretrizessbd.pdf>> Acesso em 18 de dezembro de 2015.

SOUSA; C.M.M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. **ILAR Journal**, v. 43, supl., p. S11- S17, 2002.

SRINIVASAN, K. *et al.* Reversal of glucose intolerance by pioglitazone in high-fat diet fed rats. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 26, p. 327–33, 2004.

SRINIVASAN, K. *et al.* Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 4, p. 313–320, 2005.

STOKES, W.S. Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. **ILAR Journal**, v. 43, p. S31-S38, 2002.

SUSZTAK, K. *et al.* Glucose-induce dreactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 55, p. 225–233, 2006.

SZKUDELSKI, T. Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, p. 481-490, 2012.

TASIOULA-MARGARI, M.; OLOGERI, O. Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC/MS. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 530–534, 2001.

TAYLOR, R. Insulin resistance and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 61, p. 778–779, 2012.

TIWARI, A.K.; RAO, M.J. Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: present status and future prospects. **Current Science**, v. 83, p. 30–8, 2002.

TOKARNIA, C.H. Estudos complementares sobre a toxidez de *Lantana camara* (Verbenaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3/4, p. 128-132, 1999.

TUCK, K.L.; HAYBALL. P.J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 636-644, 2002.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 189-306, 2006.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERDI, L.G. *et al.* The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Development Trends**, v. 3, p. 232-238, 1998.

WHITE, W.J. The use of laboratory animals in toxicologic research. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. 4.ed. London: Taylor & Francis, 2001. cap. 16, p. 773-818.

WILD, S. *et al.* Global prevalences of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, 1047-1053, 2004.

WILLS, R.B.H.; BONE, K.; MORGAN, M. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 47-77, 2000.

WU, J.; YAN, L.J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 8, p. 181-188, 2015.

WU, M.S. *et al.* Aminoguanidine prevents the impairment of cardiac pumping mechanics in rats with streptozotocin and nicotinamide-induced type 2 diabetes. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, p. 758-764, 2008.

YIN, D. *et al.* Recovery of Islet β -Cell Function in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice an Indirect Role for the Spleen. **Diabetes**, v. 55, p. 3256-3263, 2006.

ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFSM



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Avaliação da toxicidade aguda e Subaguda de Oliva (*Olea europaea*) e seu Efeito no Perfil Glicêmico em Ratos Diabéticos Induzidos por Dieta Hiperlipídica e Estreptozotocina."

Número do Parecer: 121/2014

Pesquisador Responsável: Prof.^a Dr.^a Liliane de Freitas Bauermann

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DE APROVAÇÃO: 09/10/2014.

Santa Maria, 13 de outubro de 2014.

Prof.^a Dr.^a Vania Lucia Loro

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM

ANEXO B - LAUDO DE ANÁLISE DA TINTURA DAS FOLHAS DE OLIVEIRA

Vigilância Sanitária CEVS 353870901-519-000001-1-6 M.S. 1.05.983-7	CONTROLE DE QUALIDADE Laudo de Análise		Farmacêutica Responsável: <i>Paula M. Pizzatti</i> Dra. Paula Mariana Pizzatti CRF-SP 360-14
 EMPRESA BRASILEIRA DE RADIAÇÕES LTDA	 GRUPO FLORES E ERVAS	Flores e Ervas Com. Farm. Ltda - EPP Estrada Vicente Bellini, 175 - Piracicaba - SP CNPJ: 00.802.210/0001-50 E-mail: floreservas@floreservas.com.br Website: www.floreservas.com.br Fone: (19) 3428-1199	

INFORMAÇÕES GERAIS

Nosso Lote	032725	Parte utilizada	Folhas	Validade/ fornecedor:	10/2015
Nomenclatura	FOLHA DE OLIVEIRA TM	Esterilização	Não houve	Validade/ nosso lote:	10/2015
Nome científico	Olea euroaea	Manufatura	10/2010	Método de secagem:	-----
Origem	Nacional	Lote de origem	fofm001		

ASPECTOS MACRO E MICROSCÓPICOS

Líquido de aspecto homogêneo

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Cor: Castanho	Odor: Característico	Sabor: Característico
---------------	----------------------	-----------------------

CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS

Aspecto	Especificação	Resultado	Especificação	Resultado
Elementos estranhos:	Líquido límpido	Ausente	pH	4,92
Umidade:	NA	NA	Solubilidade	Solúvel em água
Cinzas totais:	NA	NA	Densidade	0,927g/mL
Cinzas insolúveis:	NA	NA	Líquido extrator	lução Hidroalcoólica
Metais pesados:			Teor alcoólico	51°GL
			Resíduo seco	1,94%

TESTES DE IDENTIFICAÇÃO

Positivo para Taninos	1
-----------------------	---

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Análise	Especificação	Resultado
Contagem padrão em placas:	Máx. 10.000 ufc/g	De acordo
Bolores e leveduras:	Máx. 100 ufc/g ou ml	De acordo
Contagem de enterobactérias:	Máx. 100 ufc/g ou ml	De acordo
<i>Escherichia coli</i> (coliformes):	Ausência	De acordo
<i>Staphylococcus aureus</i> :	Ausência	De acordo
<i>Pseudomonas aeruginosas</i> :	Ausência	De acordo
<i>Salmonella sp</i> :	Ausência	De acordo

TEOR DE PRINCÍPIO ATIVO

Especificação	Resultado	Método utilizado
		1-Identificação por colorimetria 2-Espectrometria na região ultravioleta-visível 3-Cromatografia por camada delgada 4-Outros

CONCLUSÃO DA ANÁLISE

APROVADO

DATA DA ANÁLISE

28/10/2010

DATA DA IMPRESSÃO

12/11/2014

OBS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- * AS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS PRESENTES NESTE LAUDO ATENDEM AOS LIMITES ESTABELECIDOS PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE E SUA VALIDADE SERÁ DESCONSIDERADA CASO O PRODUTO SEJA MANIPULADO OU ARMAZENADO EM LOCAIS INADEQUADOS.
- * 'NA' CORRESPONDE A TESTE NÃO APLICÁVEL.
- * A ALTERAÇÃO DE COR PODERÁ OCORRER, POR SE TRATAR DE PRODUTO NATURAL.

**ANEXO C – COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO À REVISTA
FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY**

Elsevier Editorial System(tm) for Food and
Chemical Toxicology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: ACUTE AND SUB-ACUTE (28 DAYS) ORAL TOXICITIES OF THE TINCTURE OF
Olea europaea L. LEAVES IN WISTAR RATS

Article Type: Full Length Article

Keywords: Olive. Toxicity. Leaves. Acute. Subacute.

Corresponding Author: Miss. Camille Guex,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Maria

First Author: Camille Guex

Order of Authors: Camille Guex; Fernanda Z Reginato; Andreia Regina H da
Silva; Kássia C Figueredo; Robson B de Freitas; Roberta S Jesus; Cibele L
Lhamas; Gilberti Helena H Lopes; Liliane F Bauermann

Abstract: *Olea europaea* L., popularly known as olive, is a plant widely used worldwide. Its leaves, fruit and oil are extensively consumed and possess important pharmacological properties. However, studies about its toxicity are still limited in the literature. Therefore, the aim of the study was to investigate the acute and subacute (28 days) oral toxicities of the tincture of *O. europaea* L. leaves (TOL) in Wistar rats through biochemical and hematological parameters. In acute study, a single dose of 2000 mg/kg of TOL was administered by oral gavage in male and female rats. In subacute study, TOL was administered during 28 days at different doses to male and female rats. Body weight of the animals was recorded during treatment period. At the end of the experiments, blood was collected for hematological and biochemical parameters. Single dose of 2000 mg/kg did not induce mortality or any signs of toxicity in animals treated. Animals exposed to TOL during 28 days did not present sign of abnormalities. Results demonstrate that tincture of *O. europaea* L. leaves did not induce toxicity after exposition to a single or repeated doses. However, more studies are needed to have complete information about its safety for use in humans.