



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BÁRBARA VERÔNICA CARDOSO DE SOUZA

Efeitos hipoglicemiantes de extratos microencapsulados das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*: caracterização química, capacidade antioxidante e toxicogenética

Teresina

2019

BÁRBARA VERÔNICA CARDOSO DE SOUZA

Efeitos hipoglicemiantes dos extratos microencapsulados das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*: caracterização química, capacidade antioxidante e toxicogenética

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial

Orientador: Dr. Lívio César Cunha Nunes

Co-orientador: Dr^a. Maria do Carmo de Carvalho e Martins

Teresina

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

- S729e Souza, Bárbara Verônica Cardoso de.
Efeitos hipoglicemiantes dos extratos microencapsulados das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* : caracterização química, capacidade antioxidante e toxicogenética / Bárbara Verônica Cardoso de Souza. – 2019. 207 f.
- Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia, Teresina, 2019.
“Orientador: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes”.
“Co-orientador: Prof. Dr.ª Maria do Carmo de Carvalho e Martins”.
1. *Bauhinia forficata* Link. 2. *Spray Drying*. 3. Compostos Bioativos. 4. Bioacessibilidade. 5. Diabetes Mellitus. I. Título.




CDD 615.321

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: BÁRBARA VERÔNICA CARDOSO DE SOUZA

TÍTULO DO PROJETO: “Efeitos hipoglicêmiantes de extratos microencapsulados das folhas de Bauhinia forficata Link subsp. forficata: caracterização química, capacidade antioxidante e toxicogenética.”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes - UFPI (Presidente)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Profª. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Prof. Dr. Rômulo José Vieira - UESPI (Examinador)	<u>SATISFATÓRIO</u>	
Prof. Dr. Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 28 de fevereiro de 2019.

HORÁRIO: 9h30

LOCAL: Auditório do Departamento de Enfermagem-CCS/UFPI

Dedico este trabalho às pessoas mais especiais da minha vida: aos meus pais Rosa e Félix (in memorian), às minhas irmãs Mônica e Juliana, a meu esposo Paulo Henrique, aos meus filhos Pedro Henrique (in memorian), Henrique José e Clarisse Maria e à minha segunda mãe Antônia.

Amo vocês!!!!

AGRADECIMENTOS

À **Santíssima Trindade, Pai, Filho** e ao **Espírito Santo** que em seu infinito amor, em vários momentos da minha vida manifestou sua providência, bondade, fidelidade, misericórdia e cuidado, sem a qual eu jamais teria conseguido tamanha graça e realização desse sonho da minha vida profissional e outros da minha vida pessoal. Deixo aqui registrado o grande milagre realizado no meu doutorado que foi a “aparição” das folhas de *Bauhinia forficata*, no bairro onde resido, depois de uma oração que eu fiz, pedindo isso a Deus, diante do insucesso em encontrá-la, lembrei que tantas vezes já li que Deus criou o céu, a terra, o mar e tudo o que nela existe, então pedi a Ele que providenciasse essa planta para dar continuidade ao doutorado. E assim, mais um milagre aconteceu na minha vida.

Aos meus amigos e intercessores no céu, em especial, minha mãezinha **Nossa Senhora**, que sempre me acompanha e cuida de mim, **Santa Edith Stein**, vale ressaltar aqui sua competência profissional, sendo uma grande pesquisadora de sua época e professora universitária, publicou muitos artigos científicos em revistas de alto impacto de sua área acadêmica.

Ao meu amado e querido pai **Félix Cardoso** (*in memoriam*), pelo seu exemplo, dedicação, cuidado em nunca deixar que faltasse nada para nossa família e pela sua determinação nos estudos, que nunca desistiu de ter um curso superior, tentando a aprovação no vestibular por vários anos seguidos, conseguindo êxito no mesmo ano que eu passei para mostrar para mim e para minhas irmãs, a importância dos estudos e não desistiu de se formar e mesmo no auge de sua doença, ele conseguiu, com muita dificuldade o seu tão sonhado diploma em um curso superior.

À minha mãe, **Rosa Amélia**, mulher guerreira, batalhadora, que admiro muito por sempre trabalhar muito para sustentar suas filhas, sempre nos incentivando para estudar e que nessa etapa da minha vida exerceu um papel essencial, cuidando do meu filho Henrique para que eu pudesse concluir o doutorado, não medindo esforços para isso. Mãe, não tenho nem palavras para lhe agradecer por ter se ofertado sempre, toda sua vida, desde a juventude, por mim e pelas minhas irmãs...

Ao meu esposo, **Paulo Henrique** pelo seu amor e carinho, compreensão e paciência, principalmente nos momentos em que eu me encontrava estressada e angustiada. Por sempre me motivar, quando eu pensava em desistir, achando que não conseguiria e você vinha com suas palavras, cheia de sabedoria, dizer que sim, era possível!!! Sua experiência com os

estudos também me auxiliou a concentrar-me para escrever essa tese. Muito obrigada por tantas vezes me ajudar ou simplesmente me escutar, estando comigo desde o início da minha vida de pós-graduanda, seu amor por mim foi provado e comprovado... Tenho certeza que sem você ao meu lado não teria mais esse título acadêmico, o qual é tão importante pra mim...

À minhas irmãs, amigas e companheiras, **Mônica** e **Juliana**, que me ajudaram com orações, palavras que me fortaleceram diversas vezes e até mesmo na formatação da tese, como também em outros detalhes essenciais para o final de mais essa jornada.

À minha segunda mãe aqui na terra, dona **Antônia**, pela sua disponibilidade, cuidado, por tantas vezes vir me ajudar nas tarefas domésticas, cuidou muito bem de mim quando perdi meu primeiro filho, depois quando estive doente e do Henrique José, quando foi preciso. Muito obrigada por contribuir da sua forma e que foi tão importante para a realização desse sonho.

Aos meus filhos **Pedro Henrique** (*in memorian*), **Henrique José** e **Clarisse Maria**, hoje minhas maiores motivações para concluir o doutorado e poder ficar mais tempo curtindo cada um deles, seus sorrisos, suas alegrias, suas brincadeiras... Nunca irei esquecer que sempre que eu chegava cansada, olhava para o Henrique vindo ao meu encontro, com um sorriso lindo no rosto e minhas forças eram renovadas.

Aos meus queridos irmãos em Cristo da **Comunidade Católica Shalom**, de forma particular pela intercessão mais intensa, minhas formadoras pessoais e comunitárias durante esse período de doutoramento, **Josefa Cristina**, **Maria de Fátima**, **Conceição**, **Mirian** e **Daniele Osório**, dos meus irmãos da **Célula Nossa Senhora de Fátima** e da **Célula Santa Giana**.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes**, manifestação da Providência de Deus, para que eu fizesse meu doutorado em Teresina e assim pude estar com meu pai nos seus últimos dias de vida, formei minha família e encontrei minha vocação maior, ser Shalom! Muito obrigada professor, pelos conhecimentos transmitidos, por ter me acolhido, por ter acreditado em mim, pelo incentivo, paciência, compreensão e amizade nessa etapa da minha vida acadêmica.

Ao Laboratório de Inovação, Empreendedorismo Medicamentos e Correlatos (LITE), em especial **Oskar de Almeida**, que esteve comigo, me auxiliando na microencapsulação das amostras no *Spray Dryer*, pelas diversas dúvidas sanadas ao longo desse trabalho, pela sua disponibilidade, prontidão e amizade. À **Luanne de Moraes** e **Graziely**, que tornaram este tempo mais leve com as partilhas de vida e também das discussões científicas. Agradeço também à **Cristina**, que com sua disponibilidade, paciência e conhecimento, foi essencial nas

“complicadas” análises do HPLC. Agradeço também ao **Lucas** e **Mirian**, pelo auxílio na caracterização fitoquímica e secagem dos extratos, ao **Ricardo**, pelas análises no texturômetro, ao **Rusbene**, que mesmo em meio a tantas ocupações, conseguia sempre sanar minhas dúvidas em várias etapas desse trabalho, como também na organização de alguns resultados. Muito obrigada a todos!!!!.

À **Profª Drª Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo**, minha eterna gratidão!!! Muito obrigada por sempre me acolher, repassar seus conhecimentos riquíssimos na área da Nutrição, a qual você foi a responsável por eu ter me encantado e hoje amo estudá-la!!! Agradeço por ter me indicado ao Prof. Lívio e também por ser um instrumento da providência de Deus na minha vida acadêmica... Suas orientações foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço ao LASA e ao LABROM, laboratórios coordenados pela **Profª Regilda**, de forma especial à **Fabrcia Beserra**, que foi essencial para o desenvolvimento das formulações, à **Rayssa Porto** e pelas análises laboratoriais e amizade sincera.

À **Lindalva**, que foi um grande auxílio nos momentos em que eu precisava me dividir entre ser docente e doutoranda. Muito obrigada pelo seu companheirismo e por ter dividido comigo um dos momentos mais desafiantes dessa jornada...

Ao Laboratório de Análises de Alimentos do IFPI da zona sul, por disponibilizar a infraestrutura para análises físico-químicas, bioativos, bioacessibilidade, na pessoa da **Profª Drª Mariana de Moraes. Mari**, não tenho palavras para agradecê-la pela sua preciosa contribuição na execução e elaboração desse trabalho... Quanta sabedoria, dedicação e zelo... Muitíssimo obrigada por toda disponibilidade e paciência durante as atividades laboratoriais, por compartilhar seus conhecimentos.... Agradeço também ao técnico **André**, dessa mesma instituição pelas análises morfológicas.

Ao Laboratório de Zootecnia da UFPI, em especial **Yuri** e aos técnicos **Manoel** e **Lindomar** por sempre estarem dispostos ajudar nas análises da composição centesimal.

Aos técnicos de Laboratório de Química da UFPI, **Sérgio** e **Aline**, pela disponibilidade na secagem das folhas.

Ao Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica - LAPGENIC, coordenado pela **Profª Drª Ana Amélia**, por dispor o seu laboratório e o seu preciosíssimo tempo para orientar minhas análises, por toda contribuição científica na execução e elaboração desse trabalho de tese, que, com certeza sem o seu auxílio não teria sido possível. Agradeço também à **Rosália**, **Antonielly**, **Amanda**, **Vitor** e ao **Prof. Drº João Marcelo** pelo auxílio nas análises toxicológicas.

Ao **Profº Dr Lima Neto**, muitíssimo obrigada por todo o tempo disposto para realizar as análises cromatográficas, as quais foram extremamente cansativas e demoradas.

À **Profª Drª Alessandra Braga**, por disponibilizar seu laboratório para a realização da caracterização dos extratos, além de me orientar sempre que precisei e pela sua parceria com a UNICAMP, na qual foram realizadas algumas análises de antioxidantes pela técnica **Angélica**. Agradeço também ao **Felipe**, sempre disponível para me auxiliar nas análises no LIMAV, inclusive aos finais de semana. Ao **Fernando**, pelas análises térmicas, muito obrigada pela sua contribuição.

À **Profª Drª Rita de Cássia Meneses**, do núcleo de pesquisa e plantas medicinais (NPPM), que me concedeu a oportunidade para realizar os experimentos com animais. Muitíssimo obrigada professora, sem a senhora esse trabalho não teria se concretizado. Aproveito e agradeço às minhas amigas **Josyanne Neves, Aline Nunes, Alessandra e Julianne Freire**, que Deus me presenteou nesse tempo. A convivência com cada uma foi maravilhosa, vocês não sabem o quanto foi essencial para mim os momentos que passamos juntas, as partilhas científicas e de vida também... Nossa... valeu a pena mesmo conhecer vocês. Fizeram a diferença no meu doutorado... **Julianne**, não poderia deixar de agradecer de forma particular... Você foi e é um anjo na minha vida... Uma pessoa muito sábia e sempre disponível a ajudar... Como foram importantes as suas opiniões, sugestões, questionamentos, críticas e correções... Nossa!!!! Te agradeço eternamente por tudo!!!!!!!

À **Profª Drª Maria do Carmo (Carminha)**, do departamento de Fisiologia da UFPI, por toda a orientação na indução do diabetes com animais, desde o planejamento à análise de dados... Muito obrigada por contribuir na execução e conclusão dessa tese. À **Esmeralda** e ao **Cleiton** pelo relevante auxílio no manejo com os animais... Vocês se garantem demais!!!!!!

À minha amiga **Ivone Freires** no auxílio da formatação das normas da ABTN, correções, suas palavras que tanto me ajudaram a acreditar que eu conseguiria... Muito obrigada pela sua amizade sincera....

Ao setor de Histologia e Embriologia da UFPI, na pessoa da **pós - doutora Tarsia Giabardo**, pelas análises histopatológicas.

À **Universidade Federal do Piauí**, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. **Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes**, pelo apoio ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal da Universidade Federal do Piauí e pela minha liberação integral das atividades docentes para a conclusão do doutorado.

A todos os professores e alunos do **Curso de Nutrição-CSHNB**, que no início do doutorado, contribuíram de alguma forma para que eu pudesse estar presente em Teresina,

assistindo às aulas.

Aos professores do **Departamento de Nutrição-CMPP**, que nessa etapa final, foi favorável à minha liberação integral para concluir o doutorado.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia- RENORBIO, do ponto focal da Universidade Federal do Piauí, na pessoa da **Prof^ª Dra Carla Eiras**, pelo compromisso e competência na gestão desse Programa.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO**, do ponto focal da Universidade Federal do Piauí, obrigada pela dedicação. E agradeço também, aos membros da **Banca de Qualificação da Tese e de Defesa** pela disposição em colaborar com o aperfeiçoamento dessa tese de doutorado, através de importantes críticas e sugestões.

Enfim, a todos àqueles que direta ou indiretamente, se fizeram presentes, torceram pelo meu sucesso e contribuíram para que esta pesquisa se concretizasse. OBRIGADA!!!!!!!!!!

"Por que o Senhor é quem dá a sabedoria, e de sua boca é que procedem a ciência e a prudência."

(Provérbios 2, 6)

RESUMO

SOUZA, B. V. C. **Efeitos hipoglicemiantes de extratos microencapsulados das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*: caracterização química, capacidade antioxidante e toxicogenética.** 2019. 207p. Tese (Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2019.

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) caracteriza-se por uma hiperglicemia, devido a uma deficiência de insulina causada por disfunção das células β pancreáticas, que pode ser ocasionada pelo estresse oxidativo, com prevalência e morbimortalidade elevadas. Assim, a *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* é uma espécie vegetal com atividade antioxidante significativa e que pode ser utilizada no tratamento dessa patologia e prevenção de suas complicações. Diante disso, esse estudo objetivou obter e caracterizar extratos microencapsulados, investigar a bioacessibilidade dos compostos bioativos, atividade antioxidante, efeitos hipoglicemiantes em modelo animal para diabetes induzidos por estreptozotocina e sua toxicogenética para a aplicação em formulações farmacêuticas para o tratamento do diabetes. Inicialmente, fez-se uma revisão de patentes sobre o tema, pesquisando os termos “*Bauhinia forficata*” e “diabetes mellitus”. Posteriormente, empregou-se a técnica *spray drying* para obter os extratos secos microencapsulados, que foram caracterizados quanto ao teor de umidade, atividade de água, densidade, granulometria, reologia, morfologia, análises térmicas, difração de raio-X, espectrometria de infravermelho, análise de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas. A bioacessibilidade dos polifenóis foi avaliada em cada etapa do processo digestivo *in vitro* e seus efeitos na resposta ao estresse oxidativo foram verificados pelos ensaios do poder de redução do íon ferro e pela capacidade de absorção de radicais de oxigênio. Avaliou-se também os efeitos hipoglicemiantes e toxicogênicos desses extratos microencapsulados em camundongos da linhagem *Swiss*. Induziu-se o DM2 nestes animais, com estreptozotocina e administrou-se os extratos, por 28 dias, sendo verificada a glicemia semanalmente e depois analisou-se os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos. Na revisão de patentes, encontrou-se apenas sete patentes com a utilização da *B. forficata* no tratamento diabetes, sendo importante para subsidiar o desenvolvimento desta tese. Os extratos microencapsulados das folhas de *B. forficata* Link apresentaram baixos valores de umidade e atividade de água, tamanho das partículas adequados para a incorporação em comprimidos e cápsulas, com características amorfas. A espectroscopia no infravermelho e a cromatografia de alta eficiência confirmaram a presença de compostos fenólicos. Os polifenóis e os flavonoides bioacessíveis apresentaram atividade antioxidante, após cada etapa da digestão *in vitro*, como também hipoglicemiantes, pois os resultados mostraram que a glicemia dos animais diabéticos reduziu 77,26%, 57,79% e 45,15%, após o tratamento com extrato seco infusão (200 e 600 mg/kg/dia) e extrato seco decocção (600 mg/kg/dia), respectivamente, quando comparados com o grupo diabético tratado com metformina (600 mg/kg/dia) (21,53%). Observou-se também uma melhora da resposta glicêmica e uma recuperação das células β pancreáticas. Os extratos, na dose de 2000 mg/Kg, apresentaram efeitos genotóxicos, na medula óssea e fígado. Entretanto, esses efeitos não foram observados no pâncreas e no sangue periférico os danos foram reparados após 14 dias. Assim, este estudo demonstrou que esses extratos, apresentaram atividade hipoglicemiante, com um efeito benéfico superior ao da metformina, sendo potenciais agentes terapêuticos para aplicações em formulações farmacêuticas para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata* Link. *Spray drying*. Compostos bioativos. Bioacessibilidade. Diabetes mellitus.

ABSTRACT

SOUZA, B. V. C. **Efeitos hipoglicemiantes de extratos microencapsulados das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*: caracterização química, capacidade antioxidante e toxicogenética.** 2019. 207p. Tese (Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2019.

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is characterized by hyperglycemia, due to an insulin deficiency caused by pancreatic β -cell dysfunction, which may be caused by oxidative stress, with a high prevalence and morbimortality. Thus, *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* is a plant species with significant antioxidant activity and can be used to treat this pathology and prevent its complications. The objective of this study was to obtain and characterize microencapsulated extracts, to investigate the bioaccessibility of bioactive compounds, antioxidant activity, hypoglycemic effects in animal model for diabetes induced by streptozotocin and its toxicogenética for the application in pharmaceutical formulations for the treatment of diabetes. Initially, there was a review of patents on the subject, researching the terms "*Bauhinia forficata*" and "diabetes mellitus". Afterwards, the spray drying technique was used to obtain microencapsulated dry extracts, which were characterized in terms of moisture content, water activity, density, grain size, rheology, morphology, thermal analysis, X-ray diffraction, infrared spectrometry, high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The bioaccessibility of the polyphenols was evaluated at each stage of the digestive process in vitro and their effects on the response to oxidative stress were verified by the tests of the iron ion reduction power and by the absorption capacity of oxygen radicals. The hypoglycaemic and toxicogenic effects of these microencapsulated extracts were also evaluated in mice of the Swiss lineage. DM2 was induced in these animals with streptozotocin and the extracts were administered for 28 days, and the blood glucose was checked weekly and then the biochemical, hematological and histological parameters were analyzed. In the patent review, only seven patents were found with the use of *B. forficata* in diabetes treatment, being important to subsidize the development of this thesis. The microencapsulated extracts from the leaves of *B. forficata* Link presented low values of moisture and water activity, particle size suitable for incorporation into tablets and capsules, with amorphous characteristics. Infrared spectroscopy and high-performance chromatography confirmed the presence of phenolic compounds. The bioaccessible polyphenols and flavonoids presented antioxidant activity, after each step of the in vitro digestion, as well as hypoglycemic agents, since the results showed that the glycemia of the diabetic animals decreased 77.26%, 57.79% and 45.15%, after treatment with dry extract infusion (200 and 600 mg / kg / day) and dry extract decoction (600 mg / kg / day), respectively, when compared with the diabetic group treated with metformin (600 mg / kg / day) (21.53%). There was also an improvement in the glycemic response and a recovery of pancreatic β -cells. The extracts, at doses of 2000 mg / kg, showed genotoxic effects in the bone marrow and liver. However, these effects were not observed in the pancreas and in the peripheral blood the damages were repaired after 14 days. Thus, this study demonstrated that these extracts presented hypoglycemic activity, with a beneficial effect superior to that of metformin, being potential therapeutic agents for applications in pharmaceutical formulations for the treatment of type 2 diabetes mellitus.

Keywords: *Bauhinia forficata* Link. Spray drying. Bioactive compounds. Bioaccessibility. Diabetes mellitus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1	Fluxograma da tese sobre <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	26
Figura 2	Número de pessoas com diabetes em todo o mundo em 2017 e 2045 (20 a 79 anos).	30
Figura 3	Papel da insulina no metabolismo da glicose.	35
Figura 4	Papel dos genes e do ambiente no desenvolvimento da obesidade e diabetes mellitus tipo 2.	37
Figura 5	Complicações mais comuns no Diabetes Mellitus.	38
Figura 6	Folhas (A) e flores (B) da <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	43
Figura 7	Fluxograma das classes de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes.	46
Figura 8	Biotransformação dos polifenóis.	49
Figura 9	Números de citações das espécies na bibliografia consultada.	51
Figura 10	Formação de partículas por <i>spray drying</i> .	58
Figura 11	Possíveis reações com o radical DPPH.	60
Figura 12	Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	61
Figura 13	Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe ³⁺ .	62
Figura 14	Exemplo de um processo da oxidação da fluoresceína na presença de 2,2'-Azobis (2- amidinopropano) di-hidroclorido (AAPH).	63

CAPÍTULO 1

Figura 1	Diagrama de pesquisa e triagem das patentes analisadas.	86
Figura 2	a) Estrutura química dos flavonoides b) Estrutura química do kaempferol c) Estrutura química do kaempferol 3,7-di-O-a-L.	89

CAPÍTULO 2

Figura 1	Obtenção dos extratos microencapsulados das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> por <i>spray drying</i> .	115
Figura 2	Simulação <i>in vitro</i> da digestão gastrointestinal dos extratos microencapsulados das folhas de <i>B. forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	121
Figura 3	Fotomicrografias dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	124
Figura 4	Imagens de microcápsulas obtidas dos extratos secos das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	125
Figura 5	Granulometria dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	126
Figura 6	Figura 6 – Reologia dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	127
Figura 7	Curvas de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria do extrato seco da decocção das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp.	128

forficata.

Figura 8	Curvas de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria do extrato seco da infusão das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	128
Figura 9	Difratogramas dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	130
Figura 10	Espectros de absorção na região do infravermelho dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	131
Figura 11	Cromatogramas dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	132

CAPÍTULO 3

Figura 1	Cromatogramas dos flavonoides e seus derivados <i>O</i> -glicosilados presentes nos ESDC e ESIN das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> obtidos pela análise de CLAE-PDA-ESI-IT-MS ⁿ .	165
Figura 2	Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> no peso corporal de camundongos diabéticos.	173
Figura 3	Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> na glicose sanguínea de camundongos diabéticos.	174
Figura 4	Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> na tolerância oral da glicose de camundongos diabéticos.	177
Figura 5	Efeito dos extratos secos da decocção (ESDC) de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> na tolerância oral da glicose de camundongos diabéticos.	178
Figura 6	Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> nos parâmetros lipídicos de camundongos diabéticos.	179
Figura 7	Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> nas enzimas hepáticas de camundongos diabéticos.	180
Figura 8	Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> na função renal de camundongos diabéticos.	181
Figura 9	Análise histopatológica dos efeitos dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) no fígado de camundongos Swiss.	182
Figura 10	Análise histopatológica dos efeitos dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) nos rins de camundongos Swiss.	184
Figura 11	Análise histopatológica dos efeitos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) no pâncreas de camundongos Swiss.	185

LISTA DE QUADROS E TABELAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1	Nova proposta de classificação do diabetes em cinco grupos.	32
Quadro 2	CrITÉrios laboratoriais para diagnóstico de normoglicemia, pré-diabetes e diabetes.	34
Quadro 3	Principais flavonoides presentes nas folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link com ação hipoglicemiante.	54

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Patentes sobre <i>Bauhinia forficata</i> no tratamento do <i>Diabetes Mellitus</i> .	87
----------	--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Resultados do desempenho de secagem, umidade, atividade de água, densidade, razão de Hausner e índice de Carr dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	123
Tabela 2	Identificação de moléculas presentes nos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) por <i>cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MSⁿ)</i> .	136
Tabela 3	Determinação espectrofotométrica de polifenóis e flavonoides totais durante a simulação da digestão <i>in vitro</i> dos extratos secos microencapsulados de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> e índice de bioacessibilidade.	139
Tabela 4	Capacidade antioxidantes dos ensaios FRAP (poder antioxidante férrico) e ORAC (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>) dos extratos secos microencapsulados de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> , antes e após a digestão e índice de bioacessibilidade da ação antioxidante.	141

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Conteúdo de polifenóis, flavonoides e capacidade antioxidante dos extratos secos da decocção (ESDC) e da (ESIN) das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> .	163
Tabela 2	Médias do peso corporal, consumo de ração, de água e excretas em camundongos tratados com dose aguda de extratos secos microencapsulados de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> em camundongos.	167
Tabela 3	Efeitos genotóxicos e de reparo dos extratos secos microencapsulados de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> avaliados pelo índice e frequência de danos em sangue periférico de camundongos.	168
Tabela 4	Efeitos genotóxicos dos extratos secos microencapsulados de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> avaliados pelo índice e frequência de danos na medula óssea, fígado e pâncreas de camundongos, após 14 dias de tratamento.	169
Tabela 5	Pesos relativos dos órgãos (g/100 de peso corporal) de camundongos tratados com extratos secos microencapsulados de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> em camundongos.	170
Tabela 6	Parâmetros hematológicos após administração oral de extratos secos microencapsulados de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> em camundongos.	172

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-azobis(2'-amidinopropano) dihidroclorato
ABTS	Sal de diamônio 2,2'-azino-bis(ácido 3-ethylbenzotiazolina-6'-sulfônico)
ABTS ^{•+}	Radical ABTS [(2,2'-azino-bis(ácido 3-ethylbenzotiazolina-6'-sulfônico)]
ADCY5	Gene
ADJV2	Adjuvantes de secagem
AKt	Proteína quinase B
AlCl ₃	Tricloreto de alumínio
ALT	Alanina aminotransferase
ALX	Aloxana
AMP	Adenosina monofosfato
AMP-c	3'5'-adenosina monofosfato-cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
anti-GAD	Anticorpos glutamato descarboxilase
AOAC	<i>Association of Official Methods of Analysis</i>
AS	Ausente
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Refletância total atenuada
AUC	Área sob a curva
AVC	Acidente vascular cerebral
Aw	Atividade de água
barr	Unidade de pressão que equivale a 100000 Pascals
BB	ratos <i>BioBreeding</i>
Bcl-2	Célula B de linfoma 2
BSL	Basófilos
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Caco-2E	Células intestinais
CAT	Catalase
CIP	Classificação internacional de patentes

CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-MS ⁿ	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por <i>electrospray</i> e analisador de armadilha de íons
COX	Ciclooxigenase
CT	Colesterol total
db	Densidades bruta
dc	Densidade compactada
DA	Grupo diabético
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DPPH·	Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)
DPP-IV	Inibidor oral
DRx	Difração de raio-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DSDC2	Grupo de tratamento com extrato seco da decocção administrado na dose 200mg/kg/dia
DSDC6	Grupo de tratamento com extrato seco da decocção administrado na dose 600mg/kg/dia
DSIN2	Grupo de tratamento com extrato seco da infusão administrado na dose 200mg/kg/dia
DSIN6	Grupo de tratamento com extrato seco da infusão administrado na dose 600mg/kg/dia
DTA	Análise térmica diferencial
DTG	Derivada da termogravimetria
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC	Equivalente de catequina
EDTA	Anticoagulante ácido tretracético
EFDC	Extrato aquoso obtido por decocção
EFIN	Extrato aquoso obtido por infusão
E.P.M.	Erro padrão da média

EPO	European Patent Office
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESDC	Extrato seco decocção
ESDC2	Extrato seco decocção administrado de forma aguda
ESIN	Extrato seco infusão
ESIN2	Extrato seco infusão administrado de forma aguda
ESL	Eosinófilos
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
FRAP	Poder de redução do íon ferro
FT	Flavonoides totais
FSS	Fluido salivar simulado
FGS	Fluido gástrico simulado
FIS	Fluido intestinal simulado
FTIR	Espectrometria de infravermelho com transformador de Fourier
g/cm ³	Grama dividido por centímetros cúbicos
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
GLUT4	Transportador de glicose das células do músculo esquelético
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2
GPX	Glutathione peroxidase
GWAS	Estudo de associação genômica ampla
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEM	Hemácias
HepG2	Células de carcinoma hepatocelular
HGB	Hemoglobina
HPLC-DAD	
ESI/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por <i>electrospray</i> e analisador de armadilha de íons

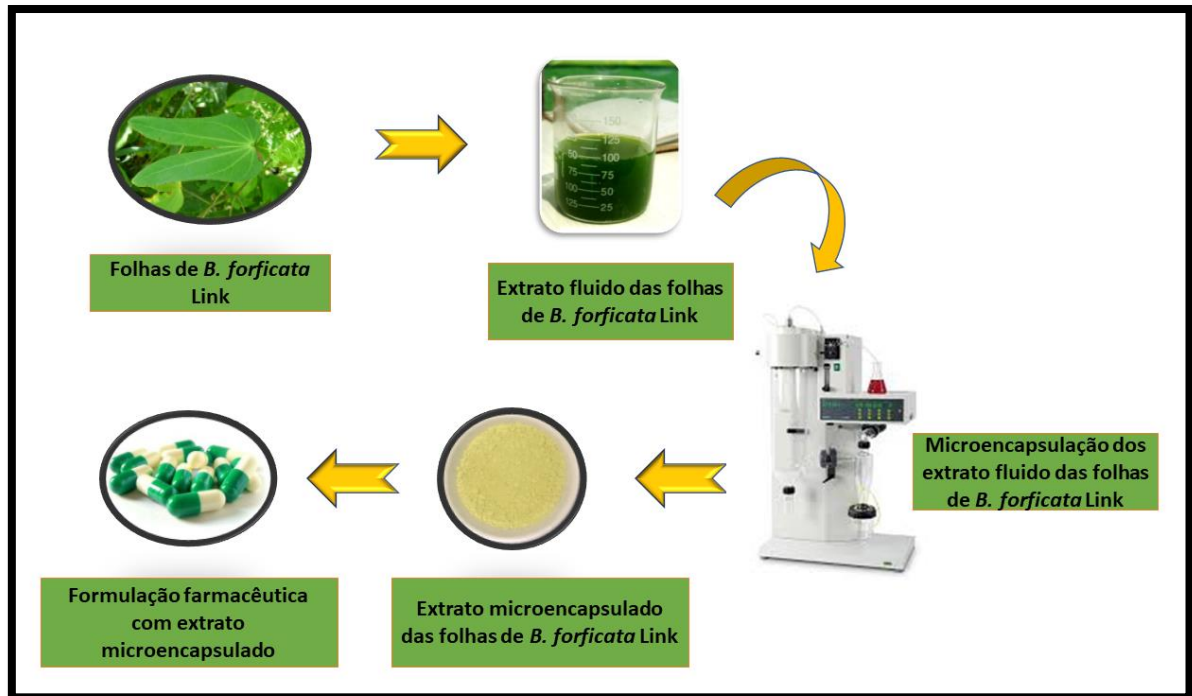
Hr	Razão de Hausner
IB	Índice de bioacessibilidade
IC	Insuficiência cardíaca
IP	Via de administração intraperitoneal
IP3	Inositol trifosfato
IMC	Índice de massa corpórea
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IV-TF	Análise por espectrometria de infravermelho
IV	Via de administração intravenosa
kV	Unidade quilovolt correspondente a 1000 volt
LADA	<i>Latent auto-immune diabetes in adults</i>
LPH	Lactase florizina hidrolase
LOX	Lipooxigenase
LTC	Leucócitos
LTL	Linfócitos
mA	Milésima parte de um Amper
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
<i>Mesh</i>	Unidade de abertura da peneira
MEK	Metiletilcetona
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MODY	Diabetes neonatal e diabetes de início da maturidade do jovem
MNT	Monócitos
MS ²	Etapa 2 da fragmentação da massa nominal
MS ³	Etapa 3 da fragmentação da massa nominal
NA	Grupo controle negativo (grupo normal)
NaOH	Hidróxido de sódio
ND	Não digerida
NI	Não identificado
NK-kB	Fator nuclear Kappa-B
nm	Nanômetros
NOD	Camundongos diabéticos não-obesos

Nrf2	Fator nuclear redox
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
O·	Radical livre de oxigênio
OH	Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitritos
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio
ORAC-H	Fração hidroxila
PAD	Detector de pulso amperométrico
pKa	Constante de dissociação
PKC	Proteína quinase C
PI3K	Fosfoinosítido 3-quinase
PLA 2	Ácido araquidônico fosfolipase
PLT	Plaquetas
PK	Proteínas quinases
PPAR- γ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama
PT	Polifenóis totais
RH	Doadores de hidrogênio
SA	Sem atividade
SEARCH	Pesquisa para diabetes na juventude, nos Estados Unidos
SC	Via de administração subcutânea
SGLT1	Transportador de glicose dependente de sódio
SGLT2	Co-transportador renal de sódio-glicose 2
SOD	Superóxido dismutase
SREBP-1c	Fator de transcrição
STZ	Estreptozotocina
TE	Equivalente Trolox
TEAC	Capacidade antioxidante em equivalente de Trolox
TG	Termogravimetria
TNF- α	Fatores de necrose tumoral alfa
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
TODAY	Estudo sobre opções de tratamento para DM2 em adolescentes e jovens
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UHPLC-MS	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>

UV-VIS	Luz ultravioleta visível em determinado comprimento de onda
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>
p/v	Peso da substância dividido pelo volume da substância
%DS	Desempenho do processo de secagem
%IC	Índice de Carr
ΔH_{fus}	Delta da energia de entalpia de fusão da substância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo Geral	28
2.2	Objetivos Específicos	28
3	REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1	Diabetes Mellitus	30
3.1.1	Tipo de Diabetes Mellitus	31
3.1.1.2	<i>Diabetes Mellitus tipo 2</i>	32
3.1.1.3	<i>Diagnóstico</i>	33
3.1.1.4	<i>Fisiopatologia</i>	34
3.1.1.5	<i>Complicações</i>	37
3.1.1.6	<i>Modelos de indução do diabetes</i>	39
3.1.1.7	<i>Tratamento medicamentoso para o diabetes mellitus tipo 2</i>	40
3.1.1.8	<i>Plantas medicinais como alternativa terapêutica no tratamento do diabetes mellitus</i>	41
3.2	<i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i>	42
3.2.1	Aspectos botânicos da <i>Bauhinia forficata</i> Link	42
3.2.2	Aspectos fitoquímicos da <i>Bauhinia forficata</i> Link	44
3.2.2.1	<i>Compostos fenólicos</i>	44
3.2.2.1.1	<i>Flavonoides</i>	44
3.2.3	Biodisponibilidade de compostos fenólicos presentes nas folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link	48
3.2.3.1	<i>Biodisponibilidade de flavonoides</i>	50
3.2.4	<i>Bauhinia forficata</i> Link no tratamento do diabetes mellitus	50
3.2.4.1	<i>Kaempferol</i>	53
3.2.4.2	<i>Quercetina</i>	53
3.3	Microencapsulação por <i>spray drying</i>	56
3.4	Caracterização dos extratos secos microencapsulados das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link	58
	REFERÊNCIAS	65
4	CAPÍTULOS	80
	Capítulo 1: <i>Bauhinia forficata</i> no tratamento do diabetes mellitus: uma revisão de patentes.	82
	Capítulo 2: Microencapsulação e bioacessibilidade polifenóis de extratos aquosos das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> (<i>Fabaceae</i>).	109
	Capítulo 3: Efeitos hipoglicemiantes de extratos microencapsulados das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> Link subsp. <i>forficata</i> em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina.	151
	Patente: Formulação contendo extrato microencapsulado de <i>Bauhinia forficata</i> link subsp. <i>forficata</i> com atividade antioxidante e hipoglicemiante para o tratamento do diabetes mellitus.	195
5	CONCLUSÕES	199
6	PERSPECTIVAS	201
	ANEXOS	203
	APÊNDICES	206



Introdução

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença de prevalência alta, que acomete 415 milhões de pessoas no mundo, com perspectiva de aumento para 642 milhões até o ano de 2040 (BECKMAN et al., 2013; OGURTSOVA et al., 2017). Essa epidemia deve-se ao crescimento e envelhecimento populacional, maior urbanização, progressiva prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevivência de pacientes com DM2 (MILECH et al, 2016).

A hiperglicemia, característica clínica dessa patologia, causa diversas complicações metabólicas agudas e crônicas como as doenças cardiovasculares, ulcerações nos pés, amputações de membros inferiores, retinopatia e insuficiência renal. Assim, o controle glicêmico intensivo é essencial para se evitar tais complicações, reduzindo a morbimortalidade desses pacientes (COSTANTINO et al, 2017). Muitas vezes, a abordagem terapêutica do DM com agentes antidiabéticos é bastante dispendiosa, além de possuir vários efeitos adversos, sendo a fitoterapia uma alternativa viável (HASAN et al., 2018).

O Brasil apresenta uma flora riquíssima, de grande interesse para o meio científico, devido às diversas plantas fitoterápicas, ricas em compostos bioativos, que exercem atividades biológicas e por isso podem ser utilizadas como matérias-primas, para a síntese de fármacos com ação analgésica, tranquilizante, diurética, laxante, hipoglicemiante, bactericida, utilizando esses recursos naturais de forma racional (SOUZA; FELFILI, 2006).

Dentre essas plantas com potencial fitoterápico, destacam-se alguns representantes do gênero *Bauhinia*, sendo a *Bauhinia forficata* Link umas das espécies mais estudadas no Brasil e que apresenta grande número de pesquisas quanto à atividade hipoglicemiante. As folhas da *B. forficata*, conhecida popularmente como pata-de-vaca, são frequentemente utilizadas na forma de chás (SILVA; CECHINEL-FILHO, 2002; SILVA et al., 2012).

A principal ação terapêutica da *B. forficata* é no tratamento coadjuvante do DM2, pautada em uma pluralidade de estudos científicos com diferentes modelos experimentais, sendo a propriedade antidiabética atribuída à presença dos flavonoides glicosídeos kaempferol e quercetina presentes nas folhas, principalmente pelas suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (MARQUES et al, 2013; YEON et al, 2015).

O kaempferol é capaz de diminuir a glicose sérica e aumentar a sua captação pelo músculo esquelético de forma tão eficiente quanto à insulina. Testes *in vivo* demonstraram que o tratamento com kaempferol aumentou a síntese e a secreção de insulina em células β pancreáticas e reduziu a interleucina 1 beta (IL-1 β), os fatores de necrose tumoral alfa (TNF-

α), a peroxidação lipídica e o nitrito, melhorando a defesa antioxidante (JORGE et al., 2004; ZHANG; LIU, 2011).

Coskun et al. (2005) e Stewart et al. (2009) relataram o mecanismo de ação da quercetina no diabetes, como diminuição da peroxidação lipídica, aumento das atividades de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT), inibição da ativação da enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) dependente de insulina e redução da absorção intestinal de glicose por inibição transportador de glicose tipo 2 (GLUT2).

Os compostos bioativos são geralmente sensíveis a condições ambientais adversas, incluindo temperaturas desfavoráveis, luz, pH, umidade e oxigênio, e são, portanto, suscetíveis à degradação durante o processamento e armazenamento do produto, devido à existência de ligações não saturadas nas estruturas moleculares. Assim, a microencapsulação é uma alternativa que pode ser aplicada para aumentar potencialmente a estabilidade física, química e microbiológica dos produtos fitoterápicos. Essa técnica consiste na incorporação de substâncias centrais sensíveis ou funcionais, chamadas de “encapsuladas” em um invólucro para proteção e facilidade de manuseio (FANG; BHANDARI, 2011).

Existem diferentes técnicas de microencapsulação, como *spray drying*, resfriamento/resfriamento por spray, coacervação, extrusão, revestimento fluidizado, aprisionamento de lipossomos e inclusão molecular (GOUIN, 2004). No entanto, a secagem de extratos vegetais por pulverização ou *spray drying* é o método mais comum e economicamente viável usado nas indústrias farmacêuticas (CARNEIRO et al., 2013; FERNANDES et al., 2014; SOUZA; OLIVEIRA, 2012).

Além da microencapsulação, que reduz a perda dos compostos bioativos durante o processamento e armazenamento de extratos vegetais, é importante analisar se o processo de digestão afeta esses compostos, pois isso afetará sua biodisponibilidade e seus possíveis efeitos benéficos (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014). Assim, os métodos de simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* são geralmente utilizados na avaliação da biodisponibilidade desses fitoquímicos e constituem uma técnica segura, rápida que permite a predição de ensaios *in vivo*, além de não precisar de cumprimentos éticos dos métodos *in vivo* (BUNIEWSKA et al., 2017).

Modelos animais são uma das principais ferramentas para investigar o mecanismo de ação, bem como para explorar a eficácia dos princípios ativos de plantas que alegam potenciais efeitos antidiabéticos. Entre todos os modelos animais, os roedores têm sido amplamente utilizados pelo tempo reduzido para a indução do DM2 e o custo relativamente baixo para

manutenção e com resultados significativos. A estreptozotocina (STZ) é amplamente utilizada para induzir o DM2 em animais por ser agente citotóxico seletivo e, conseqüentemente, destruir seletivamente as células beta pancreáticas. Essa substância pode ser administrada por via intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) ou subcutânea (SC) (HASAN et al., 2018; VEDTOFTE et al., 2010; XIAO et al., 2010).

Apesar dos benefícios terapêuticos já comprovados dos extratos das folhas da *B. forficata*, e de já existir na literatura estudos de toxicidade sobre essa planta, é relevante investigar a toxicogenética dos extratos secos microencapsulados obtidos nesse estudo. Para isso, realizou-se teste de toxicidade aguda, *screening* hipocrático, investigação dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos de camundongos (*Mus musculus*).

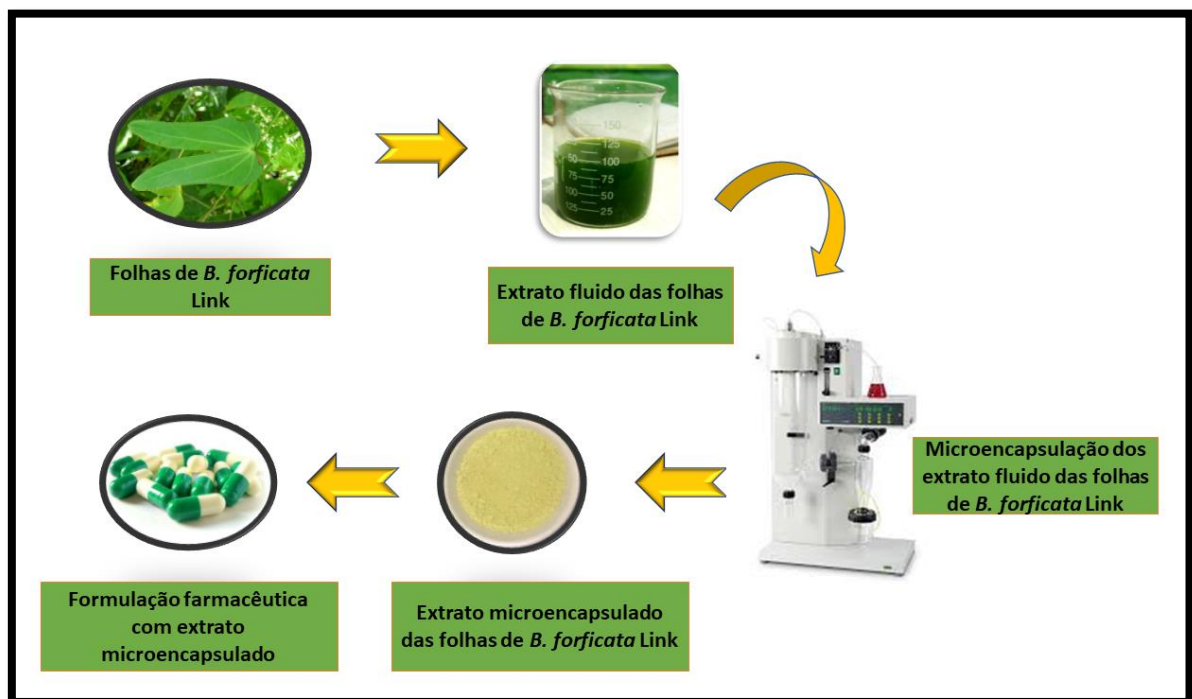
Diante da necessidade de alternativas terapêuticas para o tratamento do diabetes mellitus, devido à sua alta prevalência e morbimortalidade dos pacientes acometidos por esta patologia e das drogas existentes possuírem vários efeitos adversos e alto custo, a tese intitulada **“Efeitos hipoglicemiantes de extratos microencapsulados das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*: caracterização química, capacidade antioxidante e toxicogenética”** foi desenvolvida e está estruturada em: introdução, objetivos (geral e específicos), referencial teórico, 3 capítulos (Figura 1), que se referem a artigos científicos publicados e a serem submetidos a revistas internacionais, além de um depósito de patente.

O **Capítulo 1** apresenta uma prospecção tecnológica, a fim de conhecer o estado da arte sobre a utilização das folhas da *Bauhinia forficata* no tratamento do diabetes mellitus, no contexto nacional e internacional, para subsidiar o desenvolvimento de novos fitoterápicos à base dessa planta. O **Capítulo 2** aborda a obtenção dos extratos secos microencapsulados das folhas da *B. forficata* e sua caracterização quanto ao teor de umidade, atividade de água, densidade, granulometria, reologia, morfologia, análises térmicas, difração de raio-X, espectrometria de infravermelho, análise de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas, além de avaliação da bioacessibilidade dos polifenóis por meio da digestão *in vitro* e sua atividade antioxidante. No **Capítulo 3**, avaliou-se os efeitos hipoglicemiantes de extratos secos microencapsulados, em modelo animal para diabetes induzidos por estreptozotocina, bem como sua toxicogenética por parâmetros hematológicos, bioquímicos, histopatológicos, além de seus efeitos genotóxicos em multi-órgãos. E por fim a patente depositada sobre o desenvolvimento de uma formulação contendo extrato microencapsulado de *Bauhinia forficata* Link subespécie *forficata* para o tratamento do diabetes mellitus.

Figura 1- Fluxograma da tese sobre *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.



Fonte: Autoria própria (2019).



Objetivos

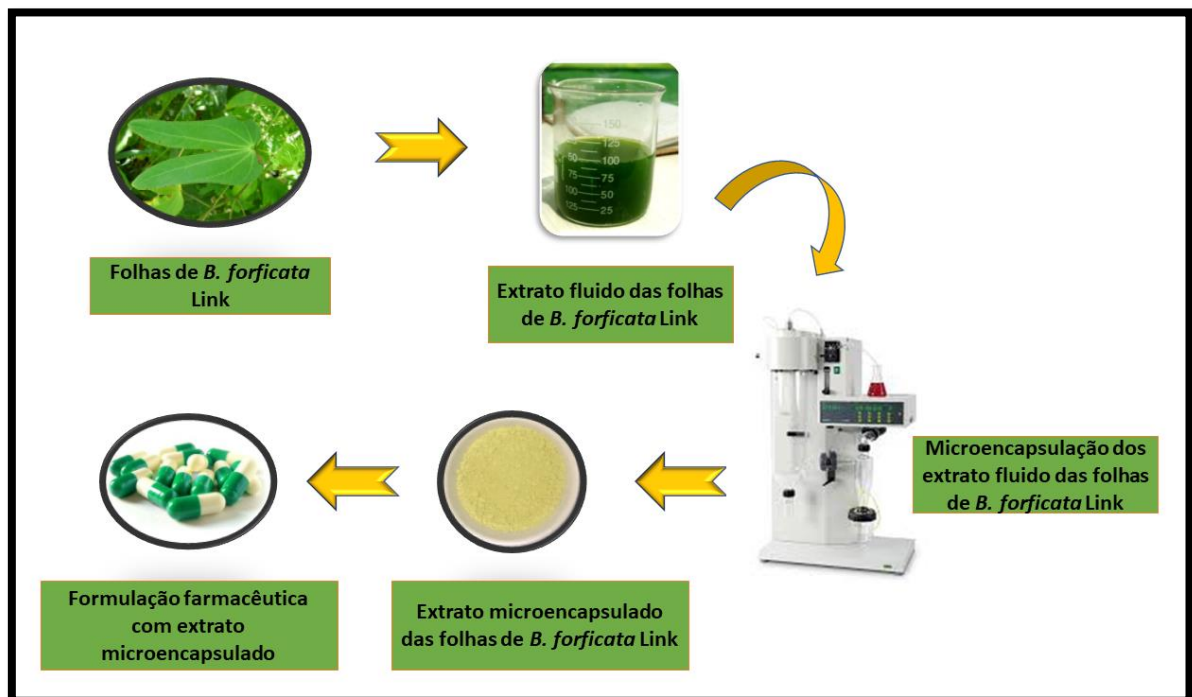
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Obter e caracterizar extratos microencapsulados das folhas da *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*, avaliar a sua bioacessibilidade, seus efeitos antioxidantes, hipoglicemiantes e toxicogénicos como uma alternativa para o tratamento do diabetes mellitus.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o estado da arte sobre a utilização da *Bauhinia forficata* no tratamento do diabetes mellitus.
- Obter extratos secos microencapsulados das folhas de *Bauhinia forficata* e caracterizá-los físico-química, térmica e reologicamente.
- Avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos dos extratos microencapsulados e verificar a atividade antioxidante em cada etapa do processo de digestão *in vitro*.
- Avaliar os efeitos tóxicos dos extratos microencapsulados por meio da toxicidade aguda, *screening* hipocrático, ensaio cometa e dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos de camundongos *Swiss*.
- Avaliar o efeito hipoglicemiante dos extratos secos microencapsulados em camundongos *Swiss* diabéticos.



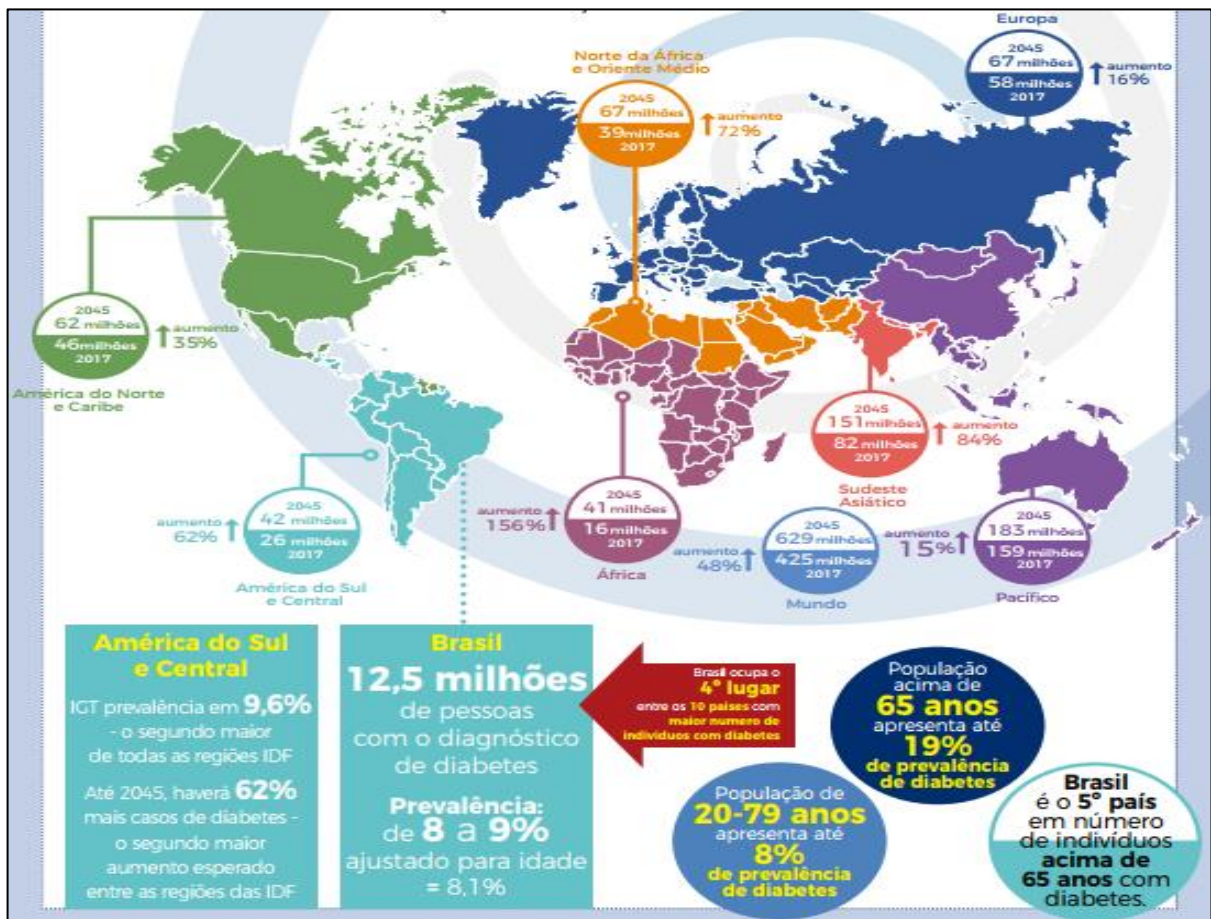
Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) é uma doença multifatorial que afeta um número crescente de pacientes, tornando-se um dos maiores problemas de saúde global do século XXI e está entre as 10 principais causas de morte a nível mundial, representando mais de 80% das mortes prematuras por doenças crônicas não transmissíveis. Aproximadamente 425 milhões de pessoas em todo o mundo, ou seja, 8,8% dos adultos de 20 a 79 anos, estima-se que tenham diabetes. Cerca de 79% vivem em países de baixa e média renda e o número de pessoas com essa doença aumenta para 451 milhões se a idade for ampliada para faixa de 18 a 99 anos. Se estas tendências continuarem, em 2045, 693 milhões de pessoas com essa faixa etária, isto é, 629 milhões de pessoas de 20 a 79 anos, terão diabetes (Figura 2) (BAKHTI; BÖTTCHER; LICKERT, 2018; IDF, 2017).

Figura 2 - Número de pessoas com diabetes em todo o mundo em 2017 e 2045 (20 a 79 anos).



Fonte: IDF (2017).

3.1.1 Tipo de Diabetes Mellitus

O DM caracteriza-se pela perda ou disfunção das células β pancreáticas e pode ser classificado em DM tipo 1 (DM1) (devido à destruição autoimune de células β , geralmente levando à deficiência total de insulina), DM tipo 2 (DM2) (devido a uma perda progressiva de secreção de insulina pelas células β , frequentemente no contexto de resistência à insulina), DM gestacional (DMG) (diagnosticada no segundo ou terceiro trimestre de gestação) e tipos específicos de diabetes devido a outras causas, como síndromes monogênicas do diabetes (como diabetes neonatal e diabetes de início da maturidade do jovem [MODY]), doenças do pâncreas exócrino (como fibrose cística e pancreatite) e drogas ou diabetes induzida por produtos químicos (como uso de glicocorticoides, no tratamento de HIV/AIDS ou após transplante de órgãos) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION et al., 2018; BAKHTI; BÖTTCHER; LICKERT, 2018).

Na prática clínica, além dos tipos de DM citados, há ainda uma forma de diabetes diagnosticada no adulto, geralmente acima de 30 anos, denominada diabetes autoimune latente do adulto (LADA), caracterizada também pela deficiência de insulina por uma destruição autoimune das células β , porém sua progressão é mais lenta do que no DM1. Esse tipo de DM ocorre em 2 a 12% dos pacientes diagnosticados com DM2, sendo o tipo autoimune mais prevalente no adulto (ALVES et al., 2016). A LADA pode ser diagnosticada com base em três critérios: 1) idade superior a 30 anos; 2) positividade para pelo menos um dos quatro anticorpos identificados na DM1; e 3) ausência de necessidade de insulinoterapia nos primeiros seis meses após o diagnóstico. Além destes critérios, observou-se um quarto que se refere à resistência à insulina (FOURLANOS et al., 2005).

Um estudo recente realizado por Ahlqvist et al. (2018) sugere uma nova classificação para o DM, subdividindo-o em cinco grupos de acordo com as características apresentadas pelos pacientes na progressão da doença e risco de complicações diabéticas. A investigação ocorreu em pacientes com diabetes recém-diagnosticados ($n = 8980$) e foi baseada em seis variáveis (anticorpos glutamato descarboxilase [anti-GAD], idade ao diagnóstico, índice de massa corpórea [IMC], hemoglobina glicosilada [HbA_{1c}], função das células β e resistência à insulina), e foram relacionados a dados prospectivos de registros de pacientes sobre o desenvolvimento de complicações e prescrição de medicamentos.

Essa nova estratificação pode identificar subgrupos de pacientes com maior risco de complicações que merecem uma abordagem intensiva desde as fases iniciais da doença, bem como direcionar um tratamento adequado precoce, sendo uma ferramenta para uma terapêutica

individualizada. Entretanto, no Brasil, os parâmetros laboratoriais propostos pela nova classificação podem não ser acessível a muitos pacientes, como a dosagem do anti-GAD, que nem sempre está disponível, além de elevar os custos do diagnóstico de forma significativa (ZANINELLI, 2018).

Quadro 1- Nova proposta de classificação do diabetes em cinco grupos.

Grupo	Nome proposto	Características	Tratamento
1	Diabetes autoimune grave	<ul style="list-style-type: none"> – Engloba essencialmente o DM tipo 1 e LADA – Início em idade mais jovem – IMC mais baixo – Controle metabólico ruim – Deficiência de insulina – Anti-GAD positivo – Risco de cetoacidose ao diagnóstico de 31% 	Insulina prescrita em 42%
2	Diabetes insulino-deficiente grave	<ul style="list-style-type: none"> – Semelhante ao grupo 1, porém Anti-GAD negativo – HBA1c alta – Maior incidência de retinopatia – Risco de cetoacidose ao diagnóstico de 25% 	<ul style="list-style-type: none"> – Insulina prescrita em 29% – Uso maior de Metformina
3	Diabetes insulino-resistente grave	<ul style="list-style-type: none"> – Resistência à insulina – IMC elevado – Maior incidência de doença renal do diabetes – Maior risco de complicações crônicas numa média de 3,9 anos 	Insulina em <4%
4	Diabetes leve relacionado à obesidade	<ul style="list-style-type: none"> – Obesidade – Idade mais jovem – Não insulino-resistente 	Insulina em <4%
5	Diabetes leve relacionado à idade	<ul style="list-style-type: none"> – Idade mais avançada – Alterações metabólicas discretas. 	Insulina em <4%

Fonte: Adaptado de Ahlqvist et al. (2018).

3.1.1.2 Diabetes Mellitus tipo 2

O DM2 é caracterizado por uma desregulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas e resulta de uma secreção insuficiente de insulina, resistência à insulina ou uma combinação de ambas, sendo mais comum do que o DM1, representando cerca de 90% de todos

os casos (DEFRONZO et al., 2015). Essa patologia é a sexta principal causa de incapacidade, com um impacto negativo na economia, com gastos estimados em 825 bilhões de dólares. Um aumento da prevalência da obesidade, inatividade física e consumo de dietas densas em energia são os principais agentes responsáveis pela progressão no número de pacientes com DM2, cujo risco de mortalidade é 15% maior do que em indivíduos sem essa doença (CHATTERJEE, 2017).

3.1.1.3 Diagnóstico

Segundo a ADA (2018), no DM, as alterações fisiopatológicas estão presentes antes que os valores glicêmicos atinjam níveis supranormais. A condição na qual os valores glicêmicos estão acima dos valores de referência, mas ainda abaixo dos valores diagnósticos de DM, denomina-se pré-diabetes. A resistência à insulina já está presente e, na ausência de medidas de combate aos fatores de risco modificáveis, evolui, frequentemente, para a doença clinicamente manifestada, sendo atribuídos os termos “glicemia de jejum alterada” e “tolerância à glicose diminuída” a essas condições de risco aumentado para doenças cardiovasculares e outras complicações em longo prazo.

Na maioria dos casos de pré-diabetes, a “doença” é assintomática e o diagnóstico deve ser feito com base em exames laboratoriais. As categorias de tolerância à glicose têm sido definidas com base nos seguintes exames: 1) glicemia em jejum que deve ser coletada em sangue periférico após jejum calórico de no mínimo 8 horas; 2) teste oral de tolerância à glicose (TOTG), que avalia a glicemia após sobrecarga, que pode ser a única alteração detectável no início do DM, refletindo a perda de primeira fase da secreção de insulina (deve ser realizado utilizando previamente à ingestão de 75 g de glicose dissolvida em água, coleta-se uma amostra de sangue em jejum para determinação da glicemia; coleta-se outra alíquota, então, após 2 horas da sobrecarga oral); 3) hemoglobina glicada (HbA1c) que mostra os níveis glicêmicos dos últimos 3 a 4 meses, com menos variabilidade diária e independe do estado de jejum (Quadro 2) (SBD, 2017).

Quadro 2 - Critérios laboratoriais para diagnóstico de normoglicemia, pré-diabetes e diabetes.

	Glicose em jejum (mg/dL)	Glicose 2 horas após sobrecarga com 75 g de glicose (mg/dL)	Glicose ao acaso	HbA1c (%)
Normoglicemia	< 100	< 140	–	< 5,7
Pré-diabetes ou risco aumentado para DM	≥ 100 e < 126	≥ 140 e < 200	–	≥ 5,7 e < 6,5
Diabetes	≥ 126	≥ 200	≥ 200 com sintomas inequívocos de hiperglicemia	≥ 6,5

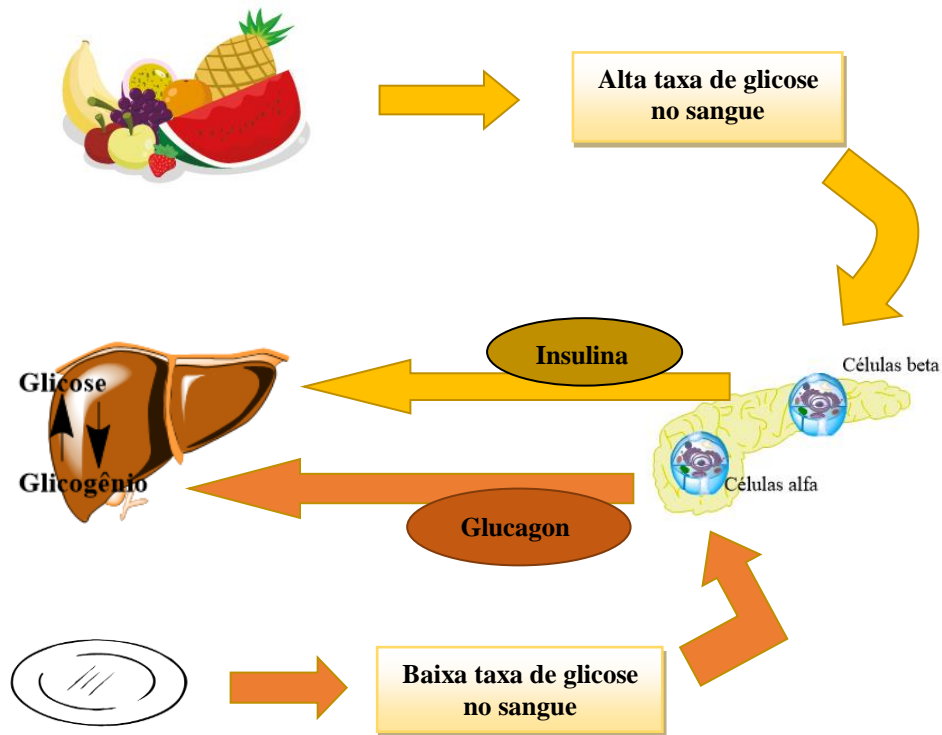
Fonte: Adaptado de SBD (2017).

3.1.1.4 Fisiopatologia

No período pós-prandial, há um aumento nos níveis de glicose no sangue que estimula a secreção de insulina, resultando em um aumento no transporte, biotransformação e armazenamento nos músculos e tecido adiposo. Durante o jejum, a glicose sanguínea é secretada pelo fígado e usada pelo cérebro, sem qualquer dependência da insulina. Além do armazenamento de glicose, a insulina também inibe a secreção de glucagon e diminui a concentração de ácidos graxos séricos, levando a um declínio na produção de glicose no fígado (Figura 3) (KANGRALKAR; PATIL; BANDIVADEKAR, 2010).

A quantidade de insulina liberada para manter a homeostase normal da glicose é estabelecida pela sua tolerância nos tecidos. Esse feedback é provavelmente mediado por mecanismos neuronais e humorais, mas os mediadores exatos ainda não são conhecidos. Quando a resistência à insulina se desenvolve em tecidos sensíveis a esse hormônio, o feedback para as células β pancreáticas assegura que estas aumentem a produção de insulina para manter a tolerância normal à glicose. Quando essas células são incapazes de aumentar a produção de insulina, devido a uma resistência dos tecidos a ela, o resultado é a ocorrência de uma hiperglicemia, que inicialmente se manifesta como uma intolerância à glicose (KAHN; COOPER; DEL PRATO, 2014).

Figura 3 - Papel da insulina no metabolismo da glicose.



Fonte: Adaptada de Kangralkar, Patil e Bandivadekar (2010).

A DM2 está associada a diversos distúrbios fisiológicos como a secreção insuficiente de insulina, níveis aumentados de glucagon durante o jejum, como também de ácidos graxos livres no plasma e secreção elevada de glicose hepática, que não normalizam após uma refeição e captação de glicose muscular comprometida (DEFRONZO et al., 2015). Quando a produção de insulina é insuficiente ou há uma resistência à insulina nos tecidos, a absorção de glicose é reduzida, ocasionando hipoglicemia intracelular e hiperglicemia extracelular. A hipoglicemia intracelular causa a gliconeogênese que provoca lipólise (causando cetoacidose diabética) e diminui a síntese proteica e gamaglobulinas (causando caquexia, polifagia e comprometimento da cicatrização), enquanto a hiperglicemia extracelular causa coma hiperglicêmico e diurese osmótica (OZOUGWU et al., 2013).

A secreção diminuída da insulina ocorre devido à apoptose das células β ocasionada, dentre outros fatores, pelo estresse oxidativo induzido pelo excesso de glicose (SKYLER et al., 2017). As células β são uma população celular heterogênea composta de subpopulações que não apenas diferem em sua morfologia, mas também em sua atividade proliferativa, responsividade à glicose, secreção de insulina, estado de maturação ou em susceptibilidade ao ataque imune e ao estresse metabólico, sendo sensíveis a estados pró-inflamatórios e

glicolipotóxicos, com consequente disfunção das células do núcleo o que contribui para a patogênese do DM2 (AVRAHAMI et al., 2017; LIU; HEBROK, 2017; NASTESKA; HODSON, 2018; ROSCIONI et al., 2016).

Apesar dos avanços na compreensão da importância da resistência à insulina e da disfunção das células β à patogênese do DM2 e dos estados de alto risco, o processo da doença é claramente heterogêneo e inclui outros fatores patogênicos. Os genes e o ambiente juntos são importantes determinantes da resistência à insulina e da disfunção das células β . Estudos têm confirmado a influência da genética na ocorrência do DM2, nos quais foram identificados mais de 80 *locus* associados a essa patologia em todo o genoma humano (GWAS) (FUCHSBERGER et al., 2016; MOHLKE; BOEHNKE, 2015). Entretanto, os mecanismos biológicos e moleculares responsáveis por esta patologia ainda são obscuros. Morris et al. (2012) verificaram que os introns 1-3 do gene ADCY5 estavam relacionados com o DM2, assim como os alelos rs11717195-T e rs11708067-A de indivíduos de ascendência europeia.

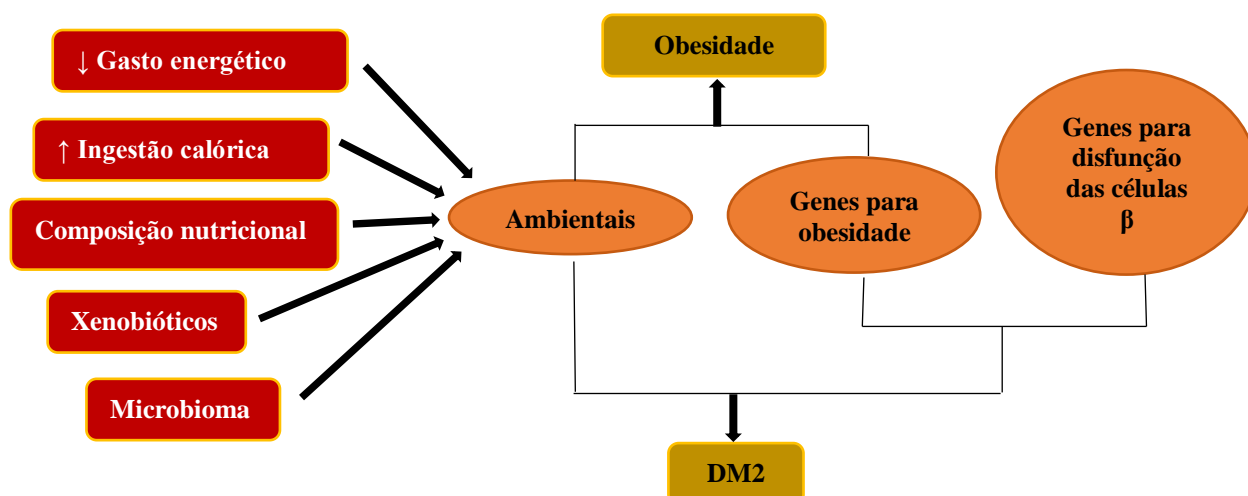
A interação de genes que afetam a adiposidade corporal com fatores ambientais resulta no desenvolvimento de obesidade e resistência insulínica associada. No entanto, somente quando os genes para a função de células β anormais estão presentes, juntamente com aqueles para a adiposidade corporal, a interação com o ambiente resulta no desenvolvimento de DM2. As mudanças no *pool* genético não podem explicar o rápido aumento na prevalência desta patologia nas últimas décadas, por isso as mudanças ambientais são essenciais para o entendimento da epidemia (KAHN; COOPER; DEL PRATO, 2014).

Referindo-se aos fatores ambientais, além do aumento na ingestão calórica e diminuição do gasto de energia, destaca-se também a composição nutricional, especificamente o aumento da quantidade de gordura na dieta (principalmente gordura saturada), cujas consequências são obesidade, resistência à insulina, disfunção das células β e intolerância à glicose (HU; VAN DAM; LIU, 2001). Além disso, o processo de envelhecimento também reduz a capacidade de resposta das células β à glicose, diminuindo sua tolerância. Outra evidência importante é que a susceptibilidade ao diabetes pode ser adquirida ainda no início da vida, provavelmente devido à programação fetal ou neonatal através de fenômenos epigenéticos, sendo a saúde materna e a da primeira infância, aspectos essenciais a serem abordados nas estratégias efetivas de prevenção (GUÉNARD et al., 2013; NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011).

Diamant, Blaak e De Vos (2011) verificaram que a microbiota intestinal também parece ser importante para a fisiopatologia do diabetes tipo 2 e que a mesma possui cerca de 100 vezes mais informação genética do que o genoma humano, correspondendo a um metagenoma humano. Essas colônias intestinais desempenham um papel importante em várias condições e

distúrbios metabólicos como a obesidade e o DM2, embora ainda haja uma lacuna sobre todas as espécies bacterianas que interferem no metabolismo humano (KOOTTE et al., 2012). Qin et al (2012) e Karlsson et al. (2013) confirmaram que as alterações funcionais na microbiota intestinal estão diretamente ligadas ao desenvolvimento do DM2, embora os marcadores metagenômicos possam diferir entre as populações, conseqüentemente com variações na sua capacidade de prever o desenvolvimento de diabetes. Um estudo realizado em pacientes com síndrome metabólica mostrou que houve uma melhora na sensibilidade à insulina após seis semanas da infusão da microbiota intestinal de doadores magros (Figura 4) (VRIEZE et al., 2012).

Figura 4 - Papel dos genes e do ambiente no desenvolvimento da obesidade e diabetes mellitus tipo 2.

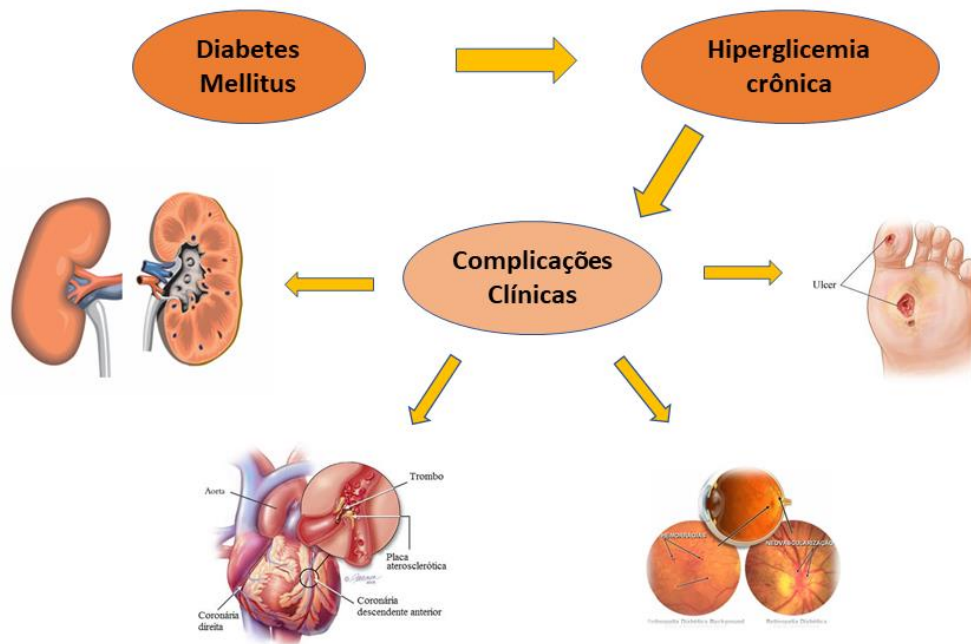


Fonte: Adaptada de Kahn, Cooper e Del Prato (2014).

3.1.1.5 Complicações

Vários fatores genéticos e ambientais podem estar relacionados com a perda progressiva das células β e/ou da sua função, tendo como consequência, a hiperglicemia, sendo esta a principal responsável pelas complicações micro e macrovasculares que ocorrem no DM (Figura 5) (SKYLER et al., 2017). O diabetes também tem sido responsabilizado por outros agravos, de forma direta ou indiretamente, no sistema musculoesquelético, no sistema digestório, na função cognitiva e na saúde mental, além de ser associado a diversos tipos de câncer (GREGG; SATTAR; ALI, 2016).

Figura 5 - Complicações mais comuns no Diabetes Mellitus.



Fonte: Autoria própria (2018).

A doença cardiovascular é a principal complicação macrovascular do DM2 e aumenta o risco de morte de três a quatro vezes em comparação com pessoas que não têm doença cardiovascular (STAMLER, et al., 1993). O DM2 também é fator de risco para acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico, insuficiência cardíaca (IC), doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) e doença microvascular, afetando significativamente a expectativa e a qualidade de vida (SBD, 2017).

As complicações microvasculares mais presentes em DM2 são nefropatia, retinopatia e neuropatia. A doença renal é uma das complicações mais comuns encontrada nesses pacientes, com progressão mais rápida na infância. A prevalência de microalbuminúria é de 13 a 27% ao diagnóstico e chega a 16 a 38,6% após cinco anos, com progressão associada a piora da hemoglobina glicada (HbA1c) (BJORNSTAD et al., 2016; DART et al., 2014; TODAY STUDY GROUP, 2013; TRYGGESTAD; WILLI, 2015).

Com relação à retinopatia, um estudo sobre opções de tratamento para DM2 em adolescentes e jovens (TODAY) mostrou uma prevalência de 13,7% dessa complicação após cinco anos. Outra pesquisa para diabetes na juventude, nos Estados Unidos (SEARCH), teve uma ocorrência de 42% após sete anos de DM2. Dados sobre neuropatia, por sua vez, são extremamente raros em casos de DM2 em adolescentes, mas um estudo canadense reportou prevalência da doença de 7,6% após seis a sete anos (DART et al., 2014; MAYER-DAVIS et al., 2012; TODAY STUDY GROUP, 2013).

O DM2 é especialmente desafiador em pacientes com menos de 25 anos, cujos fenótipos complexos podem exigir muitas décadas de tratamento intensivo para minimizar o desenvolvimento e a progressão das complicações microvasculares e macrovasculares. No caso de pacientes idosos diabéticos (com 65 anos de idade ou mais), além dessas complicações, há concomitantemente outras comorbidades, comprometimento cognitivo e risco maior de hipoglicemia. Outras complicações também causadas pela hiperglicemia são disfunção endotelial, formação de produtos finais de glicação avançada, hipercoagulabilidade, aumento da reatividade plaquetária e expressão aumentada do co-transportador renal de sódio-glicose 2 (SGLT2) (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017).

A cetoacidose diabética é outra complicação metabólica grave associada ao diabetes, que inclui a tríade de hiperglicemia, acidose metabólica e aumento da concentração de corpos cetônicos no organismo. Outro problema relacionado ao DM são as amputações de membros inferiores, cujo risco é influenciado pelo controle de diversos fatores como controle glicêmico, controle pressórico, tabagismo e depende da habilidade dos sistemas de saúde em rastrear o risco, estratificá-lo e tratar os pacientes com pés de alto risco e as úlceras (PATEL, et al., 2012; SBD, 2017).

3.1.1.6 Modelos de indução do diabetes

O diabetes mellitus é induzido quimicamente, cirurgicamente ou por manipulações genéticas. E, embora existam alguns relatos que demonstraram usar animais maiores para induzir diabetes, é muito comum o uso de roedores para esse tipo de experimento (FERNÁNDEZ-MILLÁN et al. 2009; MATSUI-INOHARA et al., 2009; MATSUMOTO et al., 2009). A indução química do DM em animais é realizada com a estreptozotocina (STZ) e a aloxana (ALX) que podem ser administradas por via intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) ou subcutânea (SC). Ambos são agentes citotóxicos seletivos e, conseqüentemente, destroem seletivamente as células β pancreáticas. A STZ e ALX são transportadas para células β pancreáticas pelo transportador de glicose GLUT2, pois são análogas da glicose. A STZ se divide em glicose e metilnitrosourea, que possui propriedades alquilantes do DNA, levando à destruição das células β , causando uma supressão da secreção de insulina. Por outro lado, o ALX gera espécies reativas de oxigênio (EROs) na presença de glutathiona intracelular. Os ROS causam reação redox cíclica até que os radicais hidroxila sejam produzidos, o que eventualmente leva à destruição das células β (ISLAM; DU LOOTS, 2009; LENZEN, 2008).

A remoção cirúrgica do pâncreas é outra forma de indução do DM, em diversos modelos animais como ratos, cães e porcos, sendo uma alternativa com menos efeitos colaterais tóxicos com relação ao diabetes quimicamente induzido (VEDTOFTE et al., 2010; WANG et al., 2009).

Entretanto, essa técnica possui várias desvantagens e limitações como a complexidade para a execução da mesma, que exige grande expertise para realizar a cirurgia, alto custo para a instalação da sala de cirurgia, grande quantidade de analgésicos e antibióticos, suplemento de enzimas pancreáticas pós-cirurgia e risco de infecção no animal (BONNER-WEIR; TRENT; WEIR, 1983; MÜLLER, 2014; SEO et al., 2009; VOGEL, 2008).

Além desses modelos supracitados há aqueles nos quais o diabetes é desenvolvido espontaneamente ou por alteração genética. Por exemplo, camundongos db/db desenvolvem hiperglicemia rapidamente, entretanto, o rato Goto-Kakizaki, que é um modelo diabético tipo 2 geneticamente magro, desenvolve hiperglicemia espontaneamente em comparação com ratos Wistar não diabéticos intolerantes à glicose. Os ratos *BioBreeding* (BB) podem desenvolver diabetes em 12 semanas, enquanto os camundongos diabéticos não-obesos (NOD) geralmente leva de 12 a 30 semanas para desenvolver hiperglicemia (PRAVENEK, 2010; RENNEN et al., 2010; VOGEL, 2008).

Outra forma de induzir o diabetes é por meio de vírus, baseado no fato de que o diabetes juvenil (Tipo 1) tem uma ligação com a infecção por estes micro-organismos, bem como uma condição autoimune em células β específicas. O vírus da encefalomiocardite, que é um cardiovírus da família *Picornaviridae*, destrói as células β pancreáticas. Essa hipótese foi confirmada em um estudo no qual os animais susceptíveis ao vírus se tornaram diabéticos e foram tratados com um potente imunossupressor denominado ciclosporina (GIRON et al., 1983; KATSAROU et al., 2017; YOON et al., 1980).

Os modelos *in vitro* podem ser recomendados para pesquisas específicas de mecanismos de ação, como também naquelas em estágios primários. No entanto, os modelos *in vivo* são recomendados para estudos cujos objetivos tratam de desenvolvimentos de fármacos, bem como para avaliação de perfis toxicológicos (HASAN et al., 2018).

3.1.1.7 Tratamento medicamentoso para o diabetes mellitus tipo 2

A maioria das drogas para tratar DM2, como insulina, metformina e sulfonilureias, tem como objetivo principal reduzir os níveis de glicose no sangue, mas até o momento, não conseguiram alterar o curso progressivo do DM2 ou reduzir adequadamente o risco de complicações tardias associadas ao diabetes mellitus (SRINIVASAN; FLOREZ, 2015). A metformina continua sendo a terapia de primeira escolha para pacientes com DM2, com exceção daqueles com insuficiência renal. A metformina reduz o débito hepático de glicose,

aumenta a sensibilidade do tecido periférico e estimula a secreção de GLP-1, porém causa distúrbios gastrointestinais (COBBLE; PETERS, 2009; DEFRONZO et al., 2016).

As sulfonilureias, como gliclazida e glimpirida, atuam nas células β para estimular a secreção de insulina, porém estão associadas à hipoglicemia e ao ganho de peso, além de doenças cardiovasculares (ABDELMONEIM et al., 2015; MONAMI et al., 2014). As meglitinidas (repaglinida, nateglinida) têm um mecanismo de ação semelhante às sulfonilureias, mas são menos eficazes (FUHLENDORFF et al., 1998; MIWA et al., 2004).

As tiazolidinedionas, também conhecidas como agonistas do PPAR γ , (rosiglitazona, pioglitazona) melhoram a sensibilidade à insulina em órgãos-alvo, entretanto o uso dessas drogas tem sido controverso, devido à toxicidade hepática (KOHLROSER et al., 2000). A rosiglitazona tem sido usada com pouca frequência devido a efeitos cardiovasculares adversos (MAHAFFEY et al., 2013). As terapias com incretinas incluem agonistas do receptor de GLP-1 injetáveis por via subcutânea e inibidores orais de DPP-IV, cujos efeitos referem-se à secreção aumentada de insulina e reduz a de glucagon, produção diminuída de glicose hepática, esvaziamento gástrico retardado e aumento da saciedade (NAUCK; MEIER, 2016). Os principais efeitos colaterais são náuseas e vômitos, sendo contraindicados em pacientes com história de pancreatite crônica ou câncer de pâncreas (BUTLER et al., 2013).

Os inibidores de SGLT-2 (dapagliflozina, canagliflozina, empagliflozina) são os mais recentes agentes redutores de glicose disponíveis. Esses fármacos aumentam a excreção urinária de glicose ao inibir o SGLT-2 no túbulo proximal renal (WILDING, 2014). O principal efeito colateral é a infecção do trato urinário ou genital, ambas mais comuns em mulheres (TAHRANI; BARNETT; BAILEY, 2013). A terapia com insulina é o tratamento mais eficaz para o controle glicêmico. No entanto, essa terapia está associada ao aumento do risco de hipoglicemia, especialmente em pessoas idosas, e um ganho de peso médio de quatro quilos (BARNETT, 2013). A baixa adesão à terapia com insulina está associada a fatores como risco e medo de desenvolver hipoglicemia ou ganho de peso, dificuldades práticas de auto aplicação da injeção e restrições de estilo de vida (DAVIES et al., 2013)

3.1.1.8 Plantas medicinais como alternativa terapêutica no tratamento do diabetes mellitus

A fitoterapia está envolvida na prevenção e/ou tratamento de inúmeras patologias, incluindo o DM, sendo uma alternativa frente ao alto custo dos fármacos sintéticos. Várias plantas têm sido alvo de estudos científicos afim de comprovar os seus efeitos terapêuticos na DM, sendo que várias apresentam potenciais propriedades hipoglicemiantes, devido aos seus

constituíntes químicos e que podem ser usados como modelos para novos fármacos antidiabéticos (BENT; KO, 2004; MARQUES et al., 2013; PATEL, et al., 2012; ZHANG, et al., 2012).

Rao et al. (2010) afirmaram que esses constituíntes químicos são compostos bioativos pertencentes às classes de polissacarídeos, terpenoides, flavonoides, esteroides e alcaloides e que atuam reduzindo a glicemia, como também impedindo a absorção da glicose no trato gastrointestinal, reduzindo assim a hiperglicemia pós-prandial. Referindo-se às plantas com efeitos benéficos no DM, destacam-se 81 espécies utilizadas no Brasil, membros de 42 famílias botânicas, com destaque para as famílias *Asteraceae*, *Myrtaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Cucurbitaceae*, *Asteraceae*, *Moraceae*, *Rosaceae*, *Euphorbiaceae* e *Araliaceae*. As espécies mais citadas para uso com diabetes no estudo realizado no Rio Grande do Sul foram *Syzygium cumini* (*Myrtaceae*), *Bauhinia forficata* (*Fabaceae*), *Sphagneticola trilobata* (*Asteraceae*), *Baccharis trimera* (*Asteraceae*), *Bidens pilosa* (*Asteraceae*), *Cynara scolymus* (*Asteraceae*) e *Leandra australis* (*Melastomataceae*) (PATEL, et al., 2012; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

Como citado acima, um número considerável de espécies de plantas é tradicionalmente utilizado para o tratamento do DM pela população, sendo necessários cada vez mais estudos fitoquímicos e pré-clínicos com tais espécies. Devido ao grande número de citações, a *Bauhinia forficata* merece atenção especial dos pesquisadores por ser um dos alvos promissores para o desenvolvimento de drogas antidiabéticas (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

3.2 *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*

3.2.1 Aspectos botânicos da *Bauhinia forficata* Link

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal citam-se as plantas do gênero *Bauhinia*, o qual foi assim denominado por Carolus Linnaeus, em 1753, em homenagem ao botânico franco-suíço Gaspar Bauhin. Compreende mais de 300 espécies amplamente distribuídas nas florestas tropicais e subtropicais, sendo que 64 destas podem ser encontradas no Brasil. Tais espécies pertencem à subfamília *Caesapinoideae* e à família *Fabaceae* e são comumente conhecidas como “pata de vaca” ou “unha de vaca” devido ao formato de suas folhas que são compostas de dois folíolos unidos na base (Figura 6) (VAZ; TOZZI, 2005).

As plantas desse gênero possuem porte arbóreo, arbustivo ou escandente (trepadeiras), folhas do tipo coriáceas (duras e rígidas como um couro), bifolioladas, isto é, apresentam dois

folíolos, frequentemente unidos e então denominada folha bifoliolada geminada e flores com um plano de simetria (zigomorfas) de coloração variada e fruto do tipo legume (FLORES; LORENZI; SOUZA, 2013).

As folhas da leguminosa *Bauhinia forficata* se assemelha muito com outras folhas de outras espécies do gênero *Bauhinia*, contudo sua principal característica morfológica é a presença de espinhos e flores exclusivamente brancas (Figura 6) (OLIVEIRA; SAITO, 1989). Apresenta dois espinhos no ramo onde fica aderido o pecíolo de cada folha, formando uma espécie de forca, dando origem ao nome.

A espécie subdivide-se em duas subespécies: *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* e *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* (Vogel) Fortunato & Wunderlin, que apresentam algumas pequenas diferenças morfológicas nas flores e nas folhas e em sua composição química. Essas subespécies, porém, têm áreas distintas de ocorrência: *B. forficata* subsp. *forficata* não ocorre no território gaúcho, enquanto *B. forficata* subsp. *pruinosa* concentra-se apenas nos estados da Região Sul e São Paulo (DOMINGOS; JÚNIOR, 2016)

Várias espécies de *Bauhinia* são usadas pela população como hipoglicemiante, mas somente a espécie *Bauhinia forficata* subespécie *forficata* tem esse efeito comprovado. As folhas também são consideradas diuréticas e hipocolesteremiantes, sendo utilizadas ainda contra cistites, parasitoses intestinais e elefantíase (NOGUEIRA; SABINO, 2012)

Figura 6 – Folhas (A) e flores (B) da *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.



Fonte: Autoria própria (2017).

3.2.2 Aspectos fitoquímicos da *Bauhinia forficata* Link

3.2.2.1 Compostos fenólicos

Os polifenóis são metabolitos secundários das plantas que atuam na defesa contra a radiação ultravioleta, oxidantes ou agressões de agentes patogênicos (BECKMAN, 2000). Mais de oito mil compostos fenólicos foram identificados em várias espécies de plantas, sendo que todos possuem um intermediário comum, a fenilalanina, ou um fim precursor, ácido chiquímico. Ocorrem, principalmente, em formas conjugadas, com um ou mais resíduos de açúcares ligados a grupos hidroxilas, embora ligações diretas de açúcares (polissacarídeo ou monossacárido) com um carbono aromático também podem ser encontradas, além de associação com outros compostos, como ácidos carboxílicos e orgânicos, aminas, lipídios e ligação com outros fenóis (KONDRATYUK; PEZZUTO, 2004).

Esses fitoquímicos constituem um grande grupo de biocompostos de materiais vegetais que são classificados em várias categorias com base no número de anéis fenóis e elementos estruturais que ligam esses anéis um ao outro, que incluem ácidos fenólicos e flavonoides (CARLONI et al., 2013; KOMES et al., 2010; PRICE; BACON; RHODES, 1997; SASIKALA et al., 2018). Os polifenóis podem ser encontrados, principalmente, nas folhas, nas frutas e em bebidas como suco de frutas, vinho, chá, café, chocolate, cerveja e, em menor quantidade, nos legumes e cereais. Os ácidos fenólicos representam cerca de um terço da ingestão total e os flavonoides representam os dois terços restantes. Os flavonoides mais abundantes na dieta são flavanóis (catequinas e proantocianidinas), antocianinas e seus produtos de oxidação (Figura 7) (HAN; SHEN; LOU, 2007).

Diversos estudos mostraram que o perfil fitoquímico da *B. forficata* é constituído principalmente por polifenóis, mais especificamente de flavonoides, que são os principais responsáveis pelo efeito antioxidante e outras propriedades farmacológicas dessa espécie vegetal (ADEROGBA et al., 2006, 2007; AHMED et al., 2012; DE SOUSA et al., 2004; MENEZES et al., 2007;).

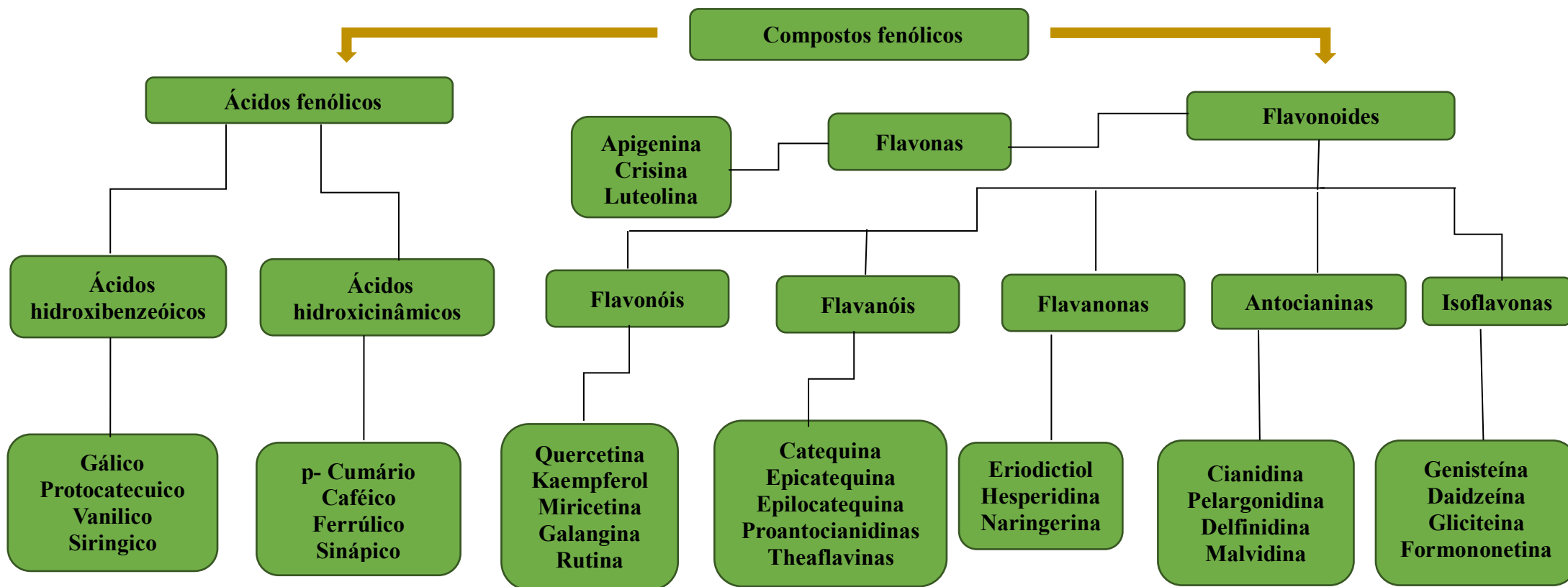
3.2.1.1 Flavonoides

Os flavonoides atuam como agentes de defesa para proteger as plantas do ataque de fontes bióticas e abióticas (KAMALEDDIN, 2016; KUMAR; PANDEY, 2013). De acordo com as substituições no anel heterocíclico, esses bioativos são classificados em flavonas, flavonóis,

flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides (Figura 7). Os derivados de flavonoides são comuns na natureza, e os tipos de derivação são diversos, incluindo glicosidação, prenilação, acetilação, metilação e polimerização. Essas diferenças nas características estruturais levam a alterações na bioatividade, no desempenho e no metabolismo *in vivo* desses compostos. Por exemplo, a glicosidação pode melhorar a hidrofiliabilidade e facilitar a absorção de flavonoides *in vivo* (YANG, et al., 2015; WEN, et al., 2017).

Esses compostos são os polifenóis mais abundantes nas dietas humanas e possuem diversos benefícios à saúde, sendo utilizados como nutracêuticos para fins medicinais, e, alguns com aplicação em suplementos dietéticos e fitoterápicos. Por isso, cada vez mais pesquisas nessa área têm sido desenvolvidas para se obter flavonoides naturais com novas estruturas e melhor atividade farmacológica (WEN et al., 2015).

Figura 7 - Fluxograma das classes de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes.



Fonte: Adaptada de Liu (2004) e Boroski et al. (2015).

Salatino et al. (1999) isolaram flavonoides das folhas de nove espécies de *Bauhinia* e constataram que todos os compostos correspondem a glicosídeos derivados de kaempferol, quercetina, isorannetina e miricetina, mas as posições relativas dos açúcares não puderam ser determinadas. Posteriormente, Pizzolatti et al. (2003) realizaram um estudo fitoquímico com extratos hidroalcoólicos das folhas e flores de *B. forficata*, no qual isolaram e identificaram o kaempferol e mais quatro flavonoides glicosilados.

Ferreres et al. (2012), em um estudo realizado como extrato hidroalcoólico das folhas de *B. forficata* Link identificaram, por meio da técnica de HPLC DAD ESI/MS, 13 flavonoides derivados de kaempferol-3-O e quercetina-3-O: quercetina-3-O-(2-ramnosil) rutinosídeo-7-O-triamosídeo; kaempferol-3-O-(2-ramnosil) glicosídeo-7-O-triamosídeo; kaempferol-3-O-(2-ramnosil) rutinosídeo-7-O-triamosídeo; quercetina-3-O-rutinosídeo-7-O-triamosídeo; kaempferol-3-(2/3/4-diramnosil) glicosídeo; kaempferol 3-O-(2-ramnosil) rutinosídeo+miricetina-3-O-arabinopiranosídeo; kaempferol-3-O-rutinosídeo-7-O-ramnosídeo; quercetina-3, 7-di-O-triamosídeo+quercetina-3-O-rutinosídeo; kaempferol-3-robinosídeo; kaempferol-3,7-di-O-ramnosídeo; kaempferol-3-O-rutinosídeo e kaempferol-3-O-ramnosídeo.

Farag et al. (2015) estudaram o perfil fitoquímico e as propriedades biológicas de oito espécies de *Bauhinia*. Referindo-se à *B. forficata*, identificaram por meio do UHPLC-MS os flavonoides quercetina-3-O-ramnosil rutinosídeo, kaempferol-3-O-ramnosil rutinosídeo e isoramnetina-3-O-ramnosil-rutinosídeo, sendo estes exclusivos desta espécie vegetal. A kaempferitrina (kaempferol-3,7-O-a-diramnosídeo), a qual já foi relatada como um dos principais glicosídeos de flavonóis isolado exclusivamente de folhas de *B. forficata* (DE SOUSA et al., 2004; FERRERES et al., 2012; PIZZOLATTI et al., 2003), não foi detectado nesse estudo, apenas seu isômero estrutural, o kaempferol-3-O- di ramnosídeo. Além desses compostos, identificou-se também o ácido 2-benziltartárico e rutina.

Salgueiro et al. (2016) avaliaram os efeitos do chá das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* (Vogel) Fortunato & Wunderlin sobre o estresse oxidativo e danos no fígado em ratos diabéticos e constataram que a infusão dessa planta é antioxidante, devido à presença da quercetina-3-O-(2-ramnosil) rutinosídeo, kaempferol-3-O-(2-ramnosil) rutinosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo e kaempferol-3-O-rutinosídeo, confirmando mais uma vez que o kaempferol-3,7-O-a-diramnosídeo (kaempferitrina) é exclusivo da *B. forficata* Link subsp. *forficata*, e que contribui para explicar a atividade hipoglicemiante agregada a esta espécie (DE SOUSA et al., 2004; ENGEL et al., 2008; FERRERES et al., 2012; PIZZOLATTI et al., 2003).

3.2.3 Biodisponibilidade de compostos fenólicos presentes nas folhas de *Bauhinia forficata*

Link

A biodisponibilidade é um dos principais aspectos que condicionam os efeitos benéficos dos polifenóis, sendo definida como a quantidade do nutriente que é digerido, absorvido e metabolizado pelas vias normais. A bioacessibilidade também deve ser considerada em estudos relacionados à biodisponibilidade desses bioativos e é definida como a quantidade ou fração que é liberada da matriz alimentar no trato gastrointestinal e torna-se disponível para absorção, assegurando a eficácia nutricional dos produtos alimentares (HEANEY, 2001; SAURACALIXTO; SERRANO; GONI, 2007).

A biodisponibilidade destes compostos bioativos depende da preparação de alimentos, das interações entre os fenólicos de diferentes fontes, da digestão gastrointestinal, absorção e metabolismo (PORRINI; RISO, 2008; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; SCHOLZ, 2007). A maioria dos polifenóis estão presentes nos alimentos na forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros que não podem ser absorvidos na forma nativa (D'ARCHIVIO et al., 2010).

As agliconas podem ser absorvidas pelo intestino delgado, porém, antes da absorção, estes compostos devem ser hidrolisados por enzimas intestinais ou pela microbiota colônica. Após a absorção pelas células intestinais, os polifenóis são modificados no fígado, sofrem um processo de conjugação que pode ser metilação, sulfatação e glicuronidação, como consequência, as formas que atingem o sangue e os tecidos são diferentes daquelas presentes nos alimentos (DAY; WILLIAMSON, 2001).

A quantidade de polifenóis nos tecidos é o mais importante, pois são esses que serão biologicamente ativos para exercer os efeitos benéficos no organismo. Vários estudos mostraram que os polifenóis como procianidinas, quercetina e flavanóis são rapidamente absorvidos, com concentrações plasmáticas a cada 2 ou 3 horas após ingestão. A excreção de polifenóis e de seus derivados ocorrem através da urina e da bile. Observou-se que os metabólitos mais conjugados são eliminados junto com a bile, enquanto os menos conjugados, são preferencialmente excretados na urina (Figura 8). Assim, os efeitos benéficos dos polifenóis para a saúde dependem tanto da ingestão, quanto da biodisponibilidade (BAHADORAN; MIRMIRAN; AZIZI, 2013; D'ARCHIVIO et al., 2010; MANACH et al., 2004; PANDEY; RIZVI, 2009).

3.2.3.1 Biodisponibilidade de flavonoides

A estrutura química é um dos principais fatores que influenciam a biodisponibilidade de flavonoides. A mucosa intestinal e o fígado são os principais locais de biotransformação. Após a administração oral, a maioria dos flavonoides está na forma de glicosídeos. O primeiro passo para entrar na circulação sistêmica pode ser a desglicosilação através da absorção ativa pelo transportador de glicose dependente de sódio (SGLT1), seguida pela hidrólise luminal pela lactase florizina hidrolase (LPH) com subsequente absorção passiva de agliconas liberadas (DAS et al., 2014).

O padrão de desglicosilação depende da natureza da aglicona e do açúcar conjugado ao flavonoide. As agliconas são mais biodisponíveis do que os glicosídeos por interagir melhor com a membrana e os O-glicosídeos e C-glicosídeos são mais resistentes à hidrólise (BUQUI et al., 2015). Após a desglicosilação, o metabolismo da fase 2 geralmente ocorre continuamente nas células epiteliais do intestino delgado. Em seguida, ocorre excreção biliar ou ciclo entero-hepático no cólon. As agliconas são assim liberadas e absorvidas no intestino grosso ou sofrem nova degradação. Uma das enzimas metabólicas favoráveis da fase 2, a catecol-O-metiltransferase catalisa os flavonoides com a porção catecol no anel B (WANG; LI; BI, 2018).

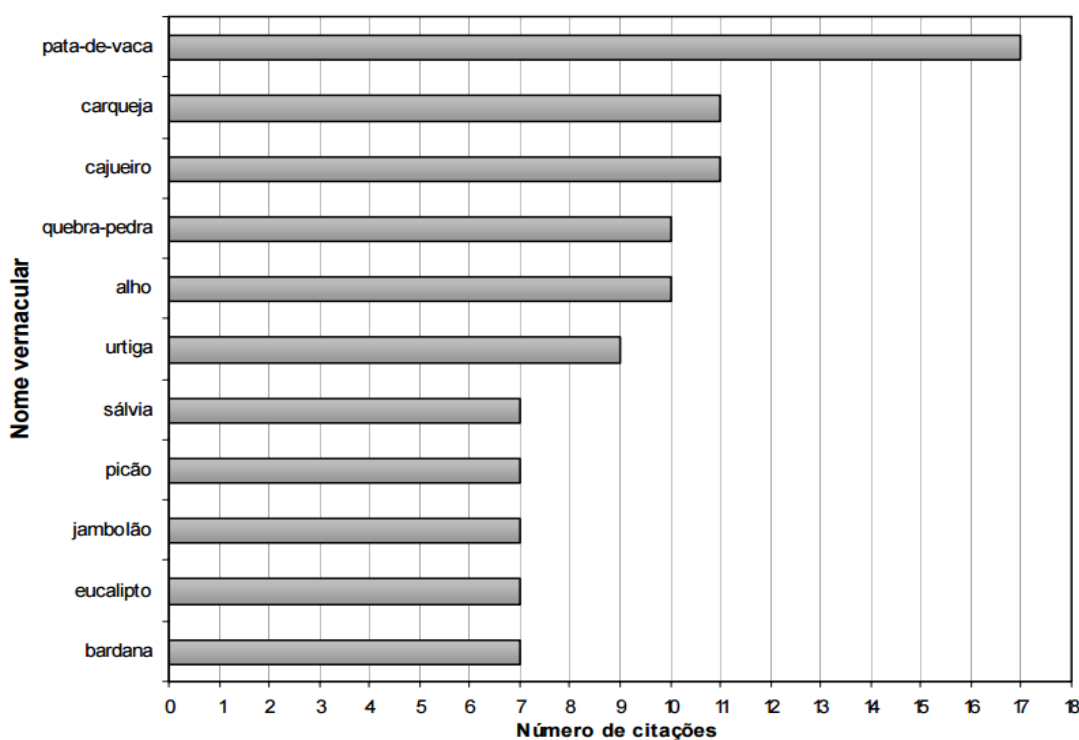
Geralmente, os flavonoides metilados existem predominantemente na forma de metabólitos metil-3' ao invés de 4'-metil e tanto a absorção como a excreção desses flavonoides são relativamente lentas, melhorando a biodisponibilidade, devido aos efeitos protetores retardados do metabolismo hepático, aumentando a permeabilidade através da membrana (SURICHAN et al., 2012; WEI; HWANG; TSAI, 2014). Referindo-se aos flavonoides com grupos hidroxila, estes são mais vulneráveis à conjugação. Em um estudo farmacocinético com a quercetina, kaempferol e isorhamnetina, confirmou que esse último, por ser um flavonoide metilado teve o processo de absorção mais lento que os dois bioativos com grupo hidroxila (CHEN et al., 2010).

3.2.4 *Bauhinia forficata* Link no tratamento do diabetes mellitus

Um estudo feito por Borges, Bautista e Guilera (2008) verificou que de um pequeno grupo formado por cerca de 11 táxons amplamente reconhecidos pelas suas propriedades terapêuticas hipoglicemiantes, a *Bauhinia forficata* Link foi a planta mais citada (Figura 9). Trojan-Rodrigues et al. (2012), em estudo etnobotânico, também constataram que *B. forficata* (pata - de - vaca) destacou-se dentre as plantas mencionadas popularmente para tratar diabetes

mellitus no Estado do Rio Grande do Sul, além de ser uma das plantas medicinais mais comercializadas no Brasil (FRANCO et al., 2011). Tais pesquisas garantem respaldo para a realização de mais estudos com essa espécie vegetal que possam subsidiar a sua aplicação no desenvolvimento de novos fármacos, além de garantir a segurança e a eficácia do seu consumo devido às suas propriedades antidiabéticas.

Figura 9 - Números de citações das espécies na bibliografia consultada



Fonte: Adaptada de Borges, Bautista e Guilera (2008).

Os primeiros estudos sobre a atividade hipoglicemiante com as folhas de *B. forficata* foi realizado por Juliani em 1929 e 1931 e demonstrou efeito positivo em pacientes diabéticos, despertando grande interesse dos pesquisadores com a finalidade de comprovar suas propriedades farmacológicas, como uma nova opção terapêutica para tratamento de diabetes (LIMA, 2009; MARQUES et al., 2013).

Silva et al. (2002) estudaram a fração n-butanol do extrato hidroalcoólico das folhas de *B. forficata*, verificando a ação hipoglicemiante em ratos normais e diabéticos induzidos por aloxana. Como este efeito foi encontrado também nos ratos normais, foi inferido que um dos possíveis mecanismos de ação é pelo atraso do catabolismo da insulina ou da inibição da reabsorção da glicose pelos rins. De Sousa et al. (2004) também evidenciaram ação

hipoglicemiante em ratos normais e diabéticos, tratado com um composto flavonoide isolado das folhas da *B. forficata*, a kaempferitrina.

Outro estudo, em ratos, com o mesmo método de indução de diabetes, avaliou a atividade antidiabética de extratos aquoso, etanólico e hexânico administrados diariamente durante sete dias, em doses de 200 e 400 mg/kg, via oral. Pôde-se verificar redução da glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL, sugerindo a validade da utilização clínica de *B. forficata* no tratamento do DM2 (LINO et al, 2004).

Moraes et al (2010) constataram redução significativa da glicemia de jejum no grupo de pacientes diabéticos que receberam infusão das folhas de *B. forficata* durante 75 dias, quando comparada ao grupo de diabéticos que não fizeram uso do chá (MORAES et al., 2010). Diversos estudos também confirmaram essa atividade, nos quais testaram extrato aquoso e hidroalcoólico das folhas de *B. forficata* em modelos animais normoglicêmicos e diabéticos induzidos, obtendo-se resultados satisfatórios com relação à redução da glicemia (DA CUNHA et al., 2010; MENEZES et al., 2007; PEPATO et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2004).

Os flavonoides são os principais responsáveis pela ação hipoglicemiante das folhas das *B. forficata* por serem seus constituintes majoritários. No entanto, ainda há uma lacuna e controvérsias com relação ao mecanismo de ação pelo qual estes compostos agem (DA CUNHA et al. 2010; LINO et al. 2004). Embora a maioria dos estudos comprove ação redutora da glicemia do extrato de *B. forficata*, alguns trabalhos apresentam resultados discordantes, o que pode ser explicado por diversos fatores como: o protocolo experimental utilizado, a metodologia de obtenção dos extratos, condições ambientais, sazonais e de colheita da planta, além do cultivo e armazenamento da mesma, que podem influenciar qualitativamente e quantitativamente na presença dos compostos bioativos que atuam na ação farmacológica (MARQUES et al., 2012; PEPATO et al., 2010; SILVA et al. 2002).

Em um estudo recente sobre a utilização as folhas da *B. forficata* no tratamento do DM, De Souza et al. (2018), analisaram-se patentes sobre diferentes produtos desenvolvidos à base dessa planta e constataram que os produtos fitoterápicos desenvolvidos possuem diversas vantagens, quando comparados aos fármacos hipoglicemiantes sintéticos, pois controlam a glicemia sem causar efeitos adversos, além de apresentarem outras propriedades funcionais biológicas, como atividade antioxidante, hipotensoras, hipocolesterolêmicas, anticoagulantes e anti-inflamatórias, melhorando a qualidade de vida dos pacientes acometidos por esta patologia.

3.2.4.1 Kaempferol

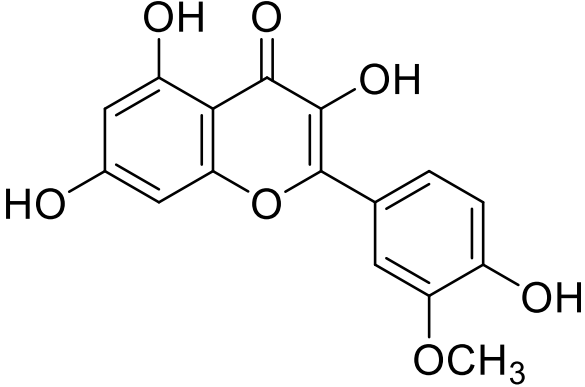
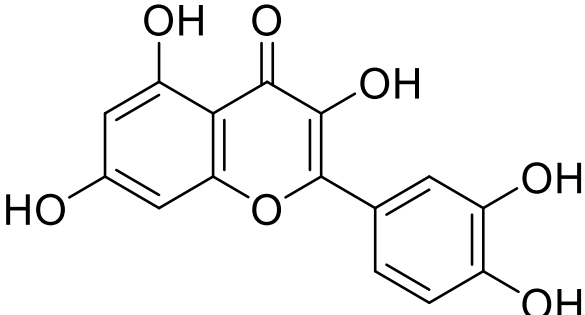
Jorge et al. (2004) isolaram o kaempferol das folhas de *B. forficata* para administrá-lo em ratos e constataram que este bioativo reduziu o nível de glicose sérica e aumentou a captação de glicose pelos tecidos de forma semelhante à insulina. Zhang e Liu (2011) realizaram um estudo *in vitro* e verificaram que o tratamento com kaempferol promoveu viabilidade, inibiu a apoptose celular e reduziu a atividade da caspase-3 em células β pancreáticas em condição hiperglicêmica, cujos efeitos protetores estão associados à melhor sinalização de AMPc, à expressão de proteínas Akt e Bcl-2 anti-apoptóticas, à secreção e síntese de insulina pelas células β , como também pelas vias PI3K e PKC e, pelo menos em parte, independentemente das vias MEK e da síntese de novos transportadores de glicose (AL-NUMAIR et al., 2015).

Abo-Salem (2014) confirmou que o kaempferol, administrado por via oral, reduziu a IL-1 β , o TNF- α , a peroxidação lipídica e o nitrito, concomitante à melhora da defesa antioxidante e do ganho de peso corporal. Além de reduzir significativamente a glicemia em jejum, os níveis séricos de HbA1c e melhorar a resistência à insulina. A análise da expressão gênica do fígado mostrou que o kaempferol diminuía a expressão de PPAR- γ e SREBP-1c. Os efeitos anti-obesidade e antidiabéticos do kaempferol são mediados pela regulação do SREBP-1c e do PPAR- γ através da ativação da AMPK (ZANG et al., 2015).

3.2.4.2 Quercetina

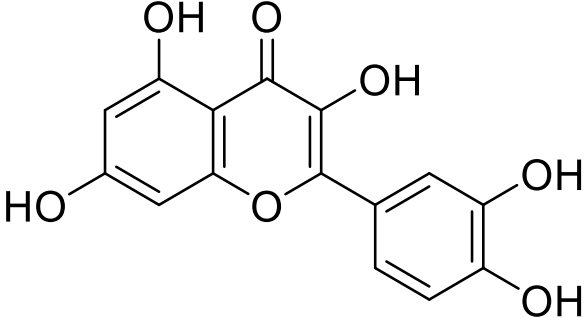
O efeito da quercetina foi avaliado em células intestinais Caco-2E, nas quais foram verificadas que o transporte de frutose e glicose por GLUT2 foi inibido por este flavonoide, inferindo outro mecanismo pelo qual a quercetina age no DM2 pelo bloqueio da tirosina quinase (KWON et al., 2007). Eid et al. (2015) relataram que a quercetina estimula a translocação e expressão de GLUT4 no músculo esquelético, por mecanismos associados à ativação de AMPK, ao invés de vias dependentes de insulina, como Akt. A quercetina melhorou a expressão de marcadores de estresse oxidativo e inflamação, como Nrf2, heme oxigenase-1 e NF-kB em ratos, sugerindo que os seus efeitos anti-inflamatórios, no tecido adiposo, reduzem o peso corporal (KOBORI et al., 2009; PANCHAL; POUDYAL; BROWN, 2012).

Quadro 3 - Principais flavonoides presentes nas folhas de *Bauhinia forficata* Link com ação hipoglicemiante.

Estrutura do(s) flavonoide(s)	Mecanismo de ação específico	Modelo	Referências
<p>Kaempferol</p> 	Inibe a apoptose celular e reduz a atividade de caspase-3 em células β	Células β INS-1E	Zhang et al. (2011)
	↑ Antioxidante e ↓ diminuição da peroxidação lipídica	Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina	Al-Numair et al. (2015)
	Restaura a atividade alterada das ATPases ligadas à membrana	Diabetes induzida por estreptozotocina	Al-Numair et al. (2015)
	↑ a sobrevivência das células β , melhora da sinalização de cAMP	Células INS-1E	Zhang et al. (2013)
	↑ GLUT 4, AMPK	Camundongos diabéticos induzidos por dieta hiperlipídica	Alkhalidy et al. (2015)
<p>Quercetina</p> 	↑ a atividade da glicogênio sintase	H4IIE murina e células HepG2 humanas	Eid et al. (2015)
	Inibe dois fatores transcripcionais e ativação de mTORC1 / p70S6K	Células HK-2 e NRK-52E	Lu et al. (2015)
	Inibe a expressão de NF-kB e caspase-3	Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina	Kumar et al. (2014)
	Melhora a hiperglicemia e o estresse oxidativo	Camundongos diabéticos tipo 2 induzidos por aloxana	Alam; Meerza; Naseem (2014)

Quadro 3 - Principais flavonoides presentes nas folhas de *Bauhinia forficata* Link com ação hipoglicemiante.

(continuação)

Estrutura do(s) flavonoide(s)	Mecanismo de ação específico	Modelo	Referências
<p>Quercetina</p> 	Inibe a morte das células β através da via mitocondrial e sinalização de NF- κ B	Células β RINm5F	Dai et al. (2013)
	Reduz TBARS, CT e aumenta a atividade de SOD, CAT e GSH-Px e HDL-colesterol	Ratos Diet-C57BL / KsJ-db / db	Jeong et al. (2012)
	Melhoria da função renal em ratos com nefropatia diabética, inibindo as superexpressões de TGF- β 1 e CTGF	Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina	Lai, Zhang, Yang (2012)
	↓ Glicose e sangue HbA1c	Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina	Kim et al. (2011)

Fonte: Adaptado de Vinayagam, Xu (2015).

Portanto, baseado nas diversas linhas de evidências científicas sobre os efeitos benéficos dessa planta no DM2 associado a importância de se obter produtos secos de extratos de plantas com propriedades adequadas para possíveis formulações fitoterápicas, a espécie *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* foi selecionada para este estudo. É importante ressaltar que de todos os estudos encontrados na literatura com esta planta nenhum foi realizado visando a obtenção, caracterização e avaliação da atividade biológica de extratos secos obtidos a partir da fração aquosa das folhas pelo método de secagem em *spray drying*.

3.3 Microencapsulação por *spray drying*

O extrato consiste numa preparação com consistência líquida, sólida ou intermediária proveniente de origem vegetal ou animal, que podem ser obtidos utilizando diferentes solventes e técnicas de preparo (BRASIL, 2011; ISAAC et al., 2008). Dentre os principais solventes para a extração de ativos tem-se a água, o álcool etílico e metílico, hexano, acetato de etila, clorofórmio, éter de petróleo. Também é comum a mistura de solventes como a solução etanólica a 70% e mistura com clorofórmio e éter. A escolha dos solventes será de acordo com princípios ativos a serem extraídos, adequação tecnológica ao método e inocuidade fisiológica (NEGRI; DUARTE-ALMEIDA, 2011).

Outro aspecto diz respeito à técnica utilizada para obtenção do extrato que, no caso dos extratos líquidos, podem ser: infusão, na qual o material vegetal é posto em contato com água fervente em recipiente fechado por alguns minutos, sendo geralmente aplicada às partes moles do vegetal ou rica em óleos essenciais e compostos voláteis; a decocção que consiste em submeter o material em contato com água em ebulição durante um curto período de tempo e pode ser aplicada às partes duras do vegetal como cascas e raízes; maceração, na qual o material vegetal fica em contato com o solvente durante um longo período, sem a renovação do líquido extrator; a percolação que é semelhante à maceração, porém com uma renovação constante do líquido extrator, objetivando o esgotamento da droga vegetal (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010).

Os extratos líquidos, entretanto, apresentam sérios problemas relacionados à estabilidade, contaminação microbiológica e padronização, acarretados principalmente pela presença de solventes. Uma possível alternativa é a retirada parcial ou total desses solventes produzindo extratos secos, que são preparações provenientes da evaporação dos solventes em extratos líquidos, utilizando ou não adjuvantes de secagem. Estes extratos secos são mais estáveis, tanto nos aspectos químicos quanto microbiológicos, o que facilita a padronização

para aplicação em formas farmacêuticas (SILVA et al., 2012; SOUZA; MELLO; LOPES, 2011).

A secagem por *spray drying* é a mais utilizada para extratos vegetais e consiste na atomização de finas gotículas frente a uma corrente de ar quente. É utilizado também na secagem de soluções, suspensões, emulsões, dentre outras. Visando obter melhores características tecnológicas, é comum o uso de adjuvantes de secagem ou agentes encapsulantes como o dióxido de silício coloidal, maltodextrina e amido pré-gelatinizado (SILVA et al., 2012; SOUZA; MELLO; LOPES, 2011). Esta técnica de secagem por atomização possui diversas vantagens em relação às outras com o mesmo objetivo, devido ao tempo reduzido no qual o material fica em contato com o calor, alta taxa de evaporação, resultando em produtos de alta qualidade, com o teor de umidade estável (SILVA et al., 2012).

A utilização da técnica de secagem por *spray drying* teve seu início em 1865, com a primeira patente de operação de secagem de ovos. Entretanto, em escala industrial, esta técnica só foi utilizada na década de 20, em leite e sabão em pó. Esse tipo de secagem tem como uma das vantagens a obtenção dos produtos diretamente na forma de pó, eliminando as etapas posteriores de moagem que são típicas de outros equipamentos de secagem (FILKOVA; MUJUMDAR, 1995). Esse processo de secagem por aspensão consiste de três etapas fundamentais. Na primeira fase, o fluido é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial. Na segunda, ocorre contato destas com uma corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor. Na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

A secagem por pulverização é utilizada também para o encapsulamento de compostos bioativos, que geralmente são sensíveis ao calor, pois o processo de secagem é muito rápido e o núcleo é aquecido a temperaturas geralmente muito inferiores a 100 °C. Como os polifenóis são um grupo de fitoquímicos sensíveis ao processamento térmico, a secagem por atomização pode ter o potencial de encapsular esses compostos, preservando sua bioatividade. Esta técnica tem sido usada com sucesso para o encapsulamento de vários materiais ricos em polifenóis, incluindo extrato de cenoura preta, extrato de *Hibiscus sabdariffa* L., óleo bruto a partir das sementes de *Nigella sativa*, óleo essencial de *Peumus boldus*, extrato de soja, extrato de semente de uva, maçã, folha de oliveira, polifenóis, procianidinas (CHIOU; LANGRISH, 2007; EDRIS et al., 2016; GEORGETTI et al., 2008; GIRARDI et al., 2018; KOSARAJU et al., 2008; ZHANG; MOU; DU, 2007).

Figura 10 - Formação de partículas por *spray drying*.

Fonte: Adaptada de Cao et al., (2000) e Oliveira; Petrovick (2010).

3.4 Caracterização dos extratos secos microencapsulados das folhas de *Bauhinia forficata*

Link

Vários métodos analíticos são utilizados para caracterizar extratos secos vegetais para possíveis aplicações em fórmulas farmacêuticas, como caracterização fitoquímica, e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia de infravermelho com transformador de Fourier (IV-TF), difração de raios X (DRX), análise termogravimétrica (TG), análise térmica diferencial (DTA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) microscopia eletrônica de varredura (MEV) (CHADHA; BHANDARI, 2014).

A IV-TF é sensível à estrutura e ao ambiente dos compostos orgânicos e não mostra somente o comportamento do estado sólido dos extratos secos e de suas formulações, como também podem ser usadas como ferramenta de triagem de compatibilidade, já que as mudanças vibracionais servem como uma sonda de possíveis interações intermoleculares entre os componentes. Assim, interações farmacêuticas que resultam em dessalinização, formação de hidrato, desidratação, mudanças polimórficas ou transformação de formas cristalinas a amorfas

e vice-versa, durante o processamento, podem ser facilmente detectadas com o auxílio dessa técnica (BLANCO et al., 2006).

A caracterização dos princípios ativos pode ser conduzida, basicamente, de duas formas: qualitativa e quantitativa. A caracterização qualitativa (ou *screening* fitoquímico) é feita a partir de reações químicas (reações de caracterização) que produzem uma mudança de coloração e/ou precipitação, sugerindo a presença de determinados grupos de metabolitos. A reação com cloreto férrico a 2,0%, por exemplo, indica a presença de grupos com hidroxilas fenólicas, obtendo uma coloração violeta. Contudo este método pode apresentar interferência, como a elevada concentração de flavonoides (CARLINI; MENDES, 2001).

A difração de raios X (DRX) é outra técnica de grande aplicação nos estudos de compatibilidade. De uma forma geral, a técnica consiste na emissão de raios X sendo que, através da Lei de Bregg, é possível a determinação da estrutura cristalográfica de um sólido a partir dos raios refletidos expressos em picos. Em um sólido cristalino, as moléculas se organizam em células unitárias e produzem uma “impressão digital” com seus picos. Já, em um sólido amorfo como não ocorre esse arranjo, o difratograma apresenta-se com uma “auréola amorfa” (DONG; BOYD, 2011).

A análise térmica compreende um conjunto de técnicas, nas quais uma propriedade física de uma substância é avaliada em função da temperatura e/ou tempo, na medida em que esta mesma substância é submetida a um programa controlado de temperatura, visando a caracterização de fármacos, pureza, compatibilidade, estabilidade, polimorfismo dentre outros. As técnicas mais utilizadas são a termogravimetria, análise térmica diferencial e a calorimetria exploratória diferencial (OLIVEIRA et al., 2011). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é outra técnica relevante para avaliação dos extratos secos por *spray drying*, pois mostram os aspectos morfológicos bem como o tamanho de partícula, distribuição granulométrica e possíveis interações quando associado a outras técnicas (CHADHA; BHANDARI, 2014; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

A avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais é importante para se correlacionar com os bioativos e suas atividades biológicas, como a antidiabética e hipoglicemiante da *B. forficata*, que pode ser verificada por vários ensaios. O conceito de capacidade antioxidante é originado da química e depois foi adaptado para biologia, medicina, epidemiologia e nutrição (CAO; PRIOR, 1998; FLOEGEL et al., 2010). Este conceito descreve a habilidade que moléculas redox possuem no sequestro de radicais livres em alimentos e sistemas biológicos como também considera os efeitos aditivos e sinérgicos de todos os

antioxidantes ao invés de cada ação do antioxidante individual, sendo útil para estudar os potenciais benefícios de antioxidantes à saúde (PUCHAU et al., 2010).

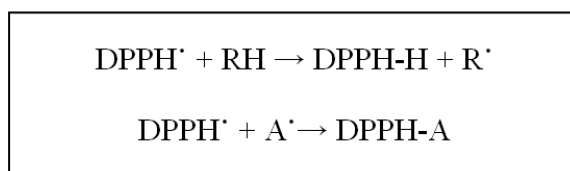
Os antioxidantes podem exercer sua atividade por diferentes mecanismos, por isso é importante combinar vários métodos. Além do fato de que, em uma mesma amostra, pode haver misturas de diferentes antioxidantes com variados mecanismos de ação, ocorrendo reações sinérgicas. Muitos ensaios empregam o mesmo princípio, no qual um radical colorido sintético ou um composto ativo redox é gerado e a capacidade de uma amostra para sequestrar o radical ou para reduzir o composto ativo redox é monitorada por espectrofotometria, utilizando um padrão apropriado para quantificar a atividade antioxidante, como exemplo, Trolox ou vitamina C (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

Os métodos antioxidantes podem ser classificados em dois tipos de ensaios: baseado na transferência de elétrons e envolve a redução de um oxidante colorido, como por exemplo nos ensaios ABTS, DPPH e FRAP e o ensaio que envolve a transferência de um átomo de hidrogênio como o ensaio ORAC. Neste ensaio, antioxidantes e substrato competem por radicais peróxil gerados termicamente (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010).

O ensaio da atividade sequestrante do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) foi primeiramente descrito por Blois (1958) e foi posteriormente modificado por inúmeros pesquisadores. É um dos ensaios para antioxidantes mais usados para amostras de plantas. O radical livre DPPH é muito estável devido à deslocalização de um elétron livre ao longo de toda a molécula. Reage com compostos que podem doar átomos de hidrogênio e tem um máximo de absorção UV/vis em 515 nm (HUANG; OU; PRIOR, 2005; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

O método baseia-se na redução do radical DPPH (roxo) na sua hidrazina (amarelo) correspondente, através de sua reação com doadores de hidrogênio (RH), ou mesmo outros radicais (A[•]). O mecanismo de reação química do ensaio DPPH é baseado principalmente nas reações de transferência de um elétron e a abstração do átomo de hidrogênio é uma reação marginal (Figura 11) (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

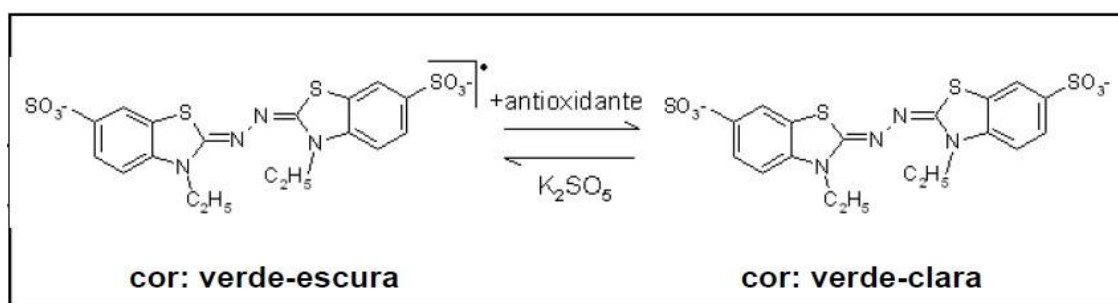
Figura 11 - Possíveis reações com o radical DPPH.



Fonte: Rufino et al. (2007a).

O método do sequestro do radical ABTS foi desenvolvido por Rice-Evans e Miller (1994) e posteriormente foi modificado por Re et al. (1999). Este método refere-se ao uso de um radical pré-formado ABTS, sendo amplamente utilizado para medir a capacidade sequestrante total do radical. É gerado um cromóforo verde/azulado $ABTS^{\bullet+}$ através da reação do ABTS e persulfato de potássio. O cátion radical ABTS é gerado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio (Figura 12).

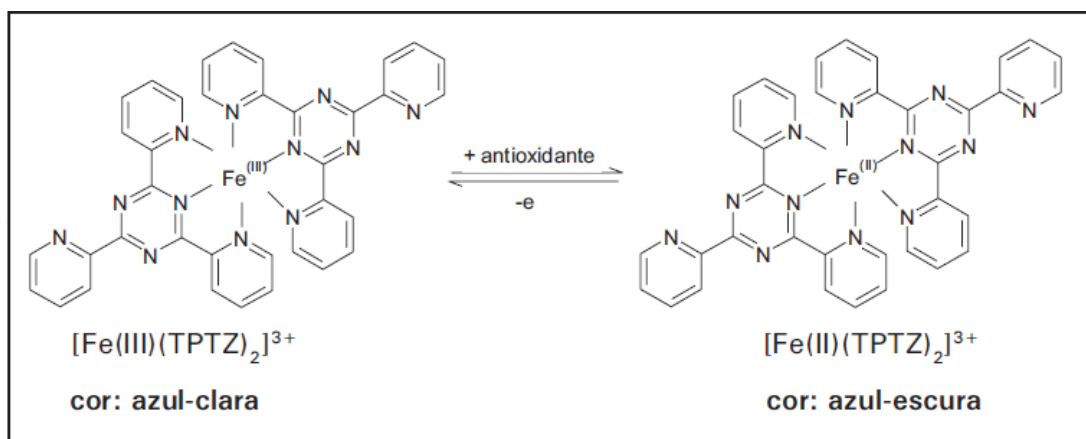
Figura 12 - Estabilização do radical $ABTS^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio de potássio.



Fonte: Rufino et al. (2007b).

O ensaio Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP) foi inicialmente descrito por Benzie e Strain (1996) para medir o poder redutor no plasma e, posteriormente, adaptado e modificado por Pulido, Bravo, Saura-Calixto (2000) e Rufino et al. (2006) para avaliar o poder antioxidante de extratos vegetais em sua habilidade de reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+} . O ensaio baseia-se em reações de transferência de elétrons, em que um sal férrico, ferricianeto de potássio é usado como um oxidante. O mecanismo de reação envolve a redução do complexo férrico 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para a forma ferrosa (Figura 13).

Figura 13 - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+}

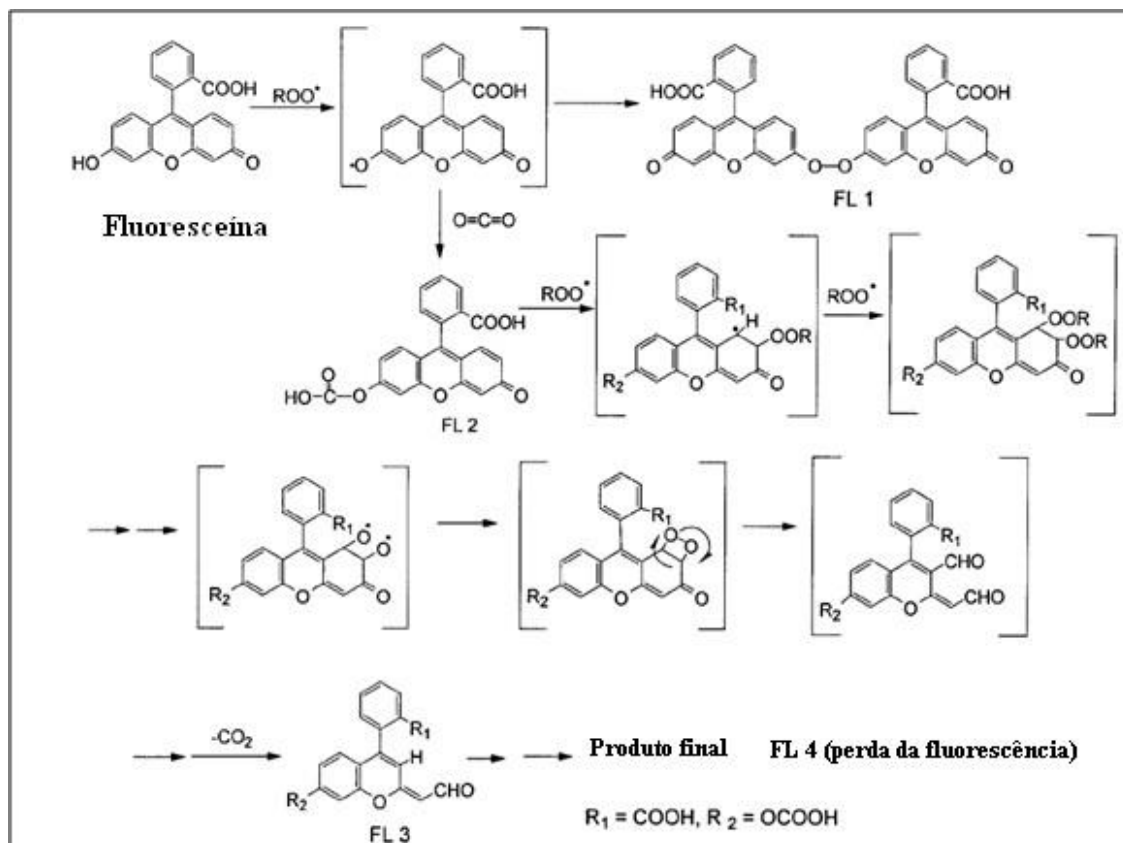


Fonte: Rufino et al. (2006).

O método Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC) mede a capacidade de captura do radical peróxido, gerado a partir de uma molécula orgânica 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) diidroclorido (AAPH). Os radicais atacam a molécula de fluoresceína que, oxidada não emite fluorescência, produzindo, portanto, um decréscimo na mesma (longitude de onda de excitação a 493 nm e de emissão a 515 nm). Na presença dos antioxidantes, a reação do radical peróxido com a fluoresceína fará com que esta mantenha a mesma emissão de fluorescência. Dessa forma, pode-se comparar o decréscimo da fluorescência produzida na presença e na ausência de um antioxidante (RUFINO, 2008).

Até o momento, é o único método que conduz a reação de radicais livres até o término e usa a técnica de área sob a curva (AUC) para quantificação, combinando, assim, tanto o percentual de inibição e a duração do tempo de inibição da ação do radical livre pelo antioxidante em uma única medição, enquanto os demais métodos usam uma porcentagem de inibição a um tempo fixo (Figura 14) (RUFINO, 2008).

Figura 14 - Exemplo de um processo da oxidação da fluoresceína na presença de 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) di-hidroclorido (AAPH).



Fonte: Rufino (2008).

Existem poucas informações na literatura sobre estudos da capacidade antioxidante envolvendo extratos secos de plantas em *spray drying* através dos ensaios FRAP e ORAC. Portanto é plenamente justificável a obtenção desses dados para a ampliação do conhecimento da influência do processo de secagem nas atividades biológicas de extratos secos vegetais.

Outra caracterização relevante para extratos secos vegetais com finalidade terapêutica é a avaliação toxicológica. Existem vários ensaios com esta finalidade, em diferentes sistemas biológicos regulamentados pela Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (OECD) (FIELDEN; KOLAJA, 2008; PARASURAMAN, 2011). Entre eles, destacam-se, o teste de toxicidade aguda, no qual é realizado para determinar o efeito de dose única de um produto em uma determinada espécie animal, preferencialmente roedores. A substância investigada é administrada em dose única e o efeito é observado durante 14 dias. Todas as mortes constatadas, durante o período experimental, são registradas como também os parâmetros bioquímicos e histopatológicos dos animais, após a eutanásia, são investigados.

Esse teste permite ainda determinar a dose letal 50% do produto em investigação (DORATO; BUCKLEY, 2006; OECD, 2002).

Outro estudo importante é o teste de toxicidade de dose repetida, realizado por um período mínimo de 28 dias, no qual a substância testada é administrada, diariamente, por via oral. Normalmente, utilizam-se roedores de qualquer gênero e idade entre 5-6 semanas. Nesse estudo, também as mortes durante o período do tratamento são registradas e, após a eutanásia, analisam-se os parâmetros bioquímicos e histopatológicos dos animais (HUGHES et al., 2011; OECD, 2008).

Rusyn et al. (2010) relataram que a toxicogenética é um importante parâmetro para avaliar as alterações estáveis e/ou hereditárias no genoma, que são capazes de influenciar a susceptibilidade relativa de um indivíduo (ou grupo de indivíduos) aos efeitos adversos à saúde resultantes da exposição a um produto ou fármaco. O ensaio cometa é uma ferramenta útil, na avaliação toxicogenética, em pesquisas sobre o desenvolvimento de novas drogas, sendo um dos testes especiais da OECD nº489 (OECD, 2014). Este teste que avalia danos no DNA, mostra que este quando não fragmentado mantém uma estrutura bem organizada no núcleo celular, porém ao sofrer danos, esta organização é interrompida (COLLINS, 2004). É um procedimento simples e relativamente barato, que detecta diversos danos ao DNA de células eucarióticas individuais, incluindo quebras de fitas simples e duplas, além de verificar também capacidade de reparo destes danos (SASAKI et al., 2000; AZQUETA et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- ABDELMONEIM, A. S.; EURICH, D. T.; LIGHT, P. E.; SENIOR, P. A.; SEUBERT, J. M.; MAKOWSKY, M. J.; SIMPSON, S. H. Cardiovascular safety of sulphonylureas: over 40 years of continuous controversy without an answer. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 17, n. 6, p. 523-532, 2015.
- ABO-SALEM, O. M. Kaempferol attenuates the development of diabetic neuropathic pain in mice: Possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. **Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 424-430, 2014.
- ADEROGBA, M. A.; OGUNDAINI, A. O.; ELOFF, J. N. Isolation of two flavonoids from *Bauhinia monandra* (Kurz) leaves and their antioxidative effects. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 3, n. 4, p. 59-65, 2006.
- ADEROGBA, M. A., MCGAW, L. J., OGUNDAINI, A. O., ELOFF, J. N. Antioxidant activity and cytotoxicity study of the flavonol glycosides from *Bauhinia galpinii*. **Natural product research**, v. 21, n. 7, p. 591-599, 2007.
- AHLQVIST, E.; STORM, P.; KÄRÄJÄMÄKI, A.; MARTINELL, M.; DORKHAN, M.; CARLSSON, A.; WESSMAN, Y. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 6, n. 5, p. 361-369, 2018.
- AHMED, A. S., ELGORASHI, E. E., MOODLEY, N., MCGAW, L. J., NAIDOO, V., ELOFF, J. N. The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African *Bauhinia* species used traditionally to treat diarrhoea. **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 3, p. 826-839, 2012.
- ALAM, M. M.; MEERZA, D.; NASEEM, I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. **Life Sciences**, v. 109, n. 1, p. 8-14, 2014.
- ALKHALIDY, H.; MOORE, W.; ZHANG, Y.; MCMILLAN, R.; WANG, A.; ALI, M.; HULVER, M. Small molecule kaempferol promotes insulin sensitivity and preserved pancreatic β -cell mass in middle-aged obese diabetic mice. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, 2015.
- ALVES, D., KACHAN, B., CARBONI, C., MARIANO, P., CALMEIRO, M., SILVA, R. LADA numa Unidade Integrada de Diabetes. **Medicina Interna**, v. 23, n. 4, p. 22-25, 2016.
- AL-NUMAIR, K. S., CHANDRAMOHAN, G., VEERAMANI, C., ALSAIF, M. A. Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Redox Report**, v. 20, n. 5, p. 198-209, 2015.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2018. **Diabetes Care**, v. 41, n. Supplement 1, p. S13-S27, 2018.

AVRAHAMI, D., WANG, Y. J., KLOCHENDLER, A., DOR, Y., GLASER, B., KAESTNER, K. H. β -Cells are not uniform after all—Novel insights into molecular heterogeneity of insulin-secreting cells. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 19, p. 147-152, 2017.

AZQUETA, A.; SLYSKOVA, J.; LANGIE, S.A.; O'NEILL GAIVÃO, I.; COLLINS, A. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 288, 2014.

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, p. 43, 2013.

BARNETT, A. H. Complementing insulin therapy to achieve glycemic control. **Advances in Therapy**, v. 30, n. 6, p. 557-576, 2013.

BAKHTI, M.; BÖTTCHER, A.; LICKERT, H. Modelling the endocrine pancreas in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, p. 1, 2018.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 3, p. 101-110, 2000.

BECKMAN, J. A., PANENI, F., COSENTINO, F., CREAGER, M. A. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. **European heart journal**, v. 34, n. 31, p. 2444-2452, 2013.

BENT, S.; KO, R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. **The American Journal of Medicine**, v. 116, n. 7, p. 478-485, 2004.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 239, p. 70-76, 1996.

BJORNSTAD, P.; CHERNEY, D. Z.; MAAHS, D. M.; NADEAU, K. J. Diabetic kidney disease in adolescents with type 2 diabetes: new insights and potential therapies. **Current Diabetes Reports**, v. 16, n. 2, p. 11, 2016.

BLANCO, M.; ALCALÁ, M.; GONZÁLEZ, J. M.; TORRAS, E. Near infrared spectroscopy in the study of polymorphic transformations. **Analytica Chimica Acta**, v. 567, n. 2, p. 262-268, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996**. Estabelece os requisitos para realização de pesquisa clínica de produtos para saúde utilizando seres humanos. Conselho Nacional de Saúde. Brasília, 10 outubro de 1996.

BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEI FILHO, V. **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010.

BONNER-WEIR, S.; TRENT, D. F.; WEIR, G. C. Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 71, n. 6, p. 1544-1553, 1983.

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

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA S. M.; DE MORAIS, D. R. **Antioxidantes: princípios e métodos analíticos**. 1 ed. Curitiba, Appris, 2015. 141p

BUQUI, G. A.; SY, S. K.; MERINO-SANJUÁN, M.; GOUVEA, D. R.; NIXDORF, S. L.; KIMURA, E.; DINIZ, A. Characterization of intestinal absorption of C-glycoside flavonoid vicenin-2 from *Lychnophora ericoides* leaves in rats by nonlinear mixed effects modeling. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 212-218, 2015.

BUNIEWSKA, M.; CARBONELL-CAPELLA, J. M.; FRIGOLA, A.; ESTEVE, M. J. Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with *Stevia rebaudiana*. **Food chemistry**, v. 221, p. 1834-1842, 2017.

BUTLER, P.C.; ELASHOFF, M.; ELASHOFF, R.; GALE, E. A. A critical analysis of the clinical use of incretin-based therapies: are the GLP-1 therapies safe? **Diabetes Care**, v. 36, p. 2118–2225, 2013.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1309-1315, 1998.

CAO, X. Q.; VASSEN, R.; SCHWARTZ, S.; JUNGEN, W.; TIETZ, F.; STÖEVER, D. Spray-drying of ceramics for plasma-spray coating. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 20, n. 14-15, p. 2433-2439, 2000.

CARBONELL-CAPELLA, J. M.; BUNIEWSKA, M.; BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 155-171, 2014.

CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental: um Guia para a Pesquisa de Drogas com Ação sobre o SNC, com Ênfase nas Plantas Medicinais. **Editora Fap-Unifesp, São Paulo. [Links]**, 2001.

CARLONI, P.; TIANO, L.; PADELLA, L.; BACCHETTI, T.; CUSTOMU, C.; KAY, A.; DAMIANI, E. Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 900-908, 2013.

CARNEIRO, H. C.; TONON, R. V.; GROSSO, C. R.; HUBINGER, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using

different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 443-451, 2013.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug–excipient compatibility screening—role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82-97, 2014.

CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 389, n. 10085, p. 2239-2251, 2017.

CHEN, Z. P.; SUN, J.; CHEN, H. X.; XIAO, Y. Y.; LIU, D.; CHEN, J.; CAI, B. C. Comparative pharmacokinetics and bioavailability studies of quercetin, kaempferol and isorhamnetin after oral administration of Ginkgo biloba extracts, Ginkgo biloba extract phospholipid complexes and Ginkgo biloba extract solid dispersions in rats. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1045-1052, 2010.

CHIOU, D.; LANGRISH, T. A. G. Development and characterisation of novel nutraceuticals with spray drying technology. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 1, p. 84-91, 2007.

COBBLE, M. E.; PETERS, A. L. Clinical practice in type 2 diabetes: after metformin and lifestyle, then what?. **Journal of Family Practice**, v. 58, n. 11, p. S7-S7, 2009.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

COSKUN, O.; KANTER, M.; KORKMAZ, A.; OTER, S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. **Pharmacological Research**, v. 51, n. 2, p. 117-123, 2005.

COSTANTINO, S., PANENI, F., BATTISTA, R., CASTELLO, L., CAPRETTI, G., CHIANDOTTO, S., VOLPE, M. Impact of Glycemic Variability on Chromatin Remodeling, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction in Patients with Type 2 Diabetes and With Target HbA1c Levels. **Diabetes**, v. 66, n. 9, p. 2472-2482, 2017.

DA CUNHA, A. M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A. G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M. W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine**, v. 17, n. 1, p. 37-41, 2010.

DAI, X.; DING, Y.; ZHANG, Z.; CAI, X.; LI, Y. Quercetin and quercitrin protect against cytokine-induced injuries in RINm5F β -cells via the mitochondrial pathway and NF- κ B signaling. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, n. 1, p. 265-271, 2013.

DART, A. B.; MARTENS, P. J.; RIGATTO, C.; BROWNELL, M. D.; DEAN, H. J.; SELLERS, E. A. Earlier onset of complications in youth with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, n. 2, p. 436-443, 2014.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARI, R.; SCAZZOCHIO, B.; MASELLA, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, 11, 1321-1342, 2010.

- DAS, S.; MITRA, I.; BATUTA, S.; ALAM, M. N.; ROY, K.; BEGUM, N. A. Design, synthesis and exploring the quantitative structure–activity relationship of some antioxidant flavonoid analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 21, p. 5050-5054, 2014.
- DAVIES, M. J.; GAGLIARDINO, J. J.; GRAY, L. J.; KHUNTI, K.; MOHAN, V.; HUGHES, R. Real-world factors affecting adherence to insulin therapy in patients with Type 1 or Type 2 diabetes mellitus: a systematic review. **Diabetic Medicine**, v. 30, n. 5, p. 512-524, 2013.
- DAY, A. J.; WILLIAMSON, G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. **British Journal of Nutrition**, v. 86, n. S1, p. S105-S110, 2001.
- DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E.; GROOP, L.; HENRY, R. R.; HERMAN, W. H.; HOLST, J. J.; SIMONSON, D. C. Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15019, 2015.
- DEFRONZO, R. A.; BUSE, J. B.; KIM, T.; BURNS, C.; SKARE, S.; BARON, A.; FINEMAN, M. Once-daily delayed-release metformin lowers plasma glucose and enhances fasting and postprandial GLP-1 and PYY: results from two randomised trials. **Diabetologia**, v. 59, n. 8, p. 1645-1654, 2016.
- DE SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; E SILVA, F. R. M. B. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3, 7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 829-832, 2004.
- DE SOUZA, B.V.C.; MOREIRA-ARAÚJO, R.S.D.R.; SILVA, O.A.; FAUSTINO, L.C.; GONÇALVES, M. F. B.; DOS SANTOS, M.L.; NUNES, L.C.C. *Bauhinia forficata* in the treatment of diabetes mellitus: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 28, n. 2, p. 129-138, 2018.
- DIAMANT, M.; BLAAK, E. E.; DE VOS, W. M. Do nutrient–gut–microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes?. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 4, p. 272-281, 2011.
- DOMINGOS, A. H.; JÚNIOR, L. C. **Plantas medicinais: patas-de-vaca**. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca, 2016. 29 p.
- DONG, Y. D.; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1-2, p. 101-111, 2011.
- DORATO, M.A.; BUCKLEY, L.A. **Current Protocols in Pharmacology**. Chapter 10: Toxicology in the drug discovery and development process, 2006.
- EDRIS, A. E.; KALEMBA, D.; ADAMIEC, J.; PIĄTKOWSKI, M. Microencapsulation of *Nigella sativa* oleoresin by spray drying for food and nutraceutical applications. **Food Chemistry**, v. 204, p. 326-333, 2016.

EID, H. M.; NACHAR, A.; THONG, F.; SWEENEY, G.; HADDAD, P. S. The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 41, p. 74, 2015.

ENGEL, I. C.; FERREIRA, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; SILVA, C. M. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (*Fabaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.18, n 02, 2008.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1139-1147, 2011.

FARAG, M. A.; SAKNA, S. T.; EL-FIKY, N. M.; SHABANA, M. M.; WESSJOHANN, L. A. Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC–PDA–qTOF-MS and chemometrics. **Phytochemistry**, v. 119, p. 41-50, 2015.

FERNANDES, R. V. D. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A.; OLIVEIRA, C. R. D. Physical and chemical properties of encapsulated rosemary essential oil by spray drying using whey protein–inulin blends as carriers. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 6, p. 1522-1529, 2014.

FERNÁNDEZ-MILLÁN, E.; GANGNERAU, M. N.; DE MIGUEL-SANTOS, L.; CALDERARI, S.; SERRADAS, P.; ESCRIVÁ, F.; ÁLVAREZ, C. Undernutrition of the GK rat during gestation improves pancreatic IGF-2 and beta-cell mass in the fetuses. **Growth Factors**, v. 27, n. 6, p. 409-418, 2009.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VINHOLES, J.; SILVA, S. T.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 894-904, 2012.

FIELDEN, M. R.; KOLAJA, K. L. The role of early in vivo toxicity testing in drug discovery toxicology. **Expert Opinion in Drug Safety**, v. 7, n. 2, p. 107-110, 2008.

FILKOVA, I.; MUJUMDAR, A.S. **Handbook of Industrial Drying**. 2^a ed., vol. 1, editora Mujumdar, p. 263-308, 1995.

FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; SONG, W. O.; FERNANDEZ, M. L.; BRUNO, R. S.; CHUN, O. K. Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 6, p. 600-623, 2010.

FLORES, T. B.; LORENZI, H.; SOUZA, V. C. Introdução à botânica: morfologia. ed. **Nova Odessa, SP: Plantarum**, 2013.

FOURLANOS, S.; DOTTA, F.; GREENBAUM, C.J.; PALMER, J.P.; ROLANDSSON, O.; COLMAN, P.G. et al. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent. **Diabetologia**. v. 48, p.2206–125, 2005.

- FRANCO, M. J.; DA SILVA CAETANO, I. C.; CAETANO, J.; DRAGUNSKI, D. C. Determinação de metais em plantas medicinais comercializadas na região de Umuarama-PR. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 15, n. 2, 2011.
- FUCHSBERGER, C.; FLANNICK, J.; TESLOVICH, T. M.; MAHAJAN, A.; AGARWALA, V.; GAULTON, K. J.; RIVAS, M. A. The genetic architecture of type 2 diabetes. **Nature**, v. 536, n. 7614, p. 41, 2016.
- FUHLENDORFF, J.; RORSMAN, P.; KOFOD, H.; BRAND, C. L.; ROLIN, B.; MACKAY, P.; CARR, R. D. Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes. **Diabetes**, v. 47, n. 3, p. 345-351, 1998.
- GIRON, D. J.; COHEN, S. J.; LYONS, S. P.; TROMBLEY, M. L.; GOULD, C. L. Virus-induced diabetes mellitus in ICR Swiss mice is age dependent. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 2, p. 834-836, 1983.
- GIRARDI, N. S.; PASSONE, M. A.; GARCÍA, D.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. Microencapsulation of *Peumus boldus* essential oil and its impact on peanut seed quality preservation. **Industrial Crops and Products**, v. 114, p. 108-114, 2018.
- GREGG, E. W.; SATTAR, N.; ALI, M. K. The changing face of diabetes complications. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 4, n. 6, p. 537-547, 2016.
- GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004.
- GUÉNARD, F.; DESHAIES, Y.; CIANFLONE, K.; KRAL, J. G.; MARCEAU, P.; VOHL, M. C. Differential methylation in glucoregulatory genes of offspring born before vs. after maternal gastrointestinal bypass surgery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 28, p. 11439-11444, 2013.
- HAN, X.; SHEN, T.; LOU, H. Dietary polyphenols and their biological significance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, n. 9, p. 950-988, 2007.
- HASAN, M. M.; AHMED, Q. U.; SOAD, S. Z. M.; TUNNA, T. S. Animal models and natural products to investigate in vivo and in vitro antidiabetic activity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 833-841, 2018.
- HEANEY, R. P. Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 4, p. 1344S-1348S, 2001.
- HU, F. B.; VAN DAM, R. M.; LIU, S. Diet and risk of type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. **Diabetologia**, v. 44, n. 7, p. 805-817, 2001.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- HUGHES, J. P.; REES, S.; KALINDJIAN, S. B.; PHILPOTT, K. L. Principles of early drugdiscovery. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**, 8th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2017.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G.; SALGADO, H. R. N.; CORREA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 81-96, 2008.

ISLAM, M. S.; DU LOOTS, T. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 31, n. 4, p. 249-261, 2009.

JEONG, S. M.; KANG, M. J.; CHOI, H. N.; KIM, J. H.; KIM, J. I. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. **Nutrition Research and Practice**, v. 6, n. 3, p. 201-207, 2012.

JORGE, A. P.; HORST, H.; DE SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, n. 2-3, p. 89-96, 2004.

KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; DEL PRATO, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. **The Lancet**, v. 383, n. 9922, p. 1068-1083, 2014.

KAMALEDDIN, M. A. The paradoxical pro-and antiangiogenic actions of resveratrol: therapeutic applications in cancer and diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1386, n. 1, p. 3-15, 2016.

KANGRALKAR, V. A.; PATIL, S. D.; BANDIVADEKAR, R. M. Oxidative stress and diabetes: a review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 38-45, 2010.

KARLSSON, F. H., TREMAROLI, V., NOOKAEW, I., BERGSTRÖM, G., BEHRE, C. J., FAGERBERG, B., BÄCKHED, F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. **Nature**, v. 498, n. 7452, p. 99, 2013.

KATSAROU, A.; GUDBJÖRNSDOTTIR, S.; RAWSHANI, A.; DABELEA, D.; BONIFACIO, E.; ANDERSON, B. J.; LERNMARK, Å. Type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17016, 2017.

KIM, J. H.; KANG, M. J.; CHOI, H. N.; JEONG, S. M.; LEE, Y. M.; KIM, J. I. Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. **Nutrition Research and Practice**, v. 5, n. 2, p. 107-111, 2011.

KOBORI, M.; MASUMOTO, S.; AKIMOTO, Y.; TAKAHASHI, Y. Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. 7, p. 859-868, 2009.

KOHLROSER, J.; MATHAI, J.; REICHHELD, J.; BANNER, B. F.; BONKOVSKY, H. L. Hepatotoxicity due to troglitazone: report of two cases and review of adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 1, p. 272, 2000.

KOSARAJU, S. L.; LABBETT, D.; EMIN, M.; KONCZAK, I.; LUNDIN, L. Delivering polyphenols for healthy ageing. **Nutrition & Dietetics**, v. 65, p. S48-S52, 2008.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, London, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

KWON, O.; ECK, P.; CHEN, S.; CORPE, C. P.; LEE, J. H.; KRUHLAK, M.; LEVINE, M. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 2, p. 366-377, 2007.

KOMES, D.; HORŽIĆ, D.; BELŠČAK, A.; GANIĆ, K. K.; VULIĆ, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 167-176, 2010.

KONDRATYUK, T. P.; PEZZUTO, J. M. Natural product polyphenols of relevance to human health. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. sup1, p. 46-63, 2004.

KOOTTE, R. S.; VRIEZE, A.; HOLLEMAN, F.; DALLINGA-THIE, G. M.; ZOETENDAL, E. G.; DE VOS, W. M.; NIEUWDORP, M. The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 112-120, 2012.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

KUMAR, B.; GUPTA, S. K.; NAG, T. C.; SRIVASTAVA, S.; SAXENA, R.; JHA, K. A.; SRINIVASAN, B. P. Retinal neuroprotective effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Experimental Eye Research**, v. 125, p. 193-202, 2014.

LAI, P. B.; ZHANG, L.; YANG, L.Y. Quercetin ameliorates diabetic nephropathy by reducing the expressions of transforming growth factor- β 1 and connective tissue growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats. **Renal Failure**, v. 34, n. 1, p. 83-87, 2012.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LIMA, J. F. **Estabelecimento da cultura de células de *Bauhinia forficata* Link como fonte de metabólitos bioativos**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

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

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479S-3485S, 2004.

LIU, J. S.; HEBROK, M. All mixed up: defining roles for β -cell subtypes in mature islets. **Genes & Development**, v. 31, n. 3, p. 228-240, 2017.

LU, Q.; JI, X. J.; ZHOU, Y. X.; YAO, X. Q.; LIU, Y. Q.; ZHANG, F.; YIN, X. X. Quercetin inhibits the mTORC1/p70S6K signaling-mediated renal tubular epithelial–mesenchymal transition and renal fibrosis in diabetic nephropathy. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 237-247, 2015.

MAHAFFEY, K. W.; HAFLEY, G.; DICKERSON, S.; BURNS, S.; TOURT-UHLIG, S.; WHITE, J.; HOME, P. D. Results of a reevaluation of cardiovascular outcomes in the RECORD trial. **American Heart Journal**, v. 166, n. 2, p. 240-249. e1, 2013.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARQUES, G. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; ROLIM-NETO, P. J.; SOARES, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MARQUES, G. S.; ROLIM, L. A.; ALVES, L. D. S.; SILVA, C. C. A. R.; SOARES, L. A. L.; ROLIM-NETO, P. J. Estado da arte de *Bauhinia forficata* Link (*Fabaceae*) como alternativa terapêutica para o tratamento do Diabetes mellitus. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Pernambuco, v. 34, p. 313-320, 2013.

MATSUI-INOHARA, H.; UEMATSU, H.; NARITA, T.; SATOH, K.; YONEZAWA, H.; KURODA, K.; WATANABE, H. E2F-1-deficient NOD/SCID mice developed showing decreased saliva production. **Experimental biology and medicine**, v. 234, n. 12, p. 1525-1536, 2009.

MATSUMOTO, Y., TORIMOTO, K., MATSUYOSHI, H., HIRAYAMA, A., FUJIMOTO, K., YOSHIMURA, N.; HIRAO, Y. Long-term effects of diabetes mellitus on voiding function in a new model of type 2 diabetes mellitus, the Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rat. **Biomedical Research**, v. 30, n. 6, p. 331-335, 2009.

MAYER-DAVIS, E. J.; DAVIS, C.; SAADINE, J.; D'AGOSTINO JR, R. B.; DABELEA, D.; DOLAN, L.; KLEIN, B. E. Diabetic retinopathy in the SEARCH for Diabetes in Youth Cohort: a pilot study. **Diabetic Medicine**, v. 29, n. 9, p. 1148-1152, 2012.

MENEZES, F. D. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S.; KUSTER, R. M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 8-13, 2007.

MILECH, A.; ANGELUCCI, A. P.; GOLBERT, A.; MATHEUS, A.; CARRILHO, A. J.; RAMALHO, A. C. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)**. São Paulo, 2016.

MIWA, S.; WATADA, H.; OHMURA, C.; TANAKA, Y.; KAWAMORI, R. Efficacy and safety of once daily gliclazide (20 mg/day) compared with nateglinide. **Endocrine Journal**, v. 51, n. 4, p. 393-398, 2004.

MOHLKE, K. L.; BOEHNKE, M. Recent advances in understanding the genetic architecture of type 2 diabetes. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. R1, p. R85-R92, 2015.

MONAMI, M.; DICEMBRINI, I.; KUNDISOVA, L.; ZANNONI, S.; NREU, B.; MANNUCCI, E. A meta-analysis of the hypoglycaemic risk in randomized controlled trials with sulphonylureas in patients with type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 16, n. 9, p. 833-840, 2014.

MORAES, E. A. D.; REMPEL, C. PÉRICO, E.; STROHSCHOEN, A. A. G. Avaliação do perfil glicêmico de portadores de Diabetes Mellitus tipo II em UBSs que utilizam infusão de folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Conscientiae Saúde**. v. 9, n.4, p. 2010.

MORRIS, A. P.; VOIGHT, B. F.; TESLOVICH, T. M.; FERREIRA, T.; SEGRE, A. V.; STEINTORSDDOTTIR, V.; PROKOPENKO, I. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9, p. 981, 2012.

MÜLLER, G. Methods to Induce Experimental Diabetes Mellitus. **Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays**, p. 1-14, 2014.

NASTESKA, D.; HODSON, D. J. The role of beta cell heterogeneity in islet function and insulin release. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 61, n. 1, p. R43-R60, 2018.

NAUCK, M. A.; MEIER, J. J. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 4, n. 6, p. 525-536, 2016.

NEGRI, G.; DUARTE-ALEMEIDA, J. M.; Ensaio fitoquímico em plantas medicinais: Propriedades, extração, caracterização e quantificação de princípios ativos. In: CARLINI, E.A.; MENDES, F.R.; **Protocolos em psicofarmacologia comportamental: Um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais**. 1 ed. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011.

NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **The Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 169-181, 2011.

NOGUEIRA, A. C. O.; SABINO, C. V. Revisão do gênero *Bauhinia* abordando aspectos científicos das espécies *Bauhinia forficata* Link e *Bauhinia variegata* L. de interesse para a indústria farmacêutica. **Revista Fitos**, Belo Horizonte, v. 7, n.02, abril/junho, 2012.

OECD, **Test Guideline TG-423**. 2002. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/testno-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en> Acesso em 07 junho de 2018.

OECD, **Test Guideline TG-407**. 2008. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/testno-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en> Acesso em 07 junho de 2018.

OECD, **Test Guideline TG-489**. 2014. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/testno-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264224179-en> Acesso em 07 de junho de 2018.

OGURTSOVA, K.; DA ROCHA FERNANDES, J. D.; HUANG, Y.; LINNENKAMP, U.; GUARIGUATA, L.; CHO, N. H.; MAKAROFF, L. E. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 128, p. 40-50, 2017.

OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2, p. 170-96, 1989.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. São Paulo, SP. Vol. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. D. L.; MUSSEL, W. N.; SOARES, C.; PIANETTI, G. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-30, 2011.

OZOUGWU, J. C.; OBIMBA, K. C.; BELONWU, C. D.; UNAKALAMBA, C. B. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Journal of Physiology and Pathophysiology**, v. 4, n. 4, p. 46-57, 2013.

PANCHAL, S. K.; POUDYAL, H.; BROWN, L. Quercetin Ameliorates Cardiovascular, Hepatic, and Metabolic Changes in Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 6, p. 1026-1032, 2012.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapy**, v. 2, n. 2, p. 74-79, 2011.

PATEL, D. K.; KUMAR, R.; LALOO, D.; HEMALATHA, S. 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, n. 3, p. 239-250, 2012.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, Oxford, v. 39, p. 791-800, 2006.

PEPATO, M. T.; KELLER, E. H.; BAVIERA, A. M.; KETTELHUT, I. C.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 191-197, 2002.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA JR. A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. D.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPEMA, J. Flavonoids glycosides from leaves and flowers of *Bauhinia forficata* (*Leguminosae*). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

PORRINI, M.; RISO, P. Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: a critical appraisal. **NMCD. Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 18, n. 10, p. 647-650, 2008.

PRAVENEK, M. Use of rat genomics for investigating the metabolic syndrome. In: **Rat Genomics**. Humana Press, 2010. p. 415-426.

PRICE, K. R.; BACON, J. R.; RHODES, M.J.C. Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 938-942, 1997.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, p. 4290-4302, 2005.

PUCHAU, B.; ZULET, M. A.; ECHÁVARRI, A. G.; HERMSDORFF, H. H. M.; MARTÍNEZ, J. A. Dietary total antioxidant capacity is negatively associated with some metabolic syndrome features in healthy young adults. **Nutrition**, New York, v. 26, p. 534-541, 2010.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

QIN, J.; LI, Y.; CAI, Z.; LI, S.; ZHU, J.; ZHANG, F.; PENG, Y. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 55, 2012.

RAO, M. U.; SREENIVASULU, M.; CHENGAI AH, B.; REDDY, K. J.; CHETTY, C. M. Herbal medicines for diabetes mellitus: a review. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 3, p. 1883-1892, 2010.

RÉ, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, Philadelphia, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

RENNER, S.; FEHLINGS, C.; HERBACH, N.; HOFMANN, A.; VON WALDTHAUSEN, D. C.; KESSLER, B.; GÖKE, B. Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic β -cells in transgenic pigs with impaired GIP function. **Diabetes**, 2010.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods in Enzymology**, Maryland Heights, v. 234, p. 279-293, 1994.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids - A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v.23, p. 726-740, 2010.

ROSCIONI, S. S., MIGLIORINI, A., GEGG, M., LICKERT, H. Impact of islet architecture on β -cell heterogeneity, plasticity and function. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 12, p. 695, 2016.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, n. 125, 2006.

_____. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, n. 127, 2007a.

_____. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, n. 128, jul. 2007b.

RUFINO, M. S. M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais**, Universidade Federal do Semi-Arido, Mossoró, RN, (Tese), 2008, 237f.

RUSYN, I.; GATTI, D. M.; WILSHIRE, T.; KLEEBERGER, S. R.; THREADGILL, D. W. Toxicogenetics: population-based testing of drug and chemical safety in mouse models. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 8, p. 1127-1136, 2010.

SALATINO, A.; BLATT, C. T.; SANTOS, D. Y. D.; VAZ, A. M. Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. **Brazilian Journal of Botany**, v. 22, n. 1, p. 17-20, 1999.

SALGUEIRO, A. C. F.; FOLMER, V.; DA SILVA, M. P.; MENDEZ, A. S. L.; ZEMOLIN, A. P. P.; POSSER, T.; PUNTEL, G. O. Effects of *Bauhinia forficata* tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

SASAKI, Y.F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 629-799, 2000.

SASIKALA, P.; CHANDRALEKHA, A.; CHAURASIYA, R. S.; CHANDRASEKHAR, J.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Ultrasound-assisted extraction and adsorption of polyphenols from Ginger Rhizome (*Zingiber officinale*). **Separation Science and Technology**, v. 53, n. 3, p. 439-448, 2018.

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GONI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 492-501, 2007.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073S-2085S, 2000.

SEO, E.; PARK, E. J.; JOE, Y.; KANG, S.; KIM, M. S.; HONG, S. H.; LEE, H. J. Overexpression of AMPK α 1 ameliorates fatty liver in hyperlipidemic diabetic rats. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 13, n. 6, p. 449-454, 2009.

SCHOLZ. Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 77, n. 3, p. 224-235, 2007.

SILVA, F. R.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M. G.; WILLRICH, M. A.; DE SOUSA, E. Acute effect to *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 83, p. 33- 37, 2002.

SILVA, R. M. F.; GOMES, T. C. B. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; SILVA JUNIOR, J. O. C.; BARBOSA, W. L. R.; ROLIM NETO, P. J. Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 103-109, 2012.

SKYLER, J. S.; BAKRIS, G. L.; BONIFACIO, E.; DARSOW, T.; ECKEL, R. H.; GROOP, L.; MCELVAINE, A. T. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. **Diabetes**, v. 66, n. 2, p. 241-255, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. São Paulo: Editora Clannad, 2017.

SOUZA, C. R F.; OLIVEIRA, W. P. Drying of phytochemical preparations in a spouted bed: Perspectives and challenges. **Drying Technology**, v. 30, n. 11-12, p. 1209-1226, 2012.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: coletânea científica**. Editora UFOP, 2011.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso das plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás: Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. 2006; 20:135-42.

SRINIVASAN, S.; FLOREZ, J. C. Desafios terapêuticos na prevenção do diabetes: Não encontramos a “pílula do exercício”. **Farmacologia Clínica e Terapêutica**, v. 98, n. 2, p. 162-169, 2015.

SURICHAN, S.; ANDROUTSOPOULOS, V. P.; SIFAKIS, S.; KOUTALA, E.; TSATSAKIS, A.; ARROO, R. R.; BOARDER, M. R. Bioactivation of the citrus flavonoid nobiletin by CYP1 enzymes in MCF7 breast adenocarcinoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3320-3328, 2012.

STEWART, L. K.; WANG, Z.; RIBNICKY, D.; SOILEAU, J. L.; CEFALU, W. T.; GETTYS, T. W. Failure of dietary quercetin to alter the temporal progression of insulin resistance among tissues of C57BL/6J mice during the development of diet-induced obesity. **Diabetologia**, v. 52, n. 3, p. 514-523, 2009.

STAMLER, J.; VACCARO, O.; NEATON, J. D.; WENTWORTH, D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Diabetes Care**, v. 16, n. 2, p. 434-444, 1993.

TAHRANI, A. A.; BARNETT, A. H.; BAILEY, C. J. SGLT inhibitors in management of diabetes. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 1, n. 2, p. 140-151, 2013.

TODAY STUDY GROUP. Retinopathy in youth with type 2 diabetes participating in the TODAY clinical trial. **Diabetes Care**, v. 36, n. 6, p. 1772-1774, 2013.

TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T. L. S.; SOARES, G. L. G.; RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155-163, 2012.

TRYGGESTAD, J. B.; WILLI, S. M. Complications and comorbidities of T2DM in adolescents: findings from the TODAY clinical trial. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 29, n. 2, p. 307-312, 2015.

VASCONCELOS, F.; SAMPAIO, S. V.; GARÓFALO, M. A.; GUIMARÃES, L. F. L.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n.2-3, p. 385-92. 2004.

VAZ, A. M. S. F.; TOZZI, A. M. G. A. Synopsis of *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) DC. (*Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae*) in Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, n. 3, p. 477-491, 2005.

VEDTOFTE, L.; BODVARSDOTTIR, T. B.; GOTFREDSEN, C. F.; KARLSEN, A. E.; KNUDSEN, L. B.; HELLER, R. S. Liraglutide, but not vildagliptin, restores normoglycaemia and insulin content in the animal model of type 2 diabetes, *Psammomys obesus*. **Regulatory Peptides**, v. 160, n. 1-3, p. 106-114, 2010.

VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 60, 2015.

VOGEL, H. G. Antidiabetic Activity, **Springer**, p. 1323–1607, 2008.

VRIEZE, A.; VAN NOOD, E.; HOLLEMAN, F.; SALOJÄRVI, J.; KOOTTE, R. S.; BARTELSMAN, J. F.; DERRIEN, M. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. **Gastroenterology**, v. 143, n. 4, p. 913-916. e7, 2012.

WANG, Y. J.; FU, G. S.; CHEN, F. M.; WANG, H. The effect of valsartan and fluvastatin on the connective tissue growth factor expression in experimental diabetic cardiomyopathy. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**, v. 48, n. 8, p. 660-665, 2009.

WANG, T.; LI, Q.; BI, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 12-23, 2018.

WEI, G. J.; HWANG, L. S.; TSAI, C. L. Absolute bioavailability, pharmacokinetics and excretion of 5, 7, 3', 4'-tetramethoxyflavone in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 136-141, 2014.

WEN, L.; YOU, L.; YANG, X.; YANG, J.; CHEN, F.; JIANG, Y.; YANG, B. Identification of phenolics in litchi and evaluation of anticancer cell proliferation activity and intracellular antioxidant activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 84, p. 171-184, 2015.

WEN, L.; JIANG, Y.; YANG, J.; ZHAO, Y.; TIAN, M.; YANG, B. Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1398, n. 1, p. 120-129, 2017.

WILDING, J. P. The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors. **Metabolism**, v. 63, n. 10, p. 1228-1237, 2014.

XIAO, J.; LV, Y.; LIN, S.; JIN, L.; ZHANG, Y.; WANG, X.; LI, X. Cardiac protection by basic fibroblast growth factor from ischemia/reperfusion-induced injury in diabetic rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 444-449, 2010.

YANG, X.; JIANG, Y.; YANG, J.; ELE, J.; SUN, J.; CHEN, F.; YANG, B. Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, n. 1, p. 93-104, 2015.

YEON, J. Y.; BAE, Y. J.; KIM, E. Y.; LEE, E. J. Association between flavonoid intake and diabetes risk among the Koreans. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 225-230, 2015.

YOON, J. W.; MCCLINTOCK, P. R.; ONODERA, T.; NOTKINS, A. L. Virus-induced diabetes mellitus. XVIII. Inhibition by a nondiabetogenic variant of encephalomyocarditis virus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 152, n. 4, p. 878-892, 1980.

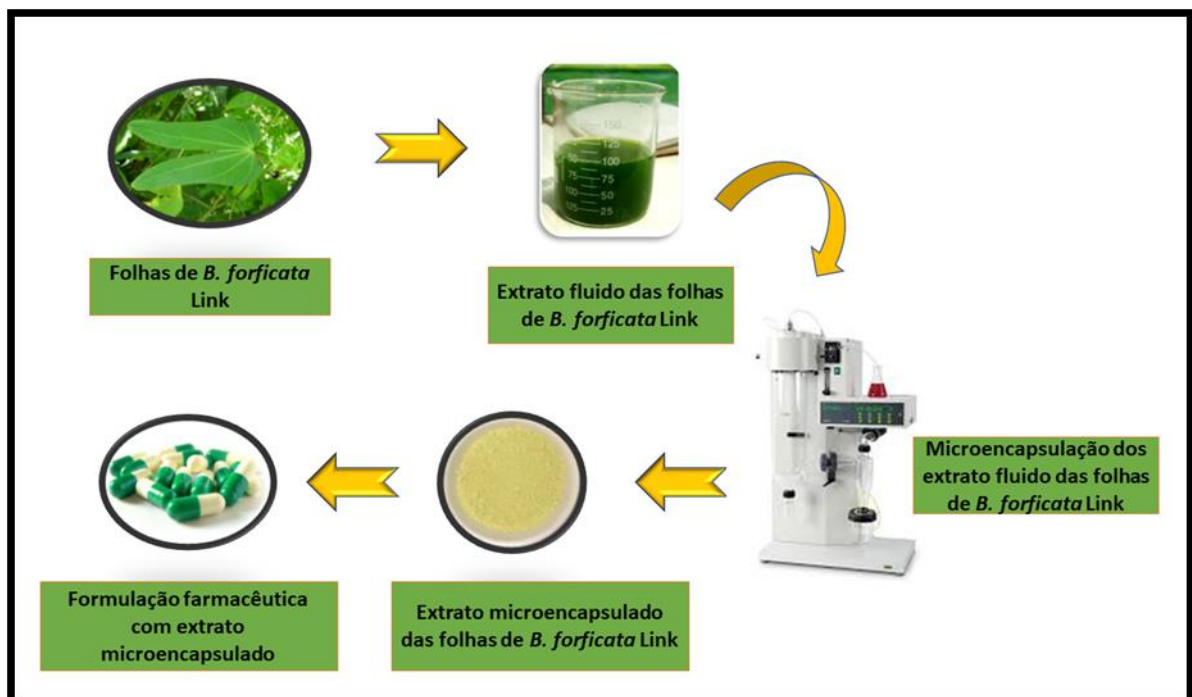
ZANINELLI, D. Nova classificação propõe 5 tipos de diabetes; veja as diferenças. Disponível em <https://pubmed.com.br/nova-classificacao-propoe-5-tipos-de-diabetes-veja-as-diferencas/>. Acesso 13 de dezembro de 2018.

ZANG, Y.; ZHANG, L.; IGARASHI, K.; YU, C. The anti-obesity and anti-diabetic effects of kaempferol glycosides from unripe soybean leaves in high-fat-diet mice. **Food & Function**, v. 6, n. 3, p. 834-841, 2015.

ZHANG, L.; MOU, D.; DU, Y. Procyanidins: extraction and micro-encapsulation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 12, p. 2192-2197, 2007.

ZHANG, Y.; LIU, D. Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 325-332, 2011.

ZHANG, Y.; ZHEN, W.; MAECHLER, P.; LIU, D. Small molecule kaempferol modulates PDX-1 protein expression and subsequently promotes pancreatic β -cell survival and function via CREB. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 638-646, 2013.



Capítulo 1

Bauhinia forficata no tratamento do diabetes mellitus: uma revisão de patentes

- Periódico publicado: Expert Opinion on Therapeutic Patents
- Fator de Impacto: 3,041
- QUALIS A1 em Biotecnologia

***Bauhinia forficata* no tratamento do diabetes mellitus: uma revisão de patentes**

Bárbara Verônica Cardoso de Souza^a, Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo^a, Oskar Almeida Silva^b, Lucas Costa Faustino^c, Maria Fabrícia Beserra Gonçalves^a, Mirian Lima Dos Santos^d, Grasielly Rocha Souza^d, Lindalva Moura Rocha^e, Mônica Larissa Sousa Cardoso^a,
Lívio César Cunha Nunes^d

^a*Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Piauí, Brasil*

^b*Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Piauí, Brasil*

^c*Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Piauí, Brasil*

^d*Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Piauí, Brasil*

^e*Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Piauí, Piauí, Brasil*

Resumo

Introdução: O Diabetes Mellitus tem sido considerado uma epidemia, pela Organização Mundial de Saúde, com alto risco de morbimortalidade. O tratamento desta patologia consiste em controle da glicemia, que pode ser feito por hipoglicemiantes orais, insulinoaterapia, orientação alimentar, atividade física regular e o apoio psicossocial. Além destes, outros tratamentos coadjuvantes são empregados, como a fitoterapia e uma das plantas mais utilizada é a *Bauhinia forficata*.

Áreas abrangidas: Na presente revisão, analisaram-se patentes que utilizaram a *Bauhinia forficata* para o tratamento de Diabetes Mellitus. Foram encontradas três patentes na WIPO, uma no Espacenet, uma na USPTO e duas no INPI.

Opinião do especialista: São discutidas patentes sobre o tratamento coadjuvante da diabetes Mellitus pela *Bauhinia forficata*. Embora haja alguns produtos fitoterápicos com essa planta medicinal, que possui efeito hipoglicemiante, no tratamento dessa patologia, há ainda uma necessidade do desenvolvimento de mais produtos à base de recursos naturais, sem efeitos colaterais e com outros benefícios, para auxiliar no controle da glicemia dos pacientes diabéticos, melhorando sua qualidade de vida.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata*, diabetes mellitus, fitoterápicos, flavonoides, kaempfertrina, quercetina, resistência à insulina.

Artigos destacados

- O flavonoide kaempferol das folhas de *Bauhinia forficata* possui efeito hipoglicemiante e antioxidante.
- Uma composição com extratos de *B. forficata* e outras plantas medicinais mostraram efeito hipoglicemiante em humanos.
- A infusão com folhas de *Bauhinia forficata* obteve efeito hipoglicemiante em pacientes diabéticos.

1 Introdução

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia, que pode ser, na prática clínica, de dois tipos: tipo 1 (DM1) (autoimune), na qual há uma destruição parcial ou total das células β das ilhotas de Langerhans pancreáticas, resultando na incapacidade progressiva de produzir insulina; e o tipo 2 (DM2) (insuficiência da secreção e/ou ação da insulina). O primeiro é diagnosticado na população mais jovem e representa apenas uma pequena porcentagem do total de pacientes diagnosticados com diabetes. O tipo 2 é a forma mais comum de diabetes, cujos principais fatores de risco para o seu desenvolvimento, além da predisposição genética, é a qualidade da dieta e o estilo de vida. Há ainda uma forma de diabetes autoimune diagnosticada no adulto, denominada *latent autoimmune diabetes in adults* (LADA), que sugere a possibilidade de uma continuidade fisiopatológica entre os dois principais tipos de DM (DIABETES ASSOCIATION OF THAILAND, 2014; DOMIUK, 2011; GUELHO; PAIVA; CARVALHEIRO, 2013; NOLAN; DAMN; PRENTKI, 2011).

A prevalência do DM2 tem aumentado globalmente devido ao envelhecimento da população, à urbanização, obesidade e sedentarismo, sendo considerada uma epidemia pela Organização Mundial de Saúde, com alto risco de morbimortalidade. O DM2 descompensado pode causar diversas alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e de lipídeos, lesão de nervo periférico, lesão renal, causando complicações graves, incluindo problemas na circulação sanguínea, lesões na retina do olho, conseqüentemente cegueira, lesão nervosa, dentre outras (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010).

O tratamento para esta patologia consiste em aquisição de conhecimentos sobre a doença, insulino terapia, habilidade de autoaplicação da insulina e o autocontrole da glicemia, hipoglicemiantes orais, orientação alimentar, atividade física regular e o apoio psicossocial (GÓES; VIEIRA; LIBERATORE JÚNIOR, 2007). Além destes, outros tratamentos coadjuvantes são empregados, como a fitoterapia. Diversas plantas medicinais têm sido usadas para o tratamento de DM, especialmente o tipo 2, com impacto positivo no metabolismo da glicose e dos lipídeos, melhorando o estado geral dos pacientes, não somente pelo efeito hipoglicemiante, mas também pela ação antioxidante destas plantas. Entre estas, destaca-se a *Bauhinia forficata*, descrita por Link em 1821 e inserida na família *Leguminosae*, posteriormente chamada de *Fabaceae* e popularmente conhecida como "pata de vaca" ou insulina vegetal. Esse gênero compreende cerca de 300 espécies encontradas especialmente nas regiões tropicais do planeta (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

O primeiro ensaio clínico com esta espécie foi registrado em 1929 e a partir desta data, os extratos aquosos de suas folhas têm sido amplamente utilizados no tratamento de diabetes (SILVA et al., 2012). Lorenzi (2008) comprovou que as folhas desta planta são consideradas antidiabéticas, hipoglicemiantes, antioxidantes, hepatoprotetoras, diuréticas, hipocolesterolemiantes, com efeito benéfico também na medicina popular, contra cistites e parasitoses intestinais.

Essas diversas propriedades biológicas da *Bauhinia forficata* foram atribuídas a seus constituintes, que inclui lactonas, flavonoides, terpenóides, glicolipídios, esteroides e taninos. Os principais compostos bioativos da *B. forficata* são flavonoides, que constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais, sendo a kaempferitrina o principal marcador químico e farmacológico, responsável pela atividade hipoglicemiante (DE SOUSA et al., 2006).

Embora as drogas sintéticas disponíveis no mercado tenham efeito hipoglicêmico significativo, elas também causam diversos efeitos colaterais, e não são eficazes na prevenção da ocorrência de complicações. Portanto, pesquisas sobre fitoterápicos são importantes, pois estes têm efeitos eficazes na glicemia, além de não possuir os efeitos colaterais indesejáveis dos fármacos, prevenindo as complicações. Assim, essa revisão de patentes favorece uma melhor prospecção para futuros estudos sobre a utilização da *B. forficata* no tratamento do DM2, aumentando as possibilidades profiláticas e terapêuticas para os pacientes portadores dessa patologia.

2 Métodos

As patentes foram pesquisadas em bases de dados da *World Intellectual Property Organization* (WIPO), *European Patent Office* (EPO), *United States Patent and Trademark Office* (USPTO) e Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). A seleção de patentes foi baseada nos seguintes critérios de inclusão: patentes publicadas contendo *Bauhinia forficata* e Diabetes Mellitus como palavras-chave no título, resumo ou texto completo.

Um total de 29 patentes foi analisado para avaliação preliminar dos bancos de dados (Figura 1). Destas, excluíram-se 10 patentes duplicadas e 12 patentes que estavam fora do foco da revisão, como patentes que relatavam outras patologias tratadas pela *Bauhinia forficata* como câncer, osteoporose, redução de peso, ansiedade, influenza e estudos com outras espécies de *Bauhinia*. Foram selecionadas para esta revisão sete patentes sobre o uso da *Bauhinia forficata* no tratamento da Diabetes Mellitus. As patentes foram depositadas em três países: Brasil, Estados Unidos e Japão (Tabela 1).

Figura 1 - Diagrama de pesquisa e triagem das patentes analisadas.

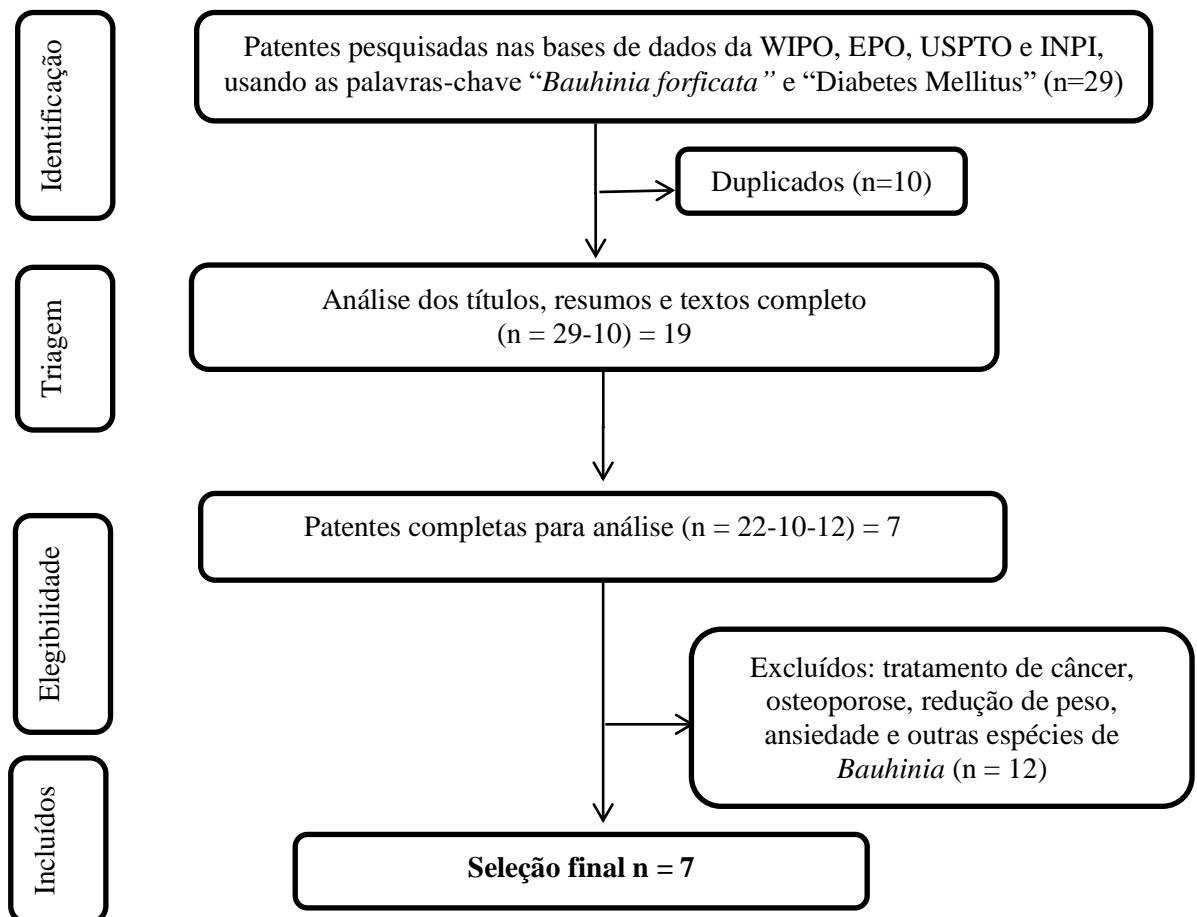


Tabela 1 - Patentes sobre *Bauhinia forficata* no tratamento do *Diabetes Mellitus*.

Patentes	Inventores/ Empresa (País)	País de proteção	Ano	CIP	Formulação	Mecanismo de ação	Profilaxia ou tratamento	Via de administração	Forma de apresentação	Referência
US20060189512	Ehrenkranz Joel R. L. EHRENKRANZ JOEL R. L. (USA)	US	2006	A61K A23L A23V	Composições contendo extratos botânicos ricos em florizina, <i>Bauhinia forficata</i> e outras plantas com efeito hipoglicemiante.	Redução dos níveis de glicose no sangue e na urina, controle do peso, envelhecimento precoce.	Tratamento	Oral	Suplemento dietético ou nutracêuticos na forma de comprimido, cápsula ou pó.	EHRENKRANZ, 2006.
JP2012/102144	Buchholz Herwig et al. MERCK PATENT GMBH (Japão)	JP	2012	A61K A61P A23L	Extrato de etanol e água, contendo 30 a 70% em volume de água como solvente.	Redução da concentração de glicose no plasma.	Tratamento	Oral	Extrato hidroalcolico	HERWIG et al. 2012.
US20130231492	Duan Hongquan et al. DUAN HONGQUAN QIN NAN NIU WENYAN JIN MEINA SHI LIHUAN CHEN YING (USA)	US	2013	C07D A61K	Classe de novos compostos derivados de flavonoides, método de preparação e a sua aplicação como fármaco antidiabético.	Tratamento do Diabetes e resistência à insulina.	Tratamento	Oral	Sólida.	DUAN et al., 2015.
BR102013024150	Larissa Araújo Rolim et al. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (Brasil)	BR	2013	A61K A61P	Composição farmacêutica efervescente com extrato etanólico de <i>Bauhinia forficata</i> .	Tratamento do Diabetes	Tratamento	Oral	Pó, granulado ou comprimido.	ROLIM et al., 2013.

Tabela 1 - Patentes sobre *Bauhinia forficata* no tratamento do *Diabetes Mellitus*.

Patentes	Inventores/ Empresa (País)	País de proteção	Ano	CIP	Formulação	Mecanismo de ação	Profilaxia ou tratamento	Via de adminis- tração	Forma de apresenta- ção	Referência
US 2014/0186321	Thomas Christian Lines Thomas Christian Lines (USA)	US	2014	A61K	Composição contendo quercetina, vitamina B3, vitamina C e extrato de <i>B. forficata</i> .	Redução da glicose e pressão sanguínea e da resistência à insulina.	Tratamento	Oral e parenteral	Pó ou comprimido; líquida, cápsula, goma de mascar ou gel).	LINES, 2012.
BR1020150157690	Mario Moffa et al. MARIO MOFFA, LUPERCIO CALEFE (Brasil)	BR	2015	A61K A61P	Forma farmacêutica com extratos de <i>Bauhinia forficata</i> e <i>Syzygium jambolanum</i>	Tratamento do Diabetes tipo 2	Tratamento	Oral	Pellets, comprimido ou pó.	MOFFA; CALEFE, 2017.
US20150190446	Fogel Dov ASCARIT LTD. (USA)	US	2015	A61K A61P	Composição à base de plantas <i>Urtica</i> , <i>Artemisia</i> , <i>Morus</i> , <i>Bauhinia forficata</i> e outras plantas com efeito hipoglicemiante.	Tratamento e/ ou prevenção da diabetes e patologias relacionadas e dislipidemia.	Tratamento e profilaxia	Oral	Chá, tintura, comprimido, cápsula, pílula, barra, pastilha, goma de mascar, loção, pó ou grânulos.	FOGEL, 2015.

Fonte: Autoria própria (2018). CIP: Classificação internacional de patentes. A61K: Preparações para finalidades médicas. A23L e A23V: Alimentos ou produtos alimentícios.

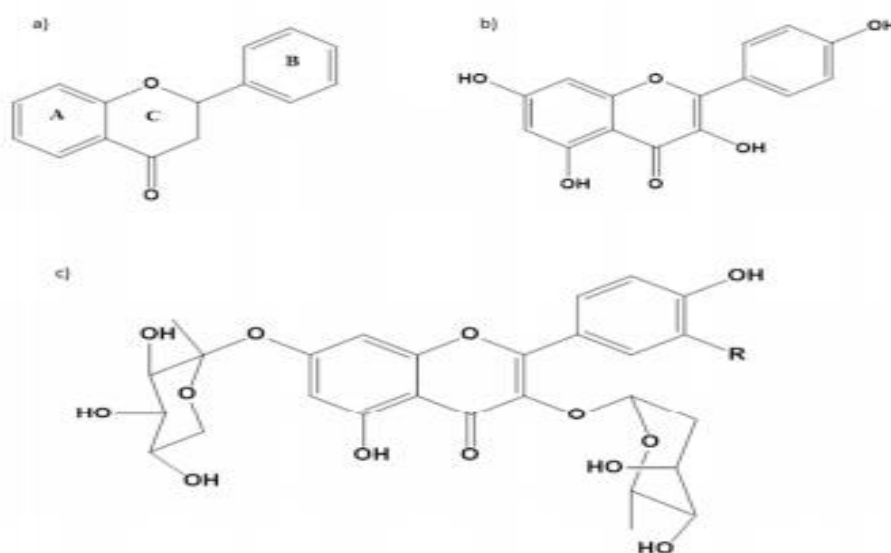
C07D: Preparações com compostos orgânicos. A61P: Atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais.

3 Análise de Patentes

3.1 Flavonoides no tratamento da diabetes

A invenção (US20130231492) foi desenvolvida por Duan et al., (2015) e refere-se a uma classe de novos compostos derivados de flavonoides, isolados das folhas da *B. forficata*, bem como um método de preparação e a sua aplicação como fármaco antidiabético. Os flavonoides são compostos polifenólicos, encontrados amplamente em frutas, folhas, chás e vinhos, sendo constituídos por três anéis, cujos carbonos podem sofrer variações químicas, como hidroxilação, hidrogenação, metilação e sulfonação, formando mais de quatro mil compostos flavonoides, que são agrupados em classes. Existem seis classes principais de flavonoides, incluindo antocianinas (cianidina, pelargonidina, delphinidina, malvidina), flavonóis (quercetina, rutina, kaempferol e miricetina), flavanóis (epicatequinas, luteoforol, proantocianidinas e theaflavinas), flavanonas (hesperidina e naringerina), flavonas (apigenina e luteolina), e isoflavonas (daidzeína, genisteína). Cada uma dessas classes de flavonoides diferencia-se pelo número e a disposição dos grupos hidroxilas e a sua extensão de alquilação e glicosilação, como pode ser verificado no flavonol kaempferol 3,7-di-O- α -Lramnopiranosídeo (kaempferitrina) (Figura 2) (LOPES et al., 2010; GEORGIE; ANANGA; TSOLOVA, 2014; PANDEY; RIZVI, 2009; HAN; LOA, 2007).

Figura 2 - a) Estrutura química dos flavonoides b) Estrutura química do kaempferol c) Estrutura química do kaempferol 3,7-di-O- α -L ramnopiranosídeo.



Fonte: Autoria própria (2018).

Esses polifenóis atuam no organismo humano como antioxidantes, antialérgicos, anti-inflamatório, anti-viral e antimicrobiano, anti-proliferativo, anti-mutagênico, anti-cancerígeno, eliminam radicais livres, regulam o ciclo celular, modulam algumas vias importantes de sinalização celular, como o fator nuclear Kappa-B (NF- κ B), fatores de transcrição AP-1, e da acetilação/ desacetilação nuclear da histona, proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK), inositol trifosfato (IP3)/ proteína quinase B(Akt), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e fator nuclear redox (Nrf2) (CHEN et al., 2000; MOLINA et al., 2003; SHEN et al., 2007).

Referindo-se à atividade antioxidante dos flavonoides, esta depende da disposição de seus grupos funcionais, sendo que a configuração, a substituição e o número total de grupos hidroxilas influenciam em vários mecanismos dessa atividade (KELLY; ANTHONY; DENNIS, 2002; PANDEY; MISHRA; MISHRA, 2012). Tais mecanismos dessa ação antioxidante estão relacionados com a inibição das enzimas envolvidas na produção dos radicais livres (monooxigenase microsomal, glutatona S-transferase, succinoxidase mitocondrial, NADH oxidase) (BROWN; KHODR; HIDER, 1998). Isso ocorre devido ao potencial redox dos flavonoides que são capazes de reduzir os radicais livres altamente oxidantes, como o superóxido, radicais peroxil, alcóxil e hidroxil por doação de átomo de hidrogênio. Possuem ainda a ação de quelar íons metálicos (ferro, cobre, etc.), e de inibir a síntese de radicais (MISHRA; KUMAR; PANDEY, 2013; MISHRA; SHARMA; KUMAR, 2013), por exemplo, a quercetina é conhecida por suas propriedades de quelar e estabilizar o ferro; as catequinas inibem a peroxidação lipídica; a epicatequina e a rutina são fortes sequestrantes de radicais e inibidores da peroxidação lipídica *in vitro* (KERRY; ABBEY, 1997).

Os flavonoides atuam, de forma específica, nas funções enzimáticas do processo inflamatório, inibindo a liberação de histaminas, de fosfodiesterases, das proteínas quinases (PK), ligando-se, competitivamente, com as enzimas ATP associadas à transdução do sinal e à ativação de mecanismos imunológicos. A atividade anti-inflamatória destes compostos bioativos ocorre também pela modulação de células envolvidas com a inflamação (inibem a proliferação de mastócitos, células T, células B, células NK e neutrófilos) e a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias TNF- α (Fator de Necrose Tumoral α) e IL-1 (Interleucina-1), liberadas por macrófagos ativados e vários outros tipos celulares, sendo estas responsáveis pela indução da apoptose e inibição da via NF- κ B (RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006; GONZÁLEZ et al., 2011; MANTHEY, 2000; RATHEE et al., 2009; MANTHEY; GUTHRIE; GROHMANN, 2001; QIN et al., 1998; NATELLA et al., 2006).

Outro mecanismo de ação dos flavonoides no processo inflamatório é através da inibição da atividade das enzimas da via do ácido araquidônico fosfolipase A2 (PLA2), ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX), reduzindo a produção de eicosanoides, além de modularem a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), o que se traduz na inibição da produção de óxido nítrico (BIESALSKI, 2007; CAZAROLLI et al., 2008; HAVSTEEN, 2002; KIM et al., 2004; LÓPEZ-POSADAS et al., 2008; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

A estrutura química destes compostos é a responsável pela sua atividade anti-inflamatória, como a insaturação no anel C (posições 2-3), o número e a posição de grupamentos hidroxilas, a carbonila em C-4 (Anel B) e a não glicosilação da molécula. Algumas subclasses de flavonoides, mesmo não possuindo essa estrutura, por exemplo, a aglicona kaempferol, também se destacam por apresentar atividade sobre enzimas da cascata de inflamação (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). A inflamação crônica está diretamente relacionada com muitas doenças, incluindo câncer, alergias, artrite, doenças cardiovasculares e diabetes e os flavonoides, devido às suas potentes ações anti-inflamatórias e antioxidantes, como já explanado anteriormente, tem sido alvos de novas estratégias terapêuticas para estas patologias (DEVI et al., 2015).

A hiperglicemia, no DM2, é causada por alteração na digestão e absorção de carboidratos da dieta, depleção de armazenamento de glicogênio, aumento da gliconeogênese, disfunção nas células β pancreáticas, resistência à insulina do tecido periférico e falhas nas vias de sinalização de insulina. Os flavonoides agem como hipoglicemiantes por reduzirem a absorção intestinal de carboidratos dietéticos, modulam as enzimas envolvidas no metabolismo da glicose (inibem a α -glicosidase), melhoram a função das células β e a secreção e ação da insulina e pelas suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (DINNEEN; GERICH; RIZZA, 1992; IWAI et al., 2006).

Yeon et al., (2015) realizaram um estudo com 4186 participantes, divididos em dois grupos de acordo com a glicemia de jejum: glicemia de jejum normal (até 100 mg/dl) e glicemia de jejum ≥ 100 mg / dl, no qual investigaram a associação entre ingestão de flavonoides e risco de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e constataram que a ingestão desses compostos bioativos foi menor no grupo hiperglicêmico e que a resistência à insulina teve um relação inversa à ingestão de flavonas e flavonóis entre os indivíduos do gênero masculino, confirmando o efeito hipoglicemiante.

Na patente US20130231492, foram realizados testes *in vivo*, cujas doses dos extratos administradas foram entre 2ug/mL e 5ug/mL, constatando-se que os derivados de flavona

podem aumentar significativamente o consumo de glicose das células de carcinoma hepatocelular (HepG2) resistentes à insulina, aumentam a absorção e utilização de glicose e promovem a translocação do transportador de glicose das células do músculo esquelético (GLUT4) em diferentes níveis, sendo que este último efeito é um dos principais mecanismos para o tratamento de diabetes, proporcionando a aplicação desses compostos bioativos para a produção de fármaco antidiabético (DUAN et al., 2015; IWAI, 2008).

Os derivados de flavona testados apresentaram atividade antidiabética comparável e/ou superior ao da metformina, além de um efeito maior do que a insulina sobre a translocação de GLUT4 nas células do músculo esquelético. Um dos mecanismos moleculares do efeito antidiabético dos derivados de flavonoides foi elucidado, no qual ocorre a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), uma enzima que atua no metabolismo celular, mantendo a homeostasia energética e induzindo uma cascata de eventos intracelulares em resposta a mudança da carga energética celular, sendo o mesmo mecanismo de ação pelo qual a metformina exerce sua ação farmacológica. Essa enzima celular é estimulada pelo exercício físico, por isso a prescrição de dieta e atividade física para indivíduos portadores de DM2 está intimamente relacionada com a ativação da AMPK, a qual parece ser responsável por muitos efeitos benéficos no tratamento e na prevenção da doença (DUAN et al., 2015; IWAI, 2008; JÚN et al., 2008; KITABCHI et al., 2005).

Mokashi, Khanna e Pandita (2017) também avaliaram a atividade antidiabética de flavonoides em células de HepG2 resistentes à insulina e obtiveram resultados semelhantes ao da invenção US20130231492. Os pesquisadores utilizaram esse modelo de linha celular HepG2 para imitar a condição *in vivo* do DM2. Observou-se que as células tratadas com flavonoides aumentaram a translocação de GLUT4 para a membrana celular, com consequente aumento da absorção de glicose, além de ter sido verificado uma diminuição da resistência à insulina, confirmando que os flavonoides representam um tratamento promissor para diabetes mellitus tipo 2.

3.2 *Bauhinia forficata* associada com outros compostos bioativos no tratamento da diabetes

Os compostos bioativos de plantas medicinais tais como alcaloides, carboidratos, glicosídicos, flavonoides, esteroides, terpenoides, peptídeos e aminoácidos, lipídios, fenólicos, glicopeptídeos e iridoides têm efeitos benéficos comprovados no diabetes,

melhorando o controle glicêmico, perfil lipídico e estado antioxidante (SINGH, 2011; VINAYAGAM; XU, 2015).

Os fitoquímicos reduzem a glicemia e impedem a absorção da glicose pelo trato gastrointestinal. Esse efeito hipoglicêmico deve-se ao aumento da secreção de insulina por meio da estimulação das células β pancreáticas; resistência hormonal ao glucagon que aumenta os níveis de glicose no sangue; aumento do número e da sensibilidade dos receptores da insulina; diminuição da perda de glicogênio; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgão; papel insulinomimético; eliminação de radicais livres; estímulo ao aumento da microcirculação sanguínea, inibição da α -glicosidase e outras ações, como a redução do trânsito intestinal (RAO et al., 2010; TANIRA, 1994). Hosseini, Shafiee-Nick e Ghorbani (2015) relataram que a atividade antidiabética de alguns fitoquímicos é mediada pela inibição da degeneração de células beta.

Existem diversas plantas medicinais com efeito hipoglicêmico e antidiabético comprovado, dentre elas destacam-se a *Moringa oleifera*, *Abelmoschus esculentus*, *Lycium barbarum*, *Rourea cuspidata*, *Gentiana olivieri*, *Bauhinia forficata*, *Eugenia jambolana*, *Lactuca indica*, *Mucuna pruriens*, *Tinospora cordifolia*, *Momordica charantia*, *Aporosa lindleyana*, *Myrtus communis* e *Terminalia pallida* (JUNG et al., 2006).

Fombang e Saa (2016) demonstraram que o chá de *Moringa oleifera* tem atividade anti-hiperglicêmica e antioxidante em modelos de ratos e em seres humanos, sendo atribuído ao seu teor de polifenóis, particularmente ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, que inibem a α -amilase, α -glucosidase e absorção de glicose intestinal; melhoram a absorção de glicose por tecidos periféricos, suprimem a gliconeogênese e estimulam a secreção de insulina (HANHINEVA et al., 2010; KIM; KEOGH; CLIFTON, 2016; KWON et al., 2007; LUANGPIOM; KOURJAMPA; JUNAIMAUNG, 2013; SCALBERT et al., 2005; SOLIMAN, 2013).

Um estudo recente confirmou a atividade hipoglicemiante do quiabo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) *in vivo*, do qual, extraiu-se o polissacarídeo ramnogalacturonana e seu efeito hipoglicemiante foi testado em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, que apresentaram uma diminuição do nível de glicose sanguínea e da tolerância à glicose (LIU et al., 2017). Além dessa atividade, esse polissacarídeo bioativo, melhora a nefropatia diabética e aumenta a proliferação de esplenócitos e a secreção de citocinas, atuando como imunomodulador (CHEN et al., 2016; PENG et al., 2016).

Lycium barbarum, um fruto que também possui em sua composição polissacarídeos bioativos, principalmente manose, ramnose, glicose, galactose e xilose, inibiu a absorção da

glicose *in vitro*, podendo ser um potente agente antidiabético (TANG et al., 2015). Outra planta com essa atividade é *Rourea cuspidata*, cuja administração de 200 mg/kg contínua de seu extrato hidroalcolico, *in vivo*, reduziu significativamente a concentração de glicose no sangue dos ratos diabéticos, com efeito semelhante ao da glibenclamida, que atua estimulando a secreção de insulina a partir de células β das ilhotas de Langerhans, sendo que a hiperina, presente nessa planta, pode ser o agente hipoglicemiante, pois tem a capacidade de aumentar a glicólise, devido ao aumento da atividade da hexoquinase do fígado e diminuir as atividades de enzimas gliconeogênicas (BEDOYA; SOLANO; LUCAS, 1996; LAIKOWSKI et al., 2017; VERMA et al., 2012).

Herwig, Corinna, Valerie, Doeclecio e Didier (JP2012102144; JP2005504753; US20040170714; US2006018859; WO2003011311) realizaram testes com vários extratos de *Bauhinia* spp, os quais mostraram atividade hipoglicemiante, sendo uma alternativa para o tratamento da diabetes, agindo como um hipoglicemiante oral. Esta invenção patenteou os métodos de produção do extrato, que consistiu na utilização de uma mistura de etanol e água como solvente extrator dos compostos das folhas jovens de *B. forficata*, contendo 30-70% de água, além do método de extração, fez-se também um medicamento e um suplemento alimentar à base dos extratos de *Bauhinia* (HERWIG et al., 2012).

O extrato pode ser feito a partir de qualquer uma das partes aéreas das espécies de *Bauhinia*, porém os melhores resultados foram com os extratos obtidos a partir de folhas jovens, por isso essas foram escolhidas para a produção dos extratos dessa patente citada acima, sendo que a extração deve ocorrer, preferencialmente, das folhas da *B. forficata*.

A atividade hipoglicemiante constatada nessa invenção foi similar ao efeito obtido pelos fármacos, tais como a metformina. Esse efeito é devido à ação combinada de compostos bioativos diferentes como flavonas ou flavonoides (isoquercetina, kaempferol, quercetina, rutina). A suplementação foi efetivada com uma dosagem de 150 mg de extrato/kg de peso corporal, duas vezes ao dia, tendo como resultados a melhoria na tolerância à glicose e um aumento da excreção da mesma. Outro efeito benéfico observado foi a ação antioxidante destes extratos. Estudos *in vitro* e em *in vivo* já demonstraram que o estresse oxidativo diminui a secreção de insulina das células β pancreáticas e interfere na via de sinalização de insulina, causando resistência à insulina e diabetes tipo 2 (BAST et al., 2002; BRUCE et al., 2003; EVANS et al., 2003; SAKURABA et al., 2002; ROBERTSON et al., 2003).

Na formulação do medicamento da invenção JP201210214, acrescentou-se, além do extrato de *Bauhinia* (0,01-99%), vitamina C e E, ácido alfa-lipóico, flavonoides, glutathiona, carotenoides, coenzima Q10, zinco e selênio ligados às proteínas, para otimizar a atividade

antioxidante da droga. A composição do suplemento alimentar incluiu vitaminas, minerais, probióticos, prebióticos, ácidos graxos, flavonoides, polissacarídeos, ácido lipóico e extrato da *Bauhinia* (0,01-99%).

Moffa e Calefe (2017) patentearam processos de obtenção de extratos fitoterápicos concentrados, para produção de produto para tratamento de diabetes tipo 2, obtido pelo uso isolado ou associado aos extratos concentrados de *B. forficata* e sementes de *Syzygium jambolanum* (Jambolão), preparados para administração oral na forma de microgrânulos, pellets, comprimido ou pó.

Os extratos dessa invenção foram obtidos da mistura, em massa, de 19% de folhas de *Bauhinia*, 52,5% de álcool e 28,5% de água e entre 9% e 19% de sementes de Jambolão, entre 57% e 64% de álcool e entre 24% e 27% de água. A quantidade de extrato de *B. forficata* e *S. jambolanum* contidos no pellet foi de 1% a 90%. Os inventores dessa patente BR1020150157690 testaram esses extratos em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, da linhagem *Wistar*, durante 42 dias. Esses animais tiveram seus níveis séricos de glicemia reduzidos para valores semelhantes aos observados nos animais do grupo que recebeu a metformina, sendo constatada a atividade antidiabetogênica dos "pellets" com esses extratos vegetais.

A invenção (US20140186321) foi desenvolvida por Thomas Christian Lines e refere-se a um método para tratar a síndrome metabólica ou diabetes, administrando uma quantidade eficaz de uma composição contendo quercetina, vitamina B3, vitamina C e extrato de *B. forficata*. Essa composição pode ser um suplemento dietético ou uma formulação farmacêutica, cujas formas de apresentação podem ser na forma sólida (pó ou comprimido) ou na forma líquida (bebida ou xarope) (LINES, 2014).

De acordo com essa invenção, a combinação da quercetina com a *B. forficata* potencializa os efeitos benéficos em pacientes com DM2, pois há um aumento do fluxo sanguíneo, reduzindo consideravelmente o risco de eventos trombóticos, diminui a pressão sanguínea e aumenta sinergicamente a sensibilidade à insulina. Essa composição também pode ser associada a um fármaco hipoglicemiante ou ao uso da insulina para melhorar a sua eficácia, possibilitando que o indivíduo seja tratado com doses mais baixas da droga e do hormônio sintético, reduzindo os efeitos colaterais (ganho de peso, náuseas, hipoglicemia, diarreia, flatulência, inapetência, danos no fígado, retenção de líquidos e dor estomacal). A formulação desenvolvida pode ser administrada concomitante à medicação ou em horários diferentes, antes das refeições, em uma dose de 100 mg a 2 g (de preferência, 250 mg a 1 g) de quercetina e 50 mg a 6 g (preferencialmente, 125 mg a 0,5 g) de extrato de *B. forficata*.

A patente US20060189512 descreve o desenvolvimento de um suplemento dietético, à base de extrato de florizina, *B. forficata* e outras plantas que possuem efeitos hipoglicemiantes. Além da redução da glicemia, da excreção de glicose e da redução dos níveis pós-prandiais de insulina, verificou-se também que esse suplemento facilitou a perda de peso e diminuiu o aparecimento ou a incidência de doenças relacionadas com o envelhecimento (EHRENKRANZ et al., 2006).

Os efeitos benéficos dessa invenção foram intensificados pela sinergia de outros elementos administrados com extrato de florizina. Tais elementos são quercetina, floretina, epicatequina, catequinas, ácido clorogênico e outros flavonoides. Constatou-se também que a associação desse suplemento com os fármacos para tratamento de DM também potencializa seu efeito hipoglicemiante. A dosagem desse suplemento dietético deve ser de 3 a 30 gramas por dia, administradas em três doses separadas, entre 1 a 10 gramas, cerca de 30 a 60 minutos antes das refeições (EHRENKRANZ et al., 2006).

Outra invenção que também utilizou o extrato de *B. forficata* associada com outros compostos foi desenvolvida por Fogel (US20100202980; US20150190446; WO2009001362; IL202980; EP 2170360) (FOGEL, 2015). Essa patente relatou uma composição à base das plantas *Urtica dioica*, *U. urens*, *U. pilulifera*, *Artemisia dracunculoides*, *A. alba*, *A. herba*, *A. roxburghiana*, *A. judaica*, *Morus alba*, *M. bombycis*, *M. indica*, *M. insignis*, *M. nigra*, *M. australis*, *B. forficata*, *Cinnamomum zeylanicum*, *C. saigonense*, *C. aromaticum*, *C. laurus*, *Canella winterana*, *Taraxacum officinale* e *Rosa canina*.

A referida composição pode ser um suplemento dietético e uma formulação farmacêutica, ambos com excipientes aceitáveis (maltodextrina, fosfato de cálcio e aerosil), cujas apresentações podem ser na forma de chá, tintura, comprimido, cápsula, pílula, barra, goma mastigável, loção, pó ou grânulos. As alegações de saúde dessa invenção são para o tratamento e/ou prevenção do DM2 e de dislipidemias e/ou condições associadas, sendo a dose terapêutica variando de 1000 mg a 6 gramas por dia (FOGEL, 2015).

3.3 *Bauhinia forficata* no tratamento da diabetes

A *Bauhinia forficata* possui vários constituintes químicos, destacando-se os flavonoides, especialmente os glicosídeos canferólicos e quercetínicos. Dentre esses, o kaempferol 3,7-di-O- α -L ramnopiranosídeo (kaempferitrina), é considerado como o marcador químico para as de folhas de *B. forficata* subsp. *forficata*, uma vez que está presente nesta, mas

ausente em *B. forficata* Link subsp. *pruinosa* (Vogel) Fortunato & Wunderlin (FERRERES et al., 2012; JORGE et al., 2004; MARQUES et al., 2012).

Devido à presença desses compostos bioativos, a *Bauhinia forficata* exerce diversas atividades benéficas ao organismo como antioxidante, antidiabética e hipoglicemiante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, anticoagulante, com aplicação no tratamento de doenças como câncer, síndrome metabólica, obesidade, ansiedade, osteoporose, Alzheimer e diabetes (MARQUES et al., 2013).

Rolim et al., (2013) patentearam uma invenção (BR1020130241504) que descreveu uma composição farmacêutica efervescente para o tratamento de DM à base de extrato seco de *Bauhinia forficata*. Essa formulação consistiu de extrato etanólico seco de *Bauhinia forficata* (15% a 70%), base efervescente (36% a 76%), ácido cítrico (6% a 12%), ácido tartárico (10% a 24%), bicarbonato de sódio (20% a 40%), adjuvante de secagem (dióxido de silício coloidal) (10% a 30%), edulcorante (sucralose) (8% a 14%), um aglutinante (polivinilpirrolidona), um excipiente (corante, aromatizantes, diluente, desagregante, lubrificante, molhante, absorvente). A composição farmacêutica efervescente pode ser apresentada na forma de pó, granulado ou comprimido, sendo uma alternativa para os pacientes diabéticos.

Da Cunha et al., (2010) realizaram um estudo em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, no qual foram verificados os efeitos hipoglicemiantes de diferentes extratos secos de *B. forficata* usando uma dose única de 200 mg/kg de peso corporal. Após a administração dos extratos de *B. forficata*, observou-se uma redução, em média, de 47,29% da glicose plasmática desses animais.

Salgueiro et al., (2016) investigaram os efeitos do chá de *Bauhinia forficata* link subsp. *pruinosa* e o seu efeito contra o estresse oxidativo e danos no fígado em ratos diabéticos. Os resultados mostraram que o chá de *B. forficata* reduziu o estresse oxidativo, mas não teve alteração na glicemia, diferente dos estudos já citados anteriormente. Assim, os pesquisadores inferiram que a ausência da ação hipoglicêmica do chá da *B. forficata* pode ser devido à inativação do composto kaempferitrina, principal substância responsável pela ação hipoglicêmica, que pode ter sido perdida durante o preparo da infusão ou ausência da mesma nesta espécie de *Bauhinia* estudada.

Pesquisa realizada com pacientes pré-diabéticos e diabéticos, que utilizaram uma dose de 0,15% de infusão de *B. forficata*, três vezes ao dia, após as refeições, durante três meses, mostrou que houve uma significativa redução da glicemia desses pacientes, sugerindo que o chá dessa espécie poderia ser útil na prevenção ou no tratamento complementar do DM2

(TOLOZA-ZAMBRANO; AVELLO; FERNANDEZ, 2015). Outro estudo com pacientes diabéticos que também fizeram uso da infusão da *B. forficata*, obtiveram uma diminuição no seu perfil glicêmico durante o período da intervenção (75 dias) (MORAES et al. 2010). Esses resultados são semelhantes aos verificados por Zaccaron et al. (2014), que avaliaram a pressão arterial e a glicemia em jejum de todos os usuários portadores de DM2 de uma Unidade Básica de Saúde e constataram que os pacientes que tomaram o chá das folhas de *B. forficata*, durante 180 dias, apresentaram diminuição dos valores da glicose, quando comparado com o grupo de pacientes que não fizeram uso da infusão, o que indica a eficácia desse fitoterápico no tratamento dessa patologia.

4 Conclusão

Conclui-se que, essas patentes destacam os diferentes produtos desenvolvidos à base de *Bauhinia forficata* e outros compostos bioativos utilizados na profilaxia e no tratamento da diabetes mellitus, especialmente o tipo 2. Os produtos fitoterápicos estudados possuem diversas vantagens, quando comparados aos fármacos hipoglicemiantes sintéticos, pois controlam a glicemia sem causar efeitos adversos, além de apresentarem outras propriedades funcionais biológicas, como atividade antioxidante, hipotensoras, hipocolesterolêmicas, anticoagulantes e anti-inflamatórias. As pesquisas demonstraram o crescente interesse da indústria farmacêutica e academias no desenvolvimento de hipoglicemiantes provenientes de produtos naturais para o tratamento da diabetes mellitus, para melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos por esta patologia.

5 Opinião do perito

DM2 é um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia crônica, sendo um fator de risco cardiovascular, com alta morbimortalidade. Os níveis elevados de glicose pós-prandial podem desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), diminuindo a secreção de insulina e interferindo na sua via de sinalização, além de causar complicações micro e macrovasculares (CAVALOT et al., 2011; GORST et al., 2015; MONNIER et al., 2006; PICCONI et al., 2012; TORIMOTO et al., 2013).

O controle do metabolismo glicêmico no DM é necessário para se evitar o surgimento dessas complicações. O organismo tenta compensar o excesso de glicose e a resistência à insulina constante, aumentando a produção e a secreção de insulina. Entretanto, este

mecanismo compensatório não consegue atuar continuamente, progredindo para uma inflamação sistêmica e conseqüentemente uma redução da secreção de insulina pelas células β e sua apoptose, ocasionando o avanço da doença (DEFRONZO, 2009; WEIR; BONNER-WEIR, 2004).

Os flavonoides possuem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e quimiopreventivas. Estudos *in vitro* e *in vivo* verificaram que esses compostos são capazes de eliminar os radicais livres e quelantes indutores de oxidação, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares, diminuindo a glicemia e melhorando a secreção e a sensibilidade à insulina (HIRVONEN et al., 2001a; HIRVONEN et al., 2001b; KNEKT et al., 2002; SESSO et al., 2003).

Com base nisso, a invenção (US20130231492) testou derivados de flavona *in vivo* e constatou que houve um aumento no consumo, absorção e utilização de glicose das células resistentes à insulina e viabilizou a translocação do GLUT4, provando que estes compostos podem ser aplicados na produção de fármacos hipoglicemiantes. Na patente (JP2012102144) foram testados extratos hidroalcoólicos de *B. forficata* associado à vitamina C e E, ácido alfa-lipóico, glutathione, carotenoides, coenzima Q10, zinco e selênio, que mostraram atividade hipoglicemiante e antioxidante. A partir desses resultados, foram desenvolvidos um medicamento e um suplemento alimentar.

Outros produtos patenteados para o tratamento da DM foram microgrânulos, pellets, comprimido ou pó com extratos de *B. forficata* e sementes de Jambolão (RATHEE et al., 2009) e um suplemento e uma formulação farmacêutica com quercetina, vitamina B3, vitamina C e extrato de *B. forficata* (MANTHEY; GUTHRIE; GROHMANN, 2001).

Suplementos dietéticos hipoglicemiantes à base de *B. forficata* e outras plantas fitoterápicas foram apresentados pelas patentes (US20060189512; US20150190446). A invenção (BR1020130241504) refere-se a uma composição farmacêutica efervescente na forma de pó, granulado ou comprimido à base de extrato seco de *Bauhinia forficata*. Essa invenção difere das demais discutidas anteriormente, pois apresentou uma composição em que o efeito hipoglicemiante é única e exclusivamente proveniente do extrato etanólico de *B. forficata*, enquanto nas outras invenções há a possibilidade de combinação terapêutica entre o extrato de *Bauhinia* e pelo menos um agente hipoglicemiante oral, insulina e outros compostos bioativos.

Assim, pode-se constatar que há algumas invenções com *B. forficata* para o tratamento do DM2 e que das sete patentes analisadas, duas não realizaram testes pré-clínicos, sendo que destas, apenas (US20060189512; US20150190446) foram testadas em humanos. Portanto, a

B. forficata pode ser um adjuvante eficaz no tratamento dessa doença crônica e predente-se, com esta revisão de patentes, ampliar perspectivas para pesquisas sobre o tratamento de DM, à base de produtos fitoterápicos, como a *B. forficata*, considerando também o crescente interesse e investimentos em P & D por esta área pelas indústrias farmacêuticas (BALBANI; SILVA; MONTOVANI, 2009).

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu qualquer subvenção específica de financiamento de agências de fomento dos setores público, privados ou sem fins lucrativos.

Declaração de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

BALBANI, A. P.; SILVA, D. H.; MONTOVANI, J. C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opinion on Therapeutic Patentes**, v. 19, n. 4 p. 461-73, 2009.

BAST, A.; WOLF, G.; OBERBAUMER, I.; WALTHER, R. Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 45, n. 6, p. 867-76, 2002.

BEDOYA, F. J.; SOLANO, F.; LUCAS, M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. **Experientia**, v. 52, n. 4, p. 344-7, 1996.

BIESALSKI, H. K. Polyphenols and inflammation: basic interactions. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 10, n. 6, p. 724-8, 2007.

BROWN, J. E.; KHODR, H.; HIDER, R. C.; RICE-EVANS, C. A. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. **Biochemical Journal**, v. 330, n.3, p.1173-8,1998.

BRUCE, C. R.; CAREY, A. L.; HAWLEY, J. A.; FEBBRAIO, M. A. Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. **Diabetes**, v. 52, n. 9, p. 2338-45, 2003.

CAVALOT, F.; PAGLIARINO, A.; VALLE, M.; DI MARTINO, L.; BONOMO, K.; MASSUCCO, P.; TROVATI, M. Postprandial blood glucose predicts cardiovascular events

and all-cause mortality in type 2 diabetes in a 14-year follow-up. **Diabetes Care**, v. 34, n. 10, p. 2237-43, 2011.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R. G.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. Flavonoids: Prospective drug candidates. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 13, p. 1429-40, 2008.

CECHINEL FILHO, V.; BREVIGLIERI, E.; WILLAIN FILHO, A.; SANTOS, A. R. S. Estudo fitoquímico e avaliação preliminar da atividade analgésica de *Bauhinia splendens*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 76, p. 115-17, 1996.

CHEN, C.; YU, R.; OWUOR, E. D.; KONG, A. N. Activation of antioxidant-response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. **Archives of Pharmacal Research**, v. 23, n. 6, p. 605-12, 2000.

CHEN, H.; JIAO, H.; CHENG, Y.; XU, K.; JIA, X.; SHI, Q.; GUO, S.; WANG, M.; DU, L.; WANG, F. In vitro and in vivo immunomodulatory activity of okra (*Abelmoschus sculentus* L.) polysaccharides. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 3, p. 253-65, 2016.

COUTINHO, M. A.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-56, 2009.

DA CUNHA, A. M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A. G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M. W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine**, v. 17, n. 1, p. 37-41, 2010.

DE MORAES, E. A.; REMPEL, C.; PÉRICO, E.; STROHSCHOEN, A. A. G. Avaliação do perfil glicêmico de portadores de Diabetes Mellitus tipo II em UBSs que utilizam infusão de folhas de *Bauhinia forficata* Link. **ConScientiae Saúde**, v. 9, n. 4, p. 569-74, 2010.

DE SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, TB.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F. R. M. B. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(alpha)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 829-32, 2004.

DEFRONZO, R. A. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 773-95, 2009.

DEVI, K. P.; MALAR, D. S.; NABAVI, S. F.; SUREDA, A.; XIAO, J.; NABAVI, S. M.; DAGLIA, M. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. **Pharmacological research**, v. 99, p. 1-10, 2015.

DIABETES ASSOCIATION OF THAILAND, The Endocrine Society of Thailand, Department of Medical Services, and National Health Security Office. **Clinical Practice Guideline for Diabetes**, 2014.

DINNEEN, S.; GERICH, J.; RIZZA, R. Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 10, p. 707-13, 1992.

DUAN, H.; QIN, N.; NIU, W.; JIN, M.; SHI, L.; CHEN, Y. **Flavone derivatives and their preparative method and medical use**. Depositante: Universidade Médica de Tianjin. US20130231492; US8946457B2. Depósito: 12 nov. 2010, Concessão: 03 fev. 2015.

EHRENKRANZ, J. R. L. **Compositions containing botanical extracts rich in phlorizin and methods for using such compositions in blood glucose modification and to affect aging**. Depositante: Western Holdings LLC. US20060189512A1. Depósito: 20 jan. 2006, Concessão: 24 ago. 2006.

EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D.; MADDUX, B. A.; GRODSKY, G. M. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2003.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VINHOLES, J.; SILVA, S. T.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. Bauhinia forficata Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 894-904, 2012.

FOGEL, D. **Herbal compositions for the treatment of diabetes and/or conditions associated therewith**. Depositante: Dov Fogel. US20150190446A1. Depósito: 12 dez. 2014, Concessão: 09 jul. 2015.

FOMBANG, E. N.; SAA, R. W. Antihyperglycemic activity of Moringa oleifera Lam leaf functional tea in rat models and human subjects. **Food and Nutrition Sciences**, v. 7, n. 11, p. 1021-32, 2016.

GEORGIE, V. V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**, v. 6, n. 1, p. 391-415, 2014.

GÓES, A. P. P.; VIEIRA, M. R. R.; LIBERATORE JÚNIOR, R. D. R. Diabetes mellitus tipo 1 no contexto familiar e social. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 25, n. 2, p. 124-8, 2007.

GONZÁLEZ, R.; BALLESTER, I.; LÓPEZ-POSADAS, R.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 331-62, 2011.

GORST, C.; KWOK, C. S.; ASLAM, S.; BUCHAN, I.; KONTOPANTELIS, E.; MYINT, P. K.; HEATLIE, G.; LOKE, Y.; RUTTER, M. K.; MAMAS, M. A. Long-term glycemic variability and risk of adverse outcomes: a systematic review and meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 38, n. 12, p. 2354-69, 2015.

GUELHO, D.; PAIVA, I.; CARVALHEIRO, M. Diabetes mellitus—um «continuum» fisiopatológico. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 8, n. 1, p. 44-9, 2013.

HAN, X.; LOA, T. Dietary polyphenols and their biological significance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, n. 9, p. 950-88, 2009.

HANHINEVA, K.; TÖRRÖNEN, R.; BONDIA-PONS, I.; PEKKINEN, J.; KOLEHMAINEN, M.; MYKKÄNEN, H.; POUTANEN, K. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1365-1402, 2010.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 67-202, 2002.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, n.10, p. 572-84, 2002.

HERWIG, B.; CORINNA, W.; VALERIE, B. B.; DOECLECIO, C.; DIDIER, M. **Bauhinia extracts**. Depositante: Merck Patent Gmbh. JP2012102144A. Depósito: 08 fev. 2012, Concessão: 31 mai. 2012.

HIRVONEN, T.; PIETINEN, P.; VIRTANEN, M.; OVASKAINEN, M. L.; HÄKKINEN, S.; ALBANES, D.; VIRTAMO, J. Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. **Epidemiology (Cambridge, Mass)**, v. 12, n. 1, p. 62-7, 2001a.

HIRVONEN, T.; VIRTAMO, J.; KORHONEN, P.; ALBANES, D.; PIETINEN, P. Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland). **Cancer Causes & Control: CCC**, v.12, n. 9, p. 789-96, 2001b.

HOSSEINI, A.; SHAFIEE-NICK, R.; GHORBANI, A. Pancreatic beta cell protection/regeneration with phytotherapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 1-16, 2015.

IWAI, K. Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-A(y) mice. **Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Neterlands)**, v. 63, n. 4, p. 163-9, 2008.

IWAI, K.; KIM, M. Y.; ONODERA, A.; MATSUE, H. Alpha-glucosidase inhibitory and antihyperglycemic effects of polyphenols in the fruit of *Viburnum dilatatum* Thunb. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4588-92, 2006.

JORGE, A. P.; HORST, H.; DE SOUZA, E.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, n. 2-3, p. 89-96, 2004.

JUNG, M.; PARK, M.; LEE, H. C.; KANG, Y. H.; KANG, E. S.; KIM, S. K. Antidiabetic agents from medicinal plants. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, n. 10, p. 1203-18, 2006.

KERRY, N. L.; ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. **Atherosclerosis**, v. 135, n.1, p.93-102, 1997.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 3, p. 229-45, 2004.

KIM, Y.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Polyphenols and glycemic control. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 1-27, 2016.

KITABCHI, A. E.; TEMPROSA, M.; KNOWLER, W. C.; KAHN, S. E.; FOWLER, S. E.; HAFFNER, S. M.; ANDRES, R.; SAUDEK, C.; EDELSTEIN, S. L.; ARAKAKI, R.; MURPHY, M. B.; SHAMOON, H. Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program: effects of lifestyle intervention and metformin. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2404-14, 2005.

KNEKT, P.; KUMPULAINEN, J.; JÄRVINEN, R.; RISSANEN, H.; HELIÖVAARA, M.; REUNANEN, A.; HAKULINEN, T.; AROMAA, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 3, p.560-8, 2002.

KWON, O.; ECK, P.; CHEN, S.; CORPE, C. P.; LEE, J. H.; KRUHLAK, M.; LEVINE, M. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. **FASEB Journal**, v. 21, n. 2, p. 366-77, 2007.

LAIKOWSKI, M. M.; DOS SANTOS, P. R.; SOUZA, D. M.; MINETTO, L.; GIRONDI, N.; PIRES, C.; MOURA, S. *Rourea cuspidata*: chemical composition and hypoglycemic activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 8, p. 712-18, 2017.

LINES, T. C. **Method for treating metabolic syndrome and diabetes using quercetin and *Bauhinia forficata* extract**. Depositante: Quercegen Pharmaceuticals LLC. US20140186321A1. Depósito: 28 dez. 2012, Concessão: 03 jul. 2014.

LIU, J.; ZHAO, Y.; WU, Q.; JOHN, A.; JIANG, Y.; YANG, J.; LIU, H.; YANG, B. Structure characterisation of polysaccharides in vegetable “okra” and evaluation of hypoglycemic activity. **Food Chemistry**, v. 242, p. 211-16, 2018.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. D.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. D. S. Flavonoides. **Biociência**, v. 3, n. 14, p. 18-22, 2000.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 495-506, 2008.

LORENZI, H. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LUANGPIOM, A.; KOURJAMPA, W.; JUNAIMAUNG, T. Anti-hyperglycemic properties of *Moringa oleifera* Lam. Aqueous leaf extract in normal and Mildly diabetic mice. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, n. 3, p. 106-9, 2013.

MANTHEY, J. A. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. **Microcirculation (New York, N.Y.; 1994)**, v. 7, n. 6 Pt 2, p. 29-34, 2000.

MANTHEY, J. A.; GROHMANN, K.; GUTHRIE, N. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 135-53, 2001.

MARQUES, G. S.; ROLIM, L. A.; ALVES, L. D. S.; SILVA, C. C. A. R.; SOARES, L. A. L.; ROLIM-NETO, P. J. Estado da arte de Bauhinia forficata Link (Fabaceae) como alternativa terapêutica para o tratamento do diabetes melittus. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 313-20, 2013.

MARQUES, G. S.; LYRA, M. A. M.; PEIXOTO, M. S.; MONTEIRO, R. P. M.; LEÃO, W. F.; XAVIER, H. S.; SOARES, L. A. L.; ROLIM-NETO, P. J. Caracterização fitoquímica e físico-química das folhas de Bauhinia forficata Link coletada em duas regiões brasileiras. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 57-62, 2012.

MENDES, B. G.; MACHADO, M. J.; FALKENBERG, M. Triagem de glicolipídios em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 568-75, 2006.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MISHRA, A.; KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Scientific validation of the medicinal efficacy of Tinospora cordifolia. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

MISHRA, A.; SHARMA, A. K.; KUMAR, S.; SAXENA, A. K.; PANDEY, A. K. Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant and anticancer activities, **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

MOFFA, M.; CALEFE, L. **Processo de obtenção de forma farmacêutica para tratamento de diabetes tipo 2, com base em extratos fitoterápicos concentrados e administrada por sistema multiparticulado**. BR1020150157690. 2017.

MOKASHI, P.; KHANNA, A.; PANDITA, N. Flavonoids from Enicostema littorale blume enhances glucose uptake of cells in insulin resistant human liver cancer (HepG2) cell line via IRS-1/PI3K/Akt pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 268-77, 2017.

MOLINA, M. F.; SANCHEZ-REUS, I.; IGLESIAS, I.; BENEDI, J. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 10, p. 1398-1402, 2003.

MONNIER, L.; MAS, E.; GINET, C.; MICHEL, F.; VILLON, L.; CRISTOL, J. P.; COLETTE, C. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. **JAMA**, v. 295, n. 14, p. 1681-7, 2006.

NATELLA, F.; NARDINI, M.; VIRGILI, F.; SCACCINI, C. Role of dietary polyphenols in the platelet aggregation network - a review of the in vitro studies. **Current Topics in Nutraceutical Research**, v. 4, n. 1, p. 1-22, 2006.

NOLAN, C. J.; DAMN, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 169-81, 2011.

OLDANI, M. D. **Herbal Formulations for Controlling Blood Glucose Levels in Patients with Diabetes**. Depositante: Mario Dominik Oldani. US20110217396A1. Depósito: 21 ago. 2007, Concessão: 08 set. 2011.

PANDEY, A. K.; MISHRA, A. K.; MISHRA, A. Antifungal and antioxidative potential of oil and extracts derived from leaves of Indian spice plant *Cinnamomum tamala*. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 58, n. 1, p.142-7, 2012.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-8, 2009.

PENG, C. H.; CHYAU, C. C.; WANG, C. J.; LIN, H. T.; HUANG, C. N.; KER, Y. B. *Abelmoschus esculentus* fractions potentially inhibited the pathogenic targets associated with diabetic renal epithelial to mesenchymal transition. **Food & Function**, v. 7, n. 2, p. 728-40, 2016.

PICCONI, F.; DI FLAVIANI, A.; MALANDRUCCO, I.; GIORDANI, I.; FRONTONI, S. Impact of glycemic variability on cardiovascular outcomes beyond glycosylated hemoglobin. Evidence and clinical perspectives. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 22, n. 9, p. 691-6, 2012.

QIN, S.; ROTTMAN, J. B.; MYERS, P.; KASSAM, N.; WEINBLATT, M.; LOETSCHER, M.; KOCH, A. E.; MOSER, B.; MACKAY, C. R. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 4, p. 746-54, 1998.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1439-52, 2006.

RAO, M. U.; SREENIVASULU, M.; CHENGAI AH, B.; REDDY, K. J.; CHETTY, C. M. Herbal medicines for diabetes mellitus: a review. **International Journal PharmTech Research**, v. 2, n. 3, p. 1883-92, 2010.

RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, S.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. **Inflammation & Allergy Drug Targets**, v. 8, n. 3, p.229-35, 2009.

ROBERTSON, R. P.; HARMON, J.; TRAN, P. O.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, H. Glucose toxicity in betacells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 581-7, 2003.

ROLIM, L. A. R.; NUNES, L. C. C.; LYRA, A. M.; ALVES, M. A.; BARROS, N. V. A.; BATISTA, P. N.; ROLIM NETO, P. J.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R.; SILVA, R. M. F.; OLIVEIRA, T. C. O. **Composição farmacêutica efervescente e uso de extrato etanólico de Bauhinia forficata.**, 2013. Categoria: Produto. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR1020130241504. Data de depósito: 24/09/2013.

SAKURABA, H.; MIZUKAMI, H.; YAGIHASHI, N.; WADA, R.; HANYU, C.; YAGIHASHI S. Reduced betacell mass and expression of oxidative stress-related DNA

damage in the islet of Japanese type II diabetic patients. **Diabetologia**, v. 45, n. 1, p. 85-96, 2002.

SALGUEIRO, A. C. F.; FOLMER, V.; DA SILVA, M. P.; MENDEZ, A. S. L.; ZEMOLIN, A. P. P.; POSSER, T.; FRANCO, J. L.; PUNTEL, R. L.; PUNTEL, G. O. Effects of *Bauhinia forficata* tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-10, 2015.

SANTOMAURO JÚNIOR, A. C.; UGOLINI, M. R.; SANTOMAURO, A. T.; DO SOUTO, R. P. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 1, p. 120-5, 2008.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 4, p. 287-306, 2005.

SESSO, H. D.; GAZIANO, J. M.; LIU, S.; BURING, J. E. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1400-8, 2003.

SHAW, J.; SICREE, R.; ZIMMET, P. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, n. 1, p. 4-14, 2010.

SHEN, S. Q.; ZHANG, Y.; XIANG, J. J.; XIONG, C. L. Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 13, p. 1953-61, 2007.

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2012.

SINGH, L. W. Traditional medicinal plants of Manipur as anti-diabetics. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 677-87, 2011.

SOLIMAN, G. Z. A. Anti-diabetic activity of dried *Moringa oleifera* leaves in normal and Streptozotocin (Stz)-induced diabetic male rats. **Indian Journal of Applied Research**, v. 3, n.9, p. 18-23, 2013.

TANG, H. L.; CHEN, C.; WANG, S. K.; SUN, G. J. Biochemical analysis and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 235-42, 2015.

TANIRA, M. O. M. Anti-diabetic medicinal plants; a review of the present status and future directions. **International Journal Diabetes**, v. 2, p. 15-22, 1994.

TOLOZA-ZAMBRANO, P.; AVELLO, M.; FERNANDEZ, P. Determination of rutin and trigonelline in extracts of *Bauhinia forficata* subsp *pruinosa* and hypoglycemic effect on

diabetic and prediabetic patients humans. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 14, n. 1, p. 21-32, 2015.

TORIMOTO, K.; OKADA, Y.; MORI, H.; TANAKA, Y. Relationship between fluctuations in glucose levels measured by continuous glucose monitoring and vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Cardiovascular Diabetology**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2013.

TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T. L. S.; SOARES, G. L. G.; RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155-63, 2012.

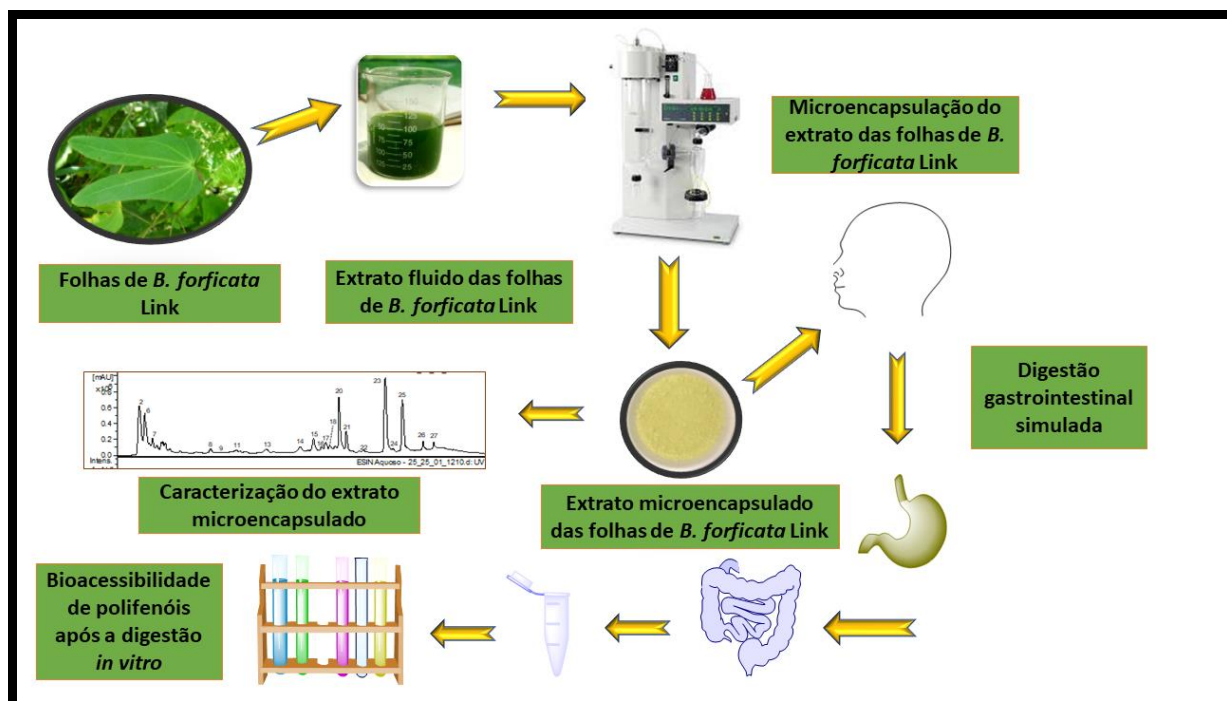
VERMA, N.; AMRESH, G.; SAHU, P. K.; RAO, C. H. V.; SINGH, A. P. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activity of ethyl acetate fraction of *Rhododendron arboretum* Smith flowers in streptozotocin induced diabetic rats and its role in regulating carbohydrate metabolism. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 9, p. 696-701, 2012.

VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, n. 60, p. 1-10, 2015.

WEIR, G. C.; BONNER-WEIR, S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. **Diabetes**, v. 53, s.3, p. 16-21, 2004.

YEON, J. Y.; BAE, Y. J.; KIM, E. Y.; LEE, E. J. Association between flavonoid intake and diabetes risk among the Koreans. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 225-30, 2015.

ZACCARON, C.; REMPEL, C.; STROHSCHOEN, A. A. G.; MORELO DAL BOSCO, S.; MORESCHI, C. Efeito da planta medicinal *Bauhinia forficata* (Link) nos indivíduos diabéticos tipo 2. **ConScientiae Saúde**, v. 13, n. 2, p. 171-8, 2014.



Capítulo 2

Microencapsulação e bioacessibilidade de polifenóis dos extratos aquosos das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* (Fabaceae)

- Periódico a ser enviado: Industrial Crops and Products
- Fator de Impacto: 3.181
- QUALIS A2 em Biotecnologia

Microencapsulação e bioacessibilidade de polifenóis dos extratos aquosos das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* (Fabaceae)

Bárbara Verônica Cardoso de Souza^{a, b}, Oskar Almeida Silva^b, Mariana de Moraes Sousa^c, José Augusto Gasparotto Sattler^d, Mirian Lima dos Santos^e, Ana Cristina Gramosa^e, Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho^e, Alessandra Braga Ribeiro^e, José de Sousa Lima Neto^e, Aldeídia Pereira de Oliveira^f, Julianne Viana Freire Portela^g, Stella Regina Arcanjo Medeiros^g, Fernando de Matos Borges^h, Mônica Larissa Sousa Cardoso^a, Iramaia Angelica Neri Numaⁱ, Maria do Carmo de Carvalho e Martins^j, Lívio César Cunha Nunes^{b, e, h}

^a*Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil*.*

^b*Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.*

^c*Departamento de Hospitalidade, Lazer e Produção Alimentícia, Instituto Federal do Piauí, Campus Zona Sul, São Pedro, Teresina, Piauí, Brasil.*

^d*Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil.*

^e*Coordenação do curso de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.*

^f*Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM), Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.*

^g*Coordenação do curso de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Picos, Piauí, Brasil.*

^h*Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.*

ⁱ*Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.*

^j*Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.*

*Autor correspondente

Departamento de Nutrição-CCS/UFPI, Ininga, CEP: 64048-455, Teresina, Piauí, Brasil

Telefone: + 55 86 99953 4243

Fax: + 55 86 3215 5690

E-mail: barbara.vscardoso@ufpi.edu.br

Resumo

A *Bauhinia forficata* Link *subsp. forficata* é uma planta medicinal, cujas folhas são usadas, principalmente, como hipoglicemiantes, devido à presença de polifenóis que atuam como antioxidantes e anti-inflamatórios. Entretanto, esses compostos possuem baixa biodisponibilidade, sendo necessários o uso de técnicas que preservem as suas atividades biológicas, como a microencapsulação. Assim, esse estudo teve como objetivo obter extratos microencapsulados a partir da fração aquosa das folhas de *B. forficata*, por meio de *spray drying* e caracterizá-los quanto ao teor de umidade, atividade de água, densidade, granulometria, reologia, morfologia (microscopia eletrônica de varredura), análises térmicas (calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria), difração de raio-X, espectrometria de infravermelho, análise de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas, além de avaliar a bioacessibilidade dos polifenóis por meio da digestão *in vitro* e sua atividade antioxidante. As microcápsulas apresentaram morfologias amorfas, adequadas à técnica de *spray drying*. Os extratos secos mostraram um comportamento reológico de redução de cisalhamento ($n < 1$). Os resultados da análise térmica sugeriram um aumento na estabilidade das microcápsulas. Os polifenóis e flavonoides foram bioacessíveis e apresentaram capacidade antioxidante após o processo de digestão *in vitro*. Portanto, a microencapsulação desses extratos é uma opção viável para a preservação de compostos bioativos, tornando-os bioacessíveis e com atividade antioxidante, os quais podem ser aplicados em novas formulações farmacêuticas e produtos nutracêuticos.

Palavras-chave: Planta medicinal. Secagem por atomização. Biocompostos. Digestão simulada. Capacidade antioxidante.

1 Introdução

Bauhinia forficata Link subsp. *forficata* é uma planta medicinal, pertencente à família *Fabaceae*, conhecida popularmente como "pata de vaca", cujas folhas são usadas, principalmente, como hipoglicemiantes (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012). Além desse efeito, outras atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatórias e hepatoprotetoras também são relatadas, sendo tais propriedades atribuídas aos polifenóis, principais constituintes químicos desta planta (BODAKHE; RAM, 2007; DA CUNHA, et al., 2010; DAMASCENO et al., 2004; ECKER et al., 2017; GUPTA et al., 2004).

Os polifenóis são biocompostos de materiais vegetais, que incluem ácidos fenólicos e flavonoides (CARLONI et al., 2013; KOMES et al., 2010; SASIKALA et al., 2018), que inibem a peroxidação lipídica e interceptam os radicais livres, inibindo processos oxidativos (DATTA et al., 2011). Apesar de ampla distribuição, a biodisponibilidade destes compostos é baixa, sendo influenciada por fatores como cultivo, tempo de colheita e posição das folhas na planta, bem como por tecnologias de processamento, com consequente redução de seus benefícios antioxidantes (BAKKALBASSI et al., 2008; YANG et al., 2015; MÄKILÄ et al., 2017). Assim, sua proteção com agentes encapsulantes torna-se necessário para uma melhor utilização desses compostos pelo organismo (D'ARCHIVIO et al., 2010; ERSUS; YURDAGEL, 2007; JAFARI et al., 2008; WANG; LI; BI, 2017).

A técnica de microencapsulação mais comum para bioativos é a secagem por atomização, devido à sua viabilidade econômica, com menor despesas operacionais, quando comparada à liofilização e à secagem a vácuo (MEDINA-TORRES et al., 2016; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007). Possui também alta eficiência no encapsulamento, baixo teor de umidade e atividade de água, sendo eficaz para melhorar a estabilidade e solubilidade de polifenóis, causando uma melhor conservação e um aumento no prazo de validade de produtos submetidos a essa técnica, tornando-os mais resistentes às reações de escurecimento e hidrólise, oxidação lipídica, auto oxidação e outras atividades enzimáticas (MARQUES; FERREIRA; FREIRE, 2007; ÖZKAN; BILEK, 2014; ROCHA et al., 2012; TAN et al., 2011).

Esse processo de encapsulação consiste na conversão de suspensões de água em micropartículas em pó, que são compostas por um material de parede e um núcleo (material encapsulado) (BAKRY et al., 2016; REINECCIUS, 1988). O material de parede é um fator determinante na eficiência de microencapsulação e estabilidade dos pós obtidos

(KANDANSAMY; SOMASUNDARAM, 2012). Dentre os mais utilizados para soluções extrativas vegetais, destacam-se o dióxido de silício coloidal, que diminui a umidade residual, bem como a higroscopicidade, otimizando as condições de secagem e a maltodextrina que possui baixo custo, alta solubilidade em água e baixa viscosidade em soluções aquosas (AMADO et al., 2014; MEDINA-TORRES et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2005).

A técnica de microencapsulação tem sido bastante utilizada para alcançar estabilidade de polifenóis e preservar sua bioatividade (KHAZAEI et al., 2014; MAHDAVI et al., 2014), bem a utilização das folhas de *B. forficata*, devido às suas propriedades biológicas. No entanto, a maioria dos estudos tem focado nas folhas frescas ou extratos fluidos, com ênfase na extração por solventes orgânicos (CECHINEL-ZANCHETT; DE ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2018; DE SOUZA et al., 2018), sendo que ainda há poucos relatos sobre os perfis fenólicos e atividades antioxidantes de extratos secos microencapsulados, a partir de extratos aquosos das folhas dessa subespécie vegetal.

Apesar dos relatos sobre os benefícios desses compostos, a sua eficácia só pode ser confirmada com estudos sobre sua biodisponibilidade, pois esta é influenciada por uma variedade de fatores, tais como estrutura dos fitoquímicos, ação mecânica, alterações do pH e atividade enzimática no trato gastrointestinal. Qualquer composto pode ser considerado potencialmente eficaz para a saúde humana, mas somente se permanecer bioacessível, após todas as fases envolvidas na digestão gastrointestinal, por isso o conteúdo biodisponível para a absorção deve ser avaliada (CELEP et al., 2017; REIN et al., 2013).

Os modelos de digestão *in vitro* para simular o meio no trato gastrointestinal representa uma alternativa simples, rápida e válida para avaliar a bioacessibilidade dos compostos bioativos, de uma forma menos dispendiosa e demorada em relação aos modelos *in vivo*, pois são métodos facilmente conduzidos com resultados reproduzíveis sem necessitar de aprovação de comitê de ética, apresentando correlações com estudos *in vivo* e clínicos (ALMINGER et al., 2014; GULLON et al., 2015).

Diante desse fato, este estudo teve como objetivo obter extratos secos, a partir da fração aquosa das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*, por meio da microencapsulação por *spray drying* e caracterizá-los quanto ao teor de umidade, atividade de água, densidade, granulometria, reologia, morfologia (microscopia eletrônica de varredura), análises térmicas (calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria), difração de raios-X, espectrometria de infravermelho, análise de cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas, além de avaliar a bioacessibilidade dos polifenóis por meio da digestão *in vitro* e sua atividade antioxidante.

2 Material e Métodos

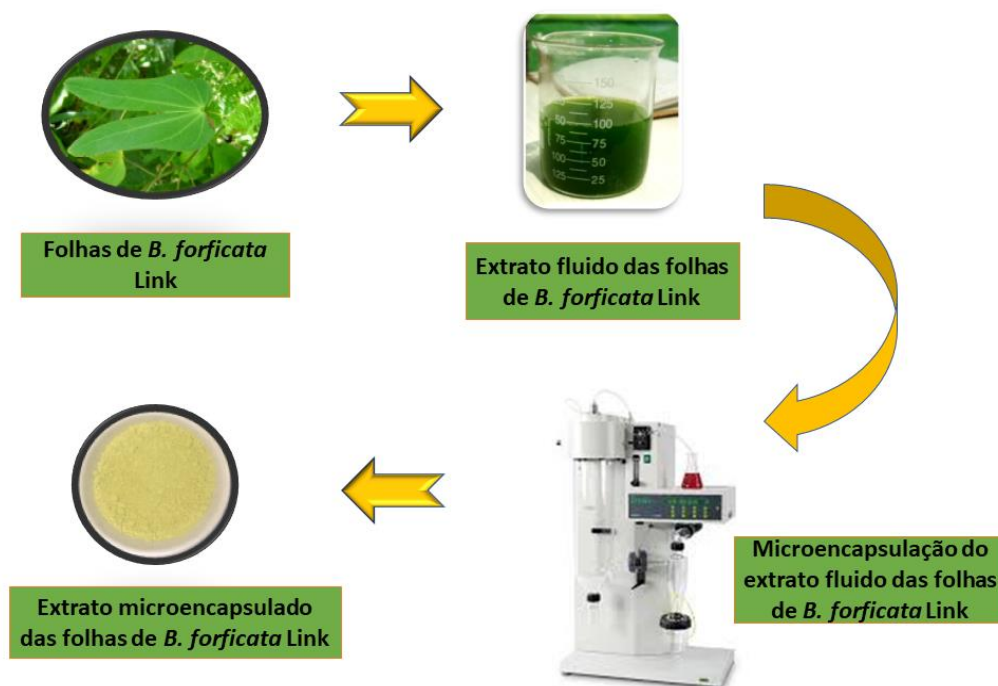
2.1 Material vegetal, reagentes, padrões e soluções

As folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* foram obtidas, em Teresina, Piauí, Brasil (5°03'7.2" S 42°77'26.4" O), durante o mês de janeiro de 2018. A exsicata do material vegetal está depositada no Herbário Graziela Barroso, da Universidade Federal do Piauí, sob voucher nº 31423. Os compostos químicos utilizados nas determinações de substâncias bioativas, ensaios da capacidade antioxidante e as enzimas para o teste da bioacessibilidade foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA) e os reagentes de grau CLAE da Merck® (Darmstadt, Alemanha). As soluções eletrolíticas, fluidos fisiológicos salivares, gástricos e intestinais e as soluções enzimáticas foram preparadas conforme Fogliano et al. (2011) e Minekus et al. (2014).

2.2 Preparo dos extratos aquosos e secos das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*

As folhas de *B. forficata* Link subsp. *forficata* foram submetidas à secagem em estufa industrial, a uma temperatura de 40 °C, durante 52 h e, posteriormente foram pulverizadas em moinho. Os extratos aquosos obtidos por decocção (EFDC) e por infusão (EFIN) foram preparados na proporção de 10% (m/v), conforme Menezes et al. (2007) para esta espécie vegetal. Antes da secagem dos extratos por *spray drying*, determinou-se o resíduo seco segundo a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). O processo de secagem dos extratos foi realizado utilizando-se um *spray-dryer* BUCHI B-290. Às soluções extrativas, constituídas de 70% de material vegetal, calculado de acordo com o resíduo seco (0,0315 g/mL) foram adicionados os adjuvantes de secagem ou agentes encapsulantes (maltodextrina e dióxido de silício coloidal) e, sob homogeneização, em agitador magnético, a preparação foi submetida ao aparelho nas seguintes condições: temperatura de entrada 110 °C, velocidade de fluxo 5,4 mL/min, injeção 15%, pressão de 0,9 barr e aspensão em 70% (Figura 1).

Figura 1- Obtenção dos extratos microencapsulados das folhas de *B. forficata* Link subsp. *forficata* por *spray drying*.



Fonte: Autoria própria (2018)

A concentração dos agentes encapsulantes foi de 30% (15% de dióxido de silício coloidal e 15% de maltodextrina), obtida por meio de um planejamento fatorial 2^2 de acordo com Rolim et al. (2013), no qual obteve-se uma maior encapsulação e proteção dos constituintes bioativos dos extratos. Após a microencapsulação, os extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) foram armazenados em tubos Falcons e mantidos em dessecador provido de sílica para análises posteriores. O desempenho do processo de secagem (%DS) foi determinado de acordo com a equação (1):

$$\%DS = \frac{[\text{Peso das microcápsulas obtidas depois da secagem}]}{[(\text{Peso inicial do material de parede} + \text{extratos fluidos})] \times 100} \quad (1)$$

2.3 Umidade

O teor de umidade foi realizado no Laboratório de Alimentos, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sendo quantificado por meio do método gravimétrico, no qual pesou-se três gramas de cada amostra e estas foram secas em estufa a

105 °C por três horas, resfriadas em dessecador e, então, pesadas. Este procedimento foi repetido até obtenção de peso constante, de acordo com métodos descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2012).

2.4 Atividade de água

A atividade de água das amostras foi realizada no Laboratório de Alimentos, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí (UFPI), a qual foi determinada, segundo a AOAC (2012), utilizando-se o medidor de atividade de água (Aw) (marca Novasina, Aqualab, São José dos Campos, Brasil). Aguardou-se 30 minutos para a estabilização da atmosfera e depois as amostras foram colocadas no aparelho.

2.5 Densidade

A densidade foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí (UFPI), a qual foi determinada em um compactador automático (Densímetro Copley IV 2000®). O pó contido na proveta foi submetido a 500, 750 e 1250 compactações e os parâmetros de análise foram 300 batidas/minuto, de acordo com Schüssele e Bauer-Brandl (2003). O procedimento foi realizado até a obtenção de um volume de pós em variação entre as leituras. A relação entre a massa das amostras e o volume ocupado pelo pó antes e após a compactação determinou as densidades bruta (db) e compactada (dc). A avaliação da compactação do pó foi realizada através da razão de Hausner (Hr) e índice de Carr (%IC), utilizando as equações (2) e (3):

$$Hr = \frac{\textit{densidade compactada}}{\textit{densidade aparente}} \quad (2)$$

$$(\%IC) = \frac{(dc - db)}{dc} \times 100 \quad (3)$$

2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O estudo da microestrutura e avaliação da morfologia e superfície dos extratos secos ESDC e ESIN foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, do

Instituto Federal do Piauí-IFPI, no equipamento MEV (Shimadzu SSX-550 Superscan[®]). As amostras foram fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 15 min (Metalizador Baltec[®] SCD 050), com a finalidade de tornar o material eletricamente condutor. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma atmosfera de plasma com os gases N₂ – H₂ com fluxos definidos e o controle da temperatura em torno de 300 °C por 1 hora. As eletromicrografias foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 15kV e 25kV.

2.7 Granulometria

A granulometria dos extratos secos foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Piauí (UFPI), utilizando tamises padronizados e superpostos em ordem decrescente de tamanho de poros (20, 40, 60, 80 e 120mesh), montados sobre uma base com vibração magnética (Tamisador Bertel[®]). Adicionou-se uma amostra de 30 g no tamis superior e o conjunto foi submetido a tamisação por 15 minutos em amplitude 8. Após a tamisação, as frações retidas em cada tamis foram pesadas e as porcentagens do material retido foram calculadas. A determinação do tamanho médio das partículas do pó dos ESDC e ESIN foi efetuada de acordo com o método da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010).

2.8 Propriedades reológicas

As análises reológicas foram realizadas no Laboratório de Frutos, do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará. O comportamento reológico dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de *B. forficata* Link subsp. *forficata* foi determinado segundo Medina-Torres et al. (2016), por meio de um reômetro rotacional de cilindros concêntricos tipo *Searle* da *Brookfield*, modelo R/S plus SST 2000.

As medidas foram realizadas na temperatura de 25 °C, a qual foi ajustada através de um banho termostático acoplado ao equipamento, que forneceu os dados de tensão de cisalhamento e taxa de deformação utilizando o software RHEO V 2.8. As análises reológicas foram obtidas com variação da taxa de deformação de 0 a 500s⁻¹ (curva ascendente) e de 500 a 0s⁻¹ (curva descendente), com um tempo de 1 minuto e leitura de 25 pontos para cada curva. As leituras foram realizadas em triplicata e em cada medida foi utilizada uma nova amostra. Foram traçadas as curvas da viscosidade aparente das amostras em função das taxas de deformação, utilizando-se os dados experimentais de viscosidade e valores teóricos calculados

a partir do melhor modelo (Ostwald-de-Waelle).

2.9 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV), da Universidade Federal do Piauí. As curvas de DSC foram obtidas em um módulo calorimétrico exploratório diferencial DSC 910 (TA - Instruments) (tipo fluxo de calor), acoplado a um analisador térmico TA2000 (TA - Instruments). Nos ensaios, utilizou-se suporte de amostra de alumínio, atmosfera de ar e nitrogênio.

O equipamento foi previamente calibrado para temperatura utilizando como padrões os pontos de fusão de índio (156,4 °C) e zinco (419,5 °C) metálicos, com pureza de 99,99%. A calibração para energia foi efetivada com base na entalpia de fusão do índio metálico, $\Delta H_{fus} = 28,5 \text{ Jg}^{-1}$. Foram calculados os fatores de correção conforme procedimento e especificação do fabricante. Para demonstração da influência dos diferentes parâmetros, foi utilizado massa de cada amostra no valor de 3,0 mg, aquecida sob atmosfera dinâmica de ar sintético (100 mL.min⁻¹), variando a razão de aquecimento de 2,5; 5,0; 10; 15; 20 e 40 °C min⁻¹ para cada amostra do ESDC e ESIN, segundo método proposto por Bazzo e Silva (2005).

2.10 Termogravimetria (TG)

As análises foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV), da Universidade Federal do Piauí, de acordo Bazzo e Silva (2005). As curvas termogravimétricas das amostras foram obtidas em triplicata por meio de termobalança, modelo DTG- 60H acoplado ao aparato DTA-TG, sob atmosfera de nitrogênio, fluxo de 50 mL.min⁻¹, razão de aquecimento 10°C.min⁻¹. As massas das amostras foram cerca de 5 mg, acondicionadas em cadinho de alumínio. Verificou-se a calibração do instrumento empregando-se uma amostra de oxalato de cálcio.

2.11 Difração de raio-X (DRX)

As análises de difração de raio-X foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia do Instituto Federal do Piauí, segundo Pumacahua-Ramos et al. (2015). As amostras foram fixadas em suporte de vidro com fina camada de material em pó sem solvente. Os

difratogramas dos extratos seco da decocção (ESDC) e extrato seco da infusão (ESIN) foram obtidos em difratômetro Shimadzu®, modelo XRD6000, equipado com ânodo de cobre, usando voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA. A amostra foi analisada no intervalo de ângulo 2θ de 5 – 75° a uma velocidade de digitalização de 2°/min.

2.12 *Análise por espectrometria de infravermelho (IV-TF)*

As análises por espectrometria de infravermelho foram realizadas no laboratório de Espectrometria da Universidade Estadual do Piauí, de acordo com a metodologia proposta por Pumacahua-Ramos et al. (2015). Os espectros de infravermelho de ESDC e ESIN foram obtidos no equipamento Spectrum 400 da Perkin Elmer® com dispositivo de refletância total atenuada (ATR) (Miracle ATR, Pike Technologies Spectroscopic Creativity) com cristal de selênio. A resolução utilizada foi de 4 cm⁻¹ na faixa de 4000 – 500 cm⁻¹, pela técnica de pastilhas de KBr.

2.13 *Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas - CLAE-MSⁿ*

Os extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por *electrospray* e analisador de armadilha de íons (CLAE-PDA-ESI-IT-MSⁿ), no Laboratório de Bromatologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo (USP), segundo Cuyckens e Claeys (2004), utilizando uma coluna de fase reversa Luna C18 (2) HST (100 × 3,0 mm, 2,5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA).

As amostras foram filtradas com filtro de nylon 0,22 µm (Millipore, São Paulo, Brasil) e 20 µL foram injetados no sistema de CLAE. A fase móvel foi constituída de água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), sendo executada a uma taxa de fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. Um programa de gradiente de 22 minutos foi usado no estudo, iniciando com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila (95:5, v/v), seguido por aceleração até 8% de acetonitrila em 5 min, aumentando para 15% em 8 min, mantendo-se nessa razão por 2 min, e então subindo para 20% de acetonitrila em 12 min, depois para 35% em 15 min e finalmente houve um decréscimo na proporção de acetonitrila para 5%.

O sistema cromatográfico foi um Shimadzu (modelo LC-20ADX Proeminence; Kyoto,

Japão) equipado com duas bombas de alta pressão e PAD acoplado ao espectrômetro de massa Bruker (modelo Amazon Speed; Billerica, MA, EUA) com analisador de armadilha de íons e ionização por *electrospray* (ESI) operado em modo negativo e controlado pelo software HyStar sob a seguinte condição: voltagem capilar, 3,5 kv; temperatura seca, 230°C; fluxo de gás de dessolvatação (N₂), 360 L / h; o intervalo m / z foi de 100-1000. As amostras foram injetadas em triplicata e os polifenóis e flavonoides foram identificados correlacionando seus íons moleculares (m/z) e fragmentos principais com os padrões comerciais (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA).

2.14 Simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal

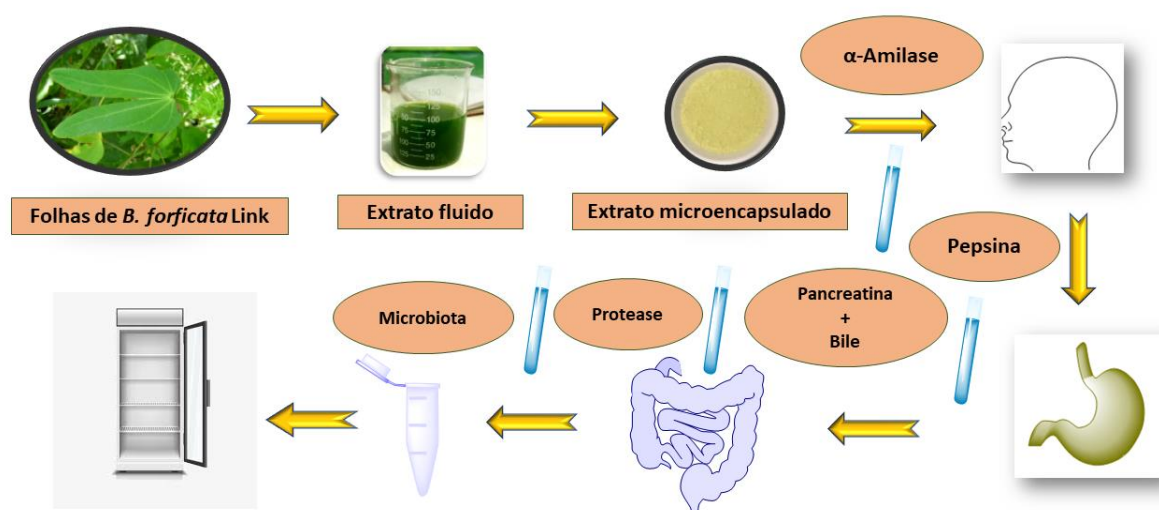
A digestão *in vitro* dos extratos secos microencapsulados das folhas de *B. forficata* Link subsp. *forficata*, foi realizada no Laboratório de Análises de Alimentos do Instituto Federal do Piauí (IFPI). O processo de digestão simulado ocorreu em quatro etapas: oral, gástrica, duodenal e simulação da ação enzimática da microbiota colônica, conforme protocolos de Fogliano et al. (2011) e Minekus et al. (2014). Os Fluido Salivar Simulado (FSS), Fluido Gástrico Simulado (FGS) e Líquido Intestinal Simulado (FIS) foram constituídos pelas soluções de eletrólitos, enzimas, CaCl₂ e água.

Na fase oral, 0,5 g de cada extrato seco da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) foram dissolvidos em 2,5 mL de água e adicionados 3,5 mL de solução salivar fisiológica, 0,5 mL de α -amilase, 25 μ L de CaCl₂ e 975 mL de água, colocados em banho-maria por dois minutos, a 37 °C, pH 7,0. Após a essa etapa, o tubo falcon com a amostra foi centrifugado a 2177,28 g por 40 minutos, o material digerido com a α -amilase foi armazenado para análise posterior, enquanto o sedimento foi misturados com 7,5 mL de FGS, 1,6 mL de solução de pepsina, 5 μ L de 0,3 M CaCl₂, 0,2 mL de HCl 6 M para atingir pH 3,0 e 695 μ L de água (banho-maria por duas horas, a 37 °C, pH 3,0).

Após a digestão, o tubo foi centrifugado a 2177,28 g por 40 minutos, o material digerido com pepsina foi retirado para análise posterior, enquanto o sedimento foi dissolvido em 11 mL de FIS, 5 mL de pancreatina, 2,5 mL de bile, 40 μ L de 0,3 M CaCl₂, 0,15 mL de NaOH 1 M até atingir o pH 7,0 e 1,31 mL de água (banho-maria por duas horas, a 37 °C, pH 7,0). Em seguida, a amostra digerida foi centrifugada e o sobrenadante armazenado. Ao resíduo oriundo dessa fase foi adicionada 2 mL de protease (banho-maria por uma hora, 37 °C, pH 8,0). Após a centrifugação e separação do sobrenadante, a amostra digerida foi finalmente tratada com 100 μ L de Viscozyme.g⁻¹ (complexo multienzimático contendo uma

ampla gama de carboidrases, incluindo arabanase, celulase, β -glicanase, hemicelulase e xilanase) e colocada em banho-maria por uma hora, a 37° C e pH 4,0. Para todas as etapas da digestão foi preparado branco, sem adição de amostras, para evitar a superestimação na quantificação dos compostos analisados (Figura 2).

Figura 2- Simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal dos extratos microencapsulados das folhas de *B. forficata* Link subsp. *forficata*.



Fonte: Autoria própria (2019).

2.15 Teor polifenóis totais (PT) e flavonoides totais (FT)

As amostras digeridas em cada fase do processo de digestão *in vitro* foram analisadas quanto ao teor de polifenóis totais e flavonoides totais, sendo realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos do Instituto Federal do Piauí (IFPI). Os polifenóis totais foram analisados por *Folin Ciocalteu* em meio alcalino, medido a 720nm em espectrofotômetro UV-VIS e expressos em mg de ácido gálico.g⁻¹ de amostra, de acordo com Swain e Hills (1959). Os flavonoides totais foram quantificados pelo método do tricloreto de alumínio (AlCl₃), segundo Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999) e foram medidos a 510nm em espectrofotômetro UV-VIS e expressos em mg de catequina.g⁻¹ de amostra.

2.16 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante total (CAT) dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN), após a digestão *in vitro*, foi estimada por dois diferentes ensaios: poder de

redução do íon ferro (FRAP) e pela capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC). A avaliação da capacidade redutora do ferro (FRAP) foi realizada no Laboratório de Análises de Alimentos do Instituto Federal do Piauí (IFPI), segundo Arnous et al. (2002), na qual as amostras reagiram por 30 minutos com solução de cloreto de ferro (3 mM), em banho-maria a 37 °C e depois adicionou-as na solução ácida de 2, 4, 6 – tripiridil -1, 3, 5 – triazina (TPTZ), sendo os resultados expressos em TEAC, em $\mu\text{mol de Trolox.g}^{-1}$ de amostra.

O ensaio ORAC foi realizado no Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos, do Departamento de Ciências de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), conforme os métodos descritos por Prior, Hoang, Gu (2003) e Dávalos, Gómez-Cordovés, Bartolomé (2004), com modificações. Os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol de Trolox.mg}^{-1}$ de amostra).

2.17 Avaliação do índice de bioacessibilidade dos compostos antioxidantes

Para avaliar as alterações nos compostos bioativos, ao longo da digestão gastrointestinal *in vitro*, os índices de bioacessibilidade (IB) foram calculados de acordo com a Equação (4), segundo Ortega et al., 2011).

$$IB(\%) = \frac{100xB}{C} \quad (4)$$

Onde B é o teor de polifenóis ou flavonoides ou atividade antioxidante pelos ensaios FRAP e ORAC, quantificados no sobrenadante após processo de digestão, e C, a quantidade desses compostos antes da digestão, expressa nas mesmas unidades.

2.18 Análise estatística

Os resultados dos compostos bioativos e da atividade antioxidante foram apresentados como médias \pm desvios padrão. Os dados foram analisados por meio do teste t-student, análise de variância (ANOVA) two-way, seguidos pelo teste de Tukey, utilizando os softwares OriginPro (versão 8) e o GraphPad Prism (versão 6.0), com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3 Resultados e discussão

3.1 Rendimento percentual da secagem, teor de umidade, atividade de água, densidade, razão de Hausner e índice de Carr

Os resultados do desempenho de secagem, umidade, atividade de água, densidade, razão de Hausner e índice de Carr dos ESDC e ESIN das folhas de *B. forficata* Link subsp. *forficata* estão demonstrados na Tabela 1. A média geral dos rendimentos dos extratos secos de *B. forficata* por *spray drying* foi $62,73 \pm 3,93\%$ (ESDC) e $57,30 \pm 1,80\%$ (ESIN), sendo uma secagem eficiente, segundo Bhandari et al. (1997), por ser superior a 50%.

Tabela 1- Resultados do desempenho de secagem, umidade, atividade de água, densidade, razão de Hausner e índice de Carr dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.

Parâmetros	ESDC	ESIN
Rendimento (%)	$62,73 \pm 3,93^a$	$57,30 \pm 1,80^a$
Umidade (%)	$5,38 \pm 0,08^a$	$7,79 \pm 0,12^b$
Aw	$0,37 \pm 0,01^a$	$0,49 \pm 0,01^b$
Densidade bruta (g/cm³)	$0,31 \pm 0,05^a$	$0,29 \pm 0,04^a$
Densidade compactada (g/cm³)	$0,38 \pm 0,01^a$	$0,36 \pm 0,02^a$
Razão de Hausner	$1,25 \pm 0,10^a$	$1,24 \pm 0,17^a$
Índice de Carr (%)	$18,61 \pm 11,02^a$	$19,00 \pm 6,66^a$

Resultados expressos como médias \pm desvios padrão (n=3). ESDC: Extrato seco da decocção. ESIN: Extrato seco da infusão. Aw: Atividade de água. Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística significativa entre os extratos. Teste t-student (p<0,05).

Fonte: Autoria própria (2018).

Vale ressaltar que a perda de pó durante a secagem por *spray drying* pode ser devido ao depósito de algumas partículas do pó na parede da câmara de secagem e no filtro do secador. Resultado semelhante foi obtido por Fang e Bhandari (2011), no qual a taxa de recuperação do pó seco de *bayberry* foi de $55 \pm 3\%$. Infusões de *Cinnamomum zeylanicum* e de *Quercus resinosa* microencapsuladas com maltodextrina tiveram um rendimento menor, 49,60% e 25%, de acordo com estudos realizados por Gallegos-Infante et al. (2013) e Santiago-Adame et al. (2015).

O teor de umidade dos pós obtido foi $5,38 \pm 0,08g.100g^{-1}$ e $7,79 \pm 0,12g.100g^{-1}$ para os ESDC e ESIN, respectivamente, com diferença estatisticamente significativa entre ambos, corroborando com os estudos de Araújo, Teixeira, Freitas (2010), Marreto, Freire, Freitas (2006) e Souza et al. (2007) que também mostraram valores de umidade dentro da faixa de 3 a 8% para extratos secos. Com relação à atividade de água, os valores foram inferiores a 0,5,

sendo estes considerados baixos ($\leq 0,75$) de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), apresentando estabilidade química e microbiológica.

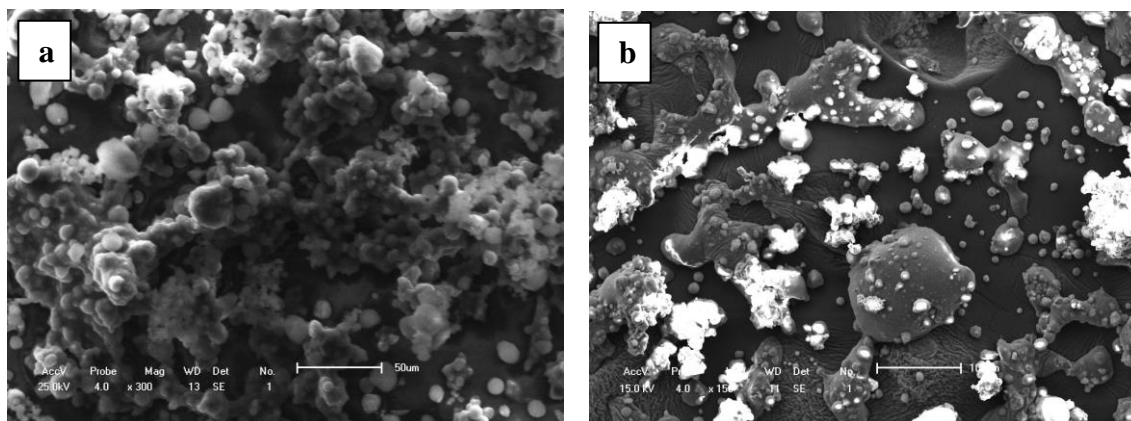
Os valores de densidade estiveram na faixa de 0,31 a 0,38g/cm³. Resultados similares foram obtidos por Medina-Torres et al. (2016), em infusões de *Litsea glaucescens* secas por pulverização, com valores de densidade na faixa de 0,30 a 0,33g/cm³ e por Couto et al. (2011) em extratos secos de *Eugenia dysenterica* (0,18 a 0,38 g/cm³).

Avaliaram-se também a razão de Hausner e o índice de Carr, que são medidas indiretas da densidade do pó. As razões de Hausner (Hr) foram semelhantes entre os extratos, possuindo um fluxo regular ($Hr \leq 1,25$). O índice Carr (%IC) variou de 18,0 a 20,0%, possuindo uma compressão satisfatória (18–21%). Esses valores de Hr e %IC caracterizam os pós como não coeso, de fluxo regular e boa compressão, de acordo com Borini, Andrade e Freitas (2009). Islam et al. (2017), em estudo realizado com pós de suco de laranja, obtiveram valores de %IC de 22,50–23,59% e Hr na faixa de 1,23–1,30, o que indicou um pó não coeso e de fluxo livre.

3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

De acordo com as fotomicrografias dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN), as microcápsulas mostraram forma esférica, com tendência a aglomerações, que podem estar relacionadas com as forças de Van der Waals das partículas com as moléculas de água, típicas de partículas secas por pulverização (Figura 3).

Figura 3 - Fotomicrografias dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.



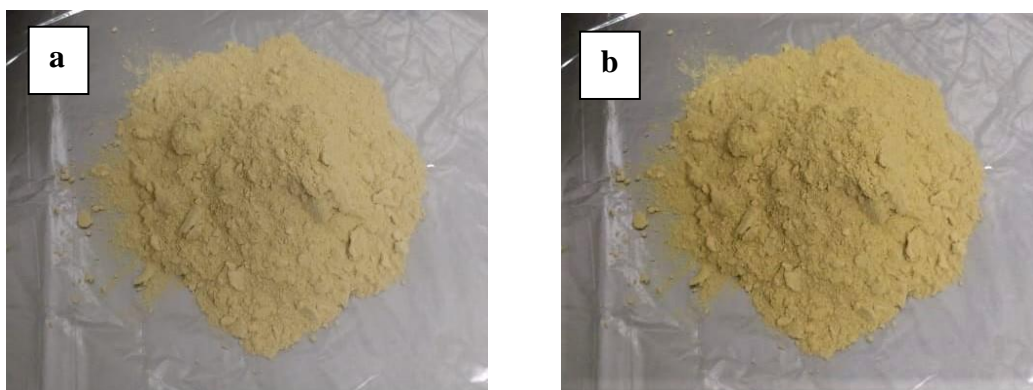
(a) ESDC: Extrato seco da decocção. (b) ESIN: Extrato seco da infusão.
Fonte: Autoria própria (2018).

As irregularidades morfológicas na superfície das microcápsulas podem ser atribuídas à rápida evaporação de gotículas líquidas, o que causa encolhimento das partículas com a liberação de pequenas quantidades de ar que foram presos dentro das microcápsulas durante o processo de secagem (MEDINA-TORRES et al., 2016). Da Cunha et al., (2010) também caracterizaram por MEV um extrato seco por spray drying de *B. forficata* Link e observaram partículas aglomeradas, esféricas com superfícies lisas e com forma irregular e rugosidade superficial.

3.3 Granulometria

As imagens das microcápsulas obtidas a partir dos extratos aquosos das folhas de *B. forficata* Link subsp. *forficata* ESDC e ESIN podem ser observadas na Figura 4.

Figura 4 – Imagens de microcápsulas obtidas dos extratos secos das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.



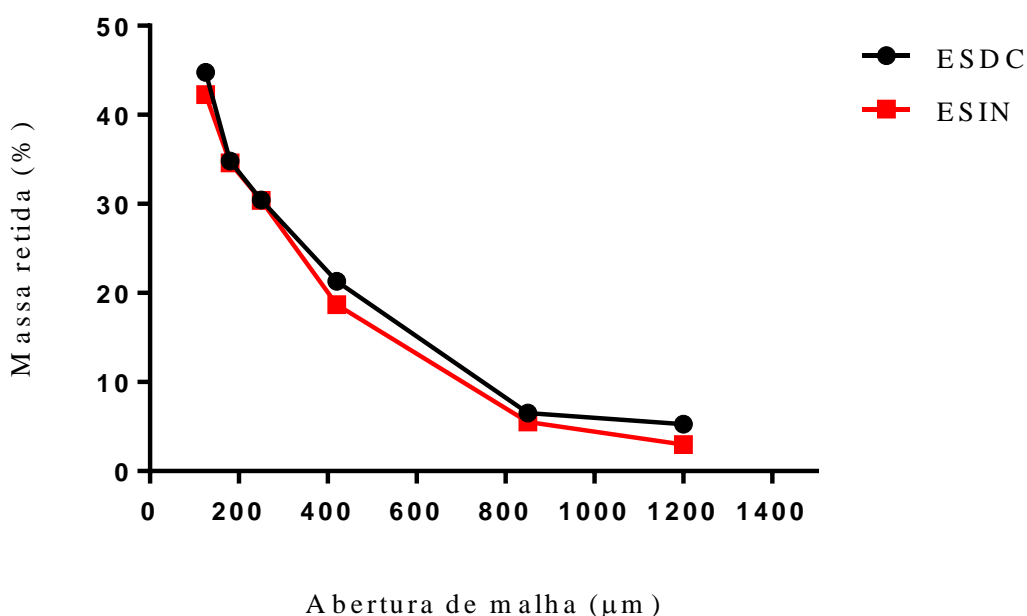
(a) ESDC: Extrato seco da decocção. (b) ESIN: Extrato seco da infusão.
Fonte: Autoria própria (2018).

O estudo de distribuição granulométrica foi realizado pela técnica de tamisação e os resultados demonstraram que os extratos ESDC e ESIN possuíam um tamanho médio de partícula de 0,179 e 0,202 μm , respectivamente, representando 44,8 e 42,2% da massa retida, sem diferença estatística entre eles ($p > 0,05$) (Figura 5).

De acordo com Arpagaus, John, Collenberg (2017) cápsulas menores que 1 μm de diâmetro podem ser classificadas como nanocápsulas, portanto ambos extratos estavam adequados para a incorporação em cápsulas e comprimidos, sendo classificado como pó fino pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Contudo, vale destacar a tendência que esses materiais possuíam em formar aglomerados, como foi observado nas análises morfológicas no

MEV, o que pode justificar a maior resistência das partículas em atravessar os tamises de menor abertura de malha.

Figura 5 – Granulometria dos extratos secos da decoção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.



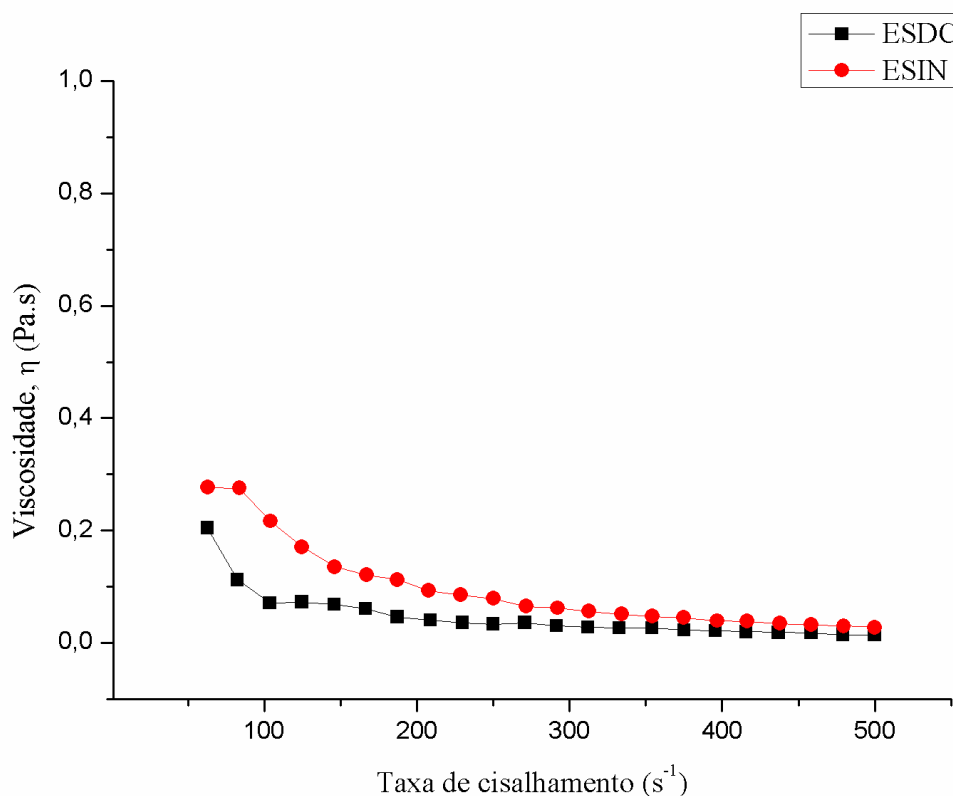
ESDC: Extrato seco da decoção. ESIN: Extrato seco da infusão. Teste *t-student* ($p < 0,05$), não houve diferença estatística significativa entre os extratos.

Fonte: Autoria própria (2018).

3.4 Propriedades reológicas

No reograma, com as curvas de escoamento em regime de cisalhamento simples, observou-se, para todas as amostras, um comportamento pseudoplástico ($n < 1$) (Figura 6). O ESIN mostrou maior viscosidade, em relação ao ESDC, nas mesmas condições de secagem, que pode estar associada a partículas modais maiores, promovendo mais resistência ao fluxo, como também pela influência dos pesos moleculares dos compostos bioativos presentes nesse extrato, de acordo com Hill e Carrington (2006). Em altas taxas de cisalhamento ($\gamma > 400 \text{ s}^{-1}$), ambas as amostras se sobrepuseram, observando-se que as viscosidades aparentes diminuíram, tornando-as mais fluidas, comportamento característico de fluidos pseudoplásticos. Estudos que utilizaram a secagem por *spray drying* de infusões de *Litsea glaucescens* e *Cinnamomum zeylanicum* relataram resultados semelhantes (MEDINA-TORRES et al., 2016; SANTIAGO-ADAME et al., 2015).

Figura 6 – Reologia dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.

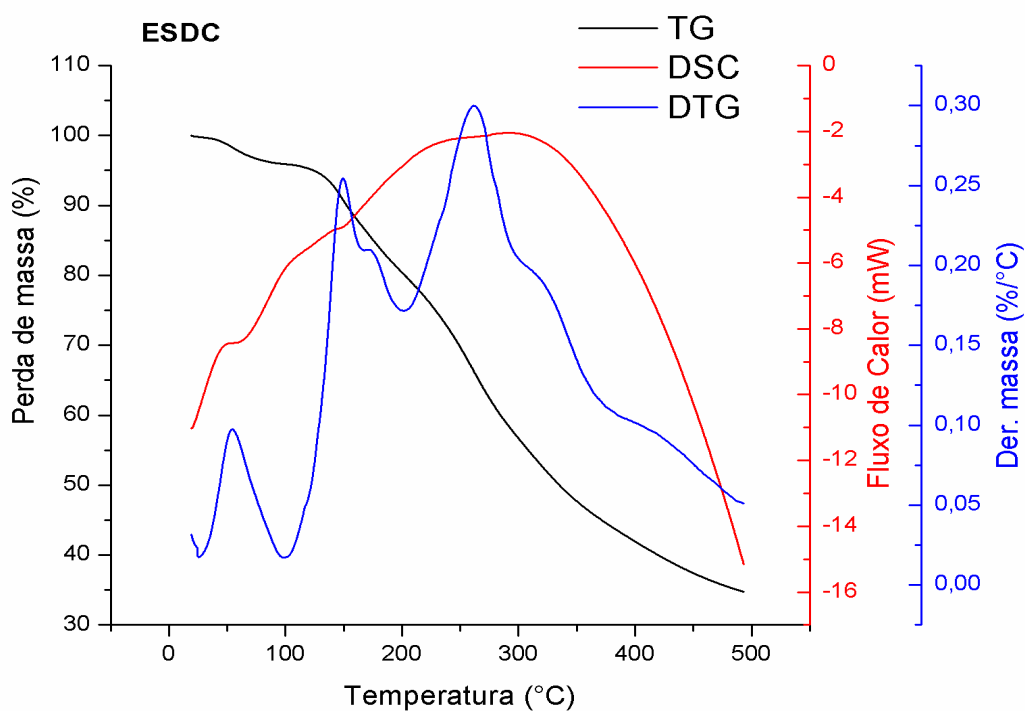


ESDC: Extrato seco da decocção. ESIN: Extrato seco da infusão.
 Fonte: Autoria própria (2018).

3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)

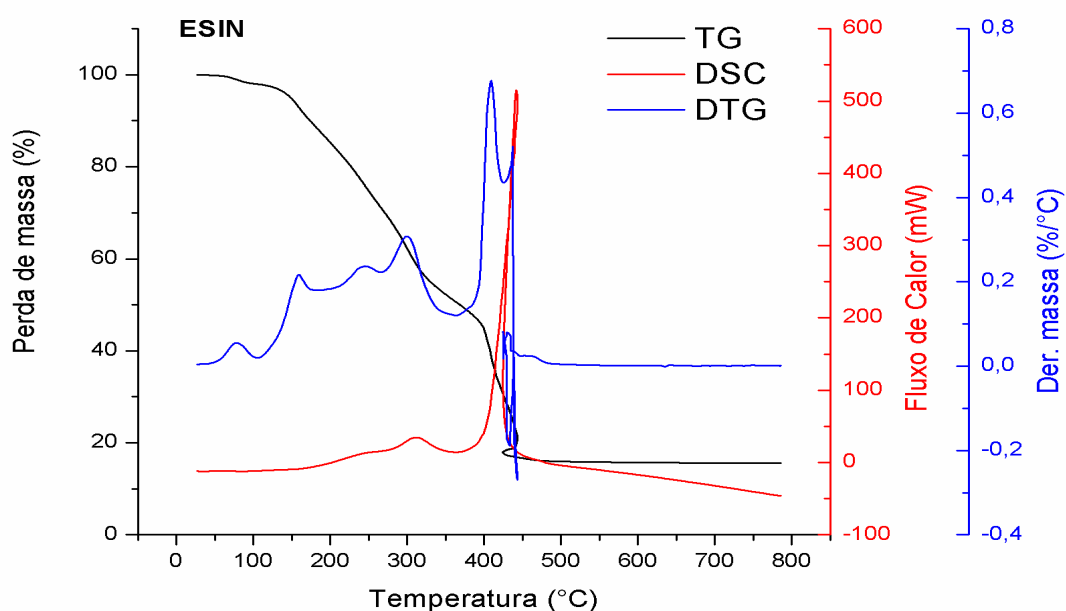
Nas Figuras 7 e 8 são apresentadas as curvas da análise termogravimétrica (TG), curvas das derivadas da TG (DTG) e da calorimetria exploratória diferencial (DSC). Observou-se que até a temperatura de 400 °C, a amostra ESDC apresentou seis processos de perda de massa e a amostra ESIN apresentou quatro, sendo uma perda de massa observada antes de 100 °C, correspondente a água adsorvida. Por se tratar da mesma planta, porém submetida a processos de extrações aquosas diferentes (decocção e infusão), pode-se afirmar que a extração por decocção extraiu uma maior variedade de compostos orgânicos. O percentual de massa, de ambas as amostras, nas temperaturas de 100 e 400 °C, foi semelhante, sendo que a amostra ESDC apresentou somente 0,12 % a mais de massa (1,2 mg/g), em relação à ESIN.

Figura 7 – Curvas de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria do extrato seco da decoção das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.



ESDC: Extrato seco da decoção.
Fonte: Autoria própria (2018).

Figura 8 – Curvas de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria do extrato seco da infusão das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.



ESDC: Extrato seco da infusão. TG: Termogravimetria. DTG: Derivada da termogravimetria. DSC: Calorimetria exploratória diferencial.
Fonte: Autoria própria (2018).

As etapas de perda de massa evidenciadas na faixa de temperatura de 100 a 400 °C ocorre devido à volatilização dos compostos orgânicos extraídos da *B. forficata* Link. Na faixa de temperatura de 100 a 200 °C, observa-se na amostra ESDC, dois processos de perda de massa, com máximos de perda em 150 e 175 °C e na ESIN a perda nessa faixa ocorre em um único processo com máximo de perda em 160 °C. A volatilização do kaempferol provavelmente ocorre na ESDC no processo de degradação térmica observado entre 200 e 293 °C com máximo de perda em 262 °C, mas na ESIN esse mesmo processo ocorre de 200 a 270 °C com o máximo da perda em 245 °C. O processo de volatilização da quercetina e de seu derivado isoramnetina, provavelmente ocorre nos processos de degradação térmica que inicia em 295 °C para ESDC e em 270 °C para ESIN e ambos vão até 365 °C com máximos de perda de massa em 317 e 300 °C, respectivamente, com base nas curvas de DTG.

A análise da quantidade de massa perdida em cada processo foi realizada com base na curva TG. Observou-se que no processo da faixa de 100 a 200 °C houve perda de 15,49 % na ESDC e 12,78 % na ESIN. Na etapa de provável volatilização do kaempferol, a ESDC perdeu 22,28 % de massa e a ESIN 15,07 %, já na etapa da possível volatilização da quercetina e de seu derivado isoramnetina, a ESDC perdeu 11,96% de massa e a ESIN perdeu 19,76%. Segundo Chen et al. (2010), essas perdas ocorreram por meio de processos exotérmicos como pode ser observado na comparação da curva TG com a curva DSC de cada amostra (Figuras 7 e 8). Os caimentos das curvas de TG coincidem com elevações, mesmo que suaves, nas curvas de DSC. Tais eventos térmicos ocorrem mediante a volatilização dos compostos presentes na amostra, sendo que o comportamento térmico da amostra ESIN é indicativo de uma amostra mais cristalina.

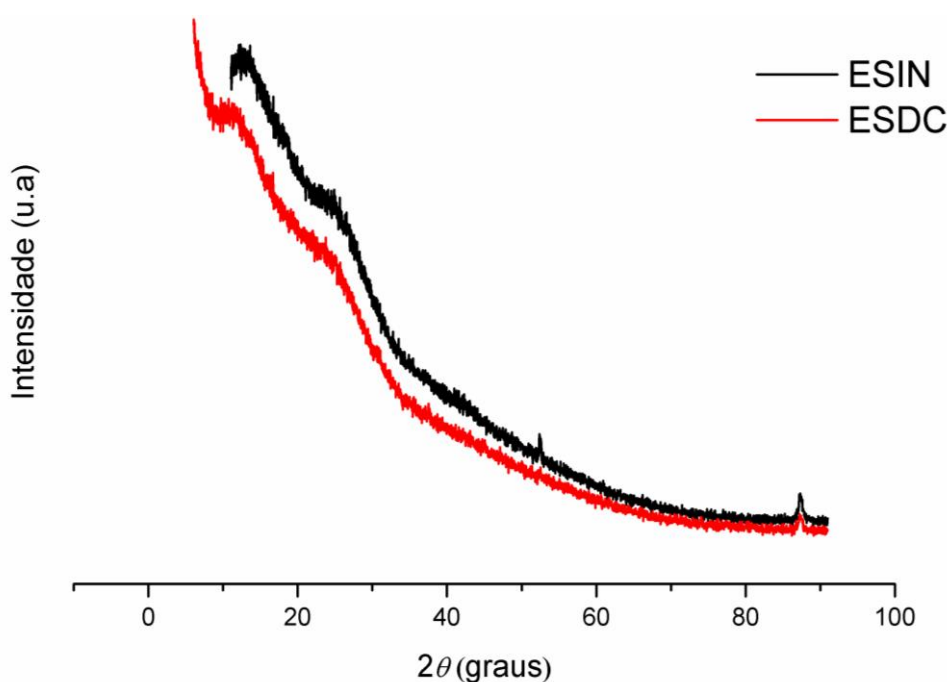
Ballesteros et al. (2017), analisaram termicamente amostras secas por *spray drying* de grãos de café. As curvas de DSC e TG também observaram degradação de compostos fenólicos das amostras quando estas foram expostas ao aquecimento até 500 °C, sendo associado à despolimerização e ramificação de carboidratos, compostos identificados também na cromatografia (CLAE), com decomposição do material a partir de 400 °C.

3.6 Difração de raio-X (DRX)

A Figura 9 apresenta os difratogramas dos extratos ESDC e ESIN, com características de substâncias amorfas, comum em extratos vegetais secos por *spray drying*. Verifica-se também uma inclinação maior nos ângulos iniciais dos difratogramas, formando uma “aureola amorfa”, segundo Newman e Byrn (2003), fato que pode ser explicado pela presença de

carboidratos que, durante o processo de secagem, não conseguiram retornar à sua forma cristalina e se organizaram de forma amorfa. Difrátogramas semelhantes ao presente estudo foram observados em extratos secos de *Schinopsis brasiliensis* e *Hamamelis virginiana*, com e sem adjuvantes de secagem, cuja conformação foi amorfa e formada por um ruído intenso, o que sugere que a presença do adjuvante não afetou o aspecto amorfo de extratos secos por *spray drying* (FERNANDES et al., 2013; GALLO et al., 2011)

Figura 9 – Difrátogramas dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.



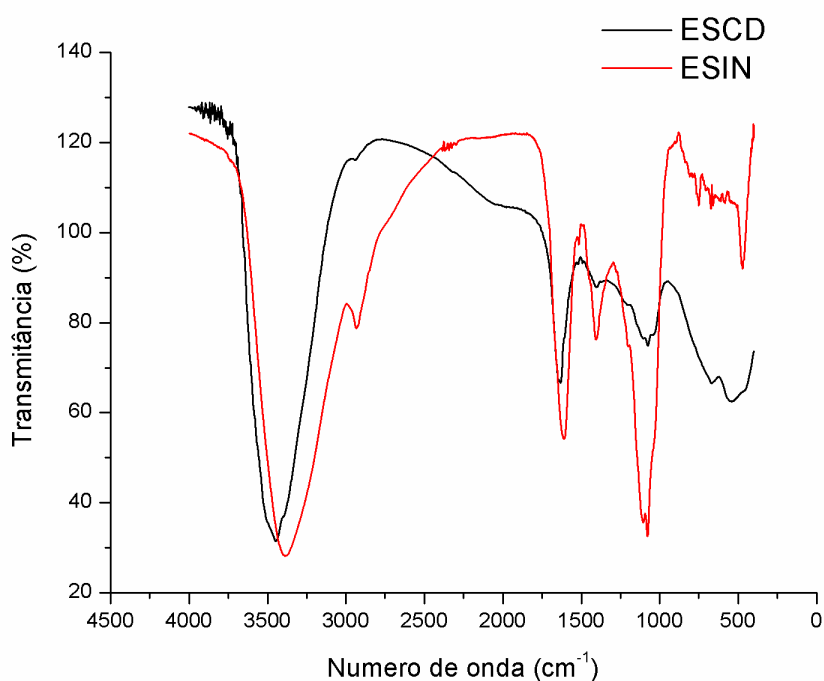
ESDC: Extrato seco da decocção. ESIN: Extrato seco da infusão.
Fonte: Autoria própria (2018).

3.7 Análise por espectrometria de infravermelho (IV-TF)

Amostras de ESDC e ESIN foram analisadas em forma sólida por espectrometria IV-TF (Figura 10), na qual os espectros de ambos extratos mostraram características similares, com apenas uma absorção espectral mais diferenciada ao redor do número de onda de 1000 cm^{-1} no ESIN. Os espectros de FTIR mostraram uma banda de absorção típica a um comprimento de onda de $\lambda = 3300\text{ cm}^{-1}$ característica do grupo hidroxila (-OH). A banda distintiva no número de onda de 1618 cm^{-1} é atribuído ao anel C=C de fenila, presente nos compostos fenólicos, conforme Schulz e Baranska (2007), sendo identificados também na

cromatografia (CLAE). A banda a 1405 cm^{-1} é devida a deformação assimétrica de CH_3 , de acordo com Agarwal, Tandon e Gupta (2006). A região do número de onda entre 1200 e 950 cm^{-1} contém grupos funcionais principalmente de carboidratos. Lu et al. (2011), Medina-Torres et al. (2016) e Ragupati Raja Kannan, Arumugam e Anantharaman (2011), em seus estudos sobre o conteúdo fenólico em *Allium cepa*, *Allium oschaninii*, *Litsea glaucescens* e ervas marinhas, obtiveram espectros com bandas de absorção semelhantes.

Figura 10 – Espectros de absorção na região do infravermelho dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.



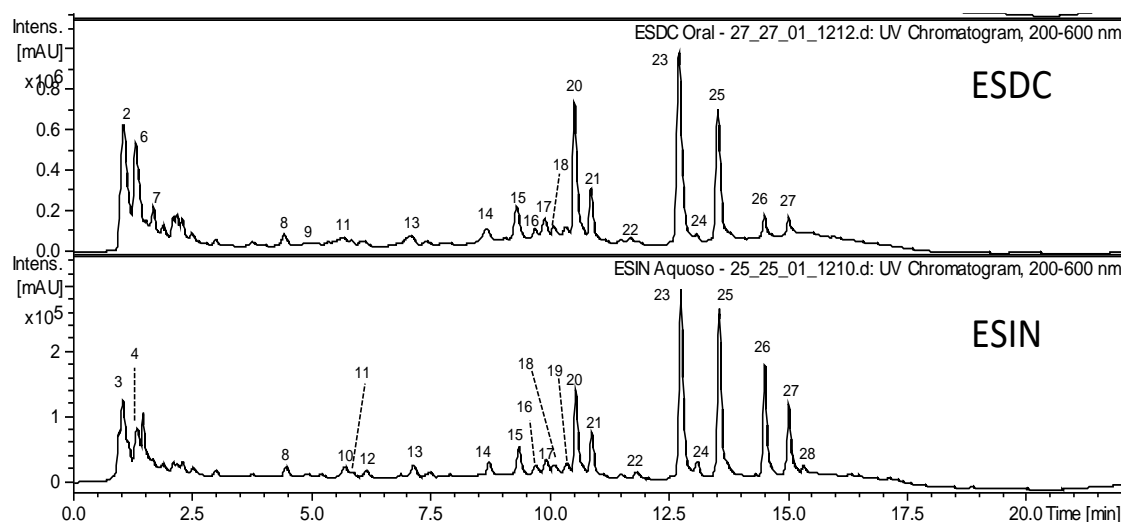
ESDC: Extrato seco da decocção. ESIN: Extrato seco da infusão.
Fonte: Autoria própria (2018).

3.8 Análise dos extratos secos da decocção (ESDC) e da Infusão (ESIN) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE- MS^n)

Os cromatogramas dos ESDC e ESIN estão apresentados na Figura 11. As análises pela cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray e analisador de armadilha de íons (CLAE-PDA-ESI-IT- MS^n) identificaram 28 picos nos dois extratos, sendo alguns com a mesma relação massa/carga (m/z), mas por apresentarem tempos de retenção ou espectros de UV ou íons produtos diferentes, os mesmos foram considerados como moléculas

diferentes. Dentre as substâncias identificadas, quatorze estão distribuídas em ambos extratos, enquanto quatro estão presentes no ESDC e três são exclusivas de ESIN.

Figura 11 - Cromatogramas dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.



ESDC: Extrato seco da decocção. ESIN: Extrato seco da infusão.
Fonte: Autoria própria (2019).

Foram identificados carboidratos simples e em cadeia, principalmente, na região inicial do cromatograma (tempo inferior a oito minutos), ácidos fenólicos e seus derivados glicosilados (entre 8 – 10 minutos) e flavonoides C- e O-glicosilados entre 10-20 minutos do cromatograma, com exceção dos picos 8 e 11 (4,4 e 5,7 minutos respectivamente) que também são de flavonoides, estando em consonância com os resultados da calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG), da difração de raio-X (DRX) e da análise por infravermelho (IV-TF).

No estudo de fragmentações sequenciais obtidos por espectrometria de massas foram identificados dois ácidos carboxílicos simples e cinco sacarídeos. Dentre os sacarídeos observou-se quatro picos cromatográficos com íon percussor $[M-H]^-$ m/z de 355 (picos 10,12,13 e 14). Em todos esses picos, a primeira fragmentação referiu-se a uma perda de $[M-146-H]^-$, originando o íon m/z 209 como íon produto, mostrando tratar-se de isômeros de um sacarídeo entre o ácido sacárico (uma vez que os demais íons produtos formados são idênticos aos dos picos 1 e 3) O-glicosilada a uma ramnose, o ácido sacárico O-ramnosídeo. Esse sacarídeo pode formar diversos isômeros constitucionais, pois a parte da molécula referente a ramnose pode realizar uma ligação em todas as hidroxilas disponíveis no ácido sacárico.

O pico três apresentou como íon referente a molécula desprotonada o m/z de 473. Sua primeira fragmentação observada em MS², mostrou a perda de [M-132-H]- referente a uma pentose O-glicosilada formando o íon produto m/z 341. O íon produto m/z 161 foi formado pela fragmentação de terceiro estágio ([MS³ 473→341]) sendo referente a perda de [M-132-162-H]- evidenciando uma perda de uma hexose e portanto o pico 3 trata-se de um trissacarídeo (Pentofuranosil-hexopiranosil (1→6) glicopiranosídeo).

Os picos cromatográficos de números 15, 16, 17 e 18 apresentaram como molécula desprotonada [M-H]- uma m/z 369 e sua fragmentação de segunda ordem originou um íon produto m/z 223 (MS² [369]) pela perda de [M-146-H]-, referente a fragmentação da ligação O-ramnose. O MS³ de m/z 369 (MS³ [369 → 223]) apresentou como íons produtos m/z 205 (100), 111 e 85 todos pertencentes ao ácido sinápico, demonstrando que as moléculas desprotonadas nos picos 15, 16, 17, 18 e 21 referem- aos isômeros do ácido sinápico-O-ramnosídeo.

Na categoria de ácidos fenólicos o pico 19 apresentou o íon m/z 399 como íon desprotonado e percussor do íon produto de segunda ordem m/z 223, formado mediante a perda de [M-176-H]- relativo a fragmentação do íon ferrulato (ânion do ácido ferrúlico), indicando a ligação da hidroxila do ácido na hidroxila fenólica do ácido sinápico, uma vez que m/z 223 e o fragmento de terceira ordem (MS³ [399 → 223]), m/z 205 são pertencentes ao referido ácido. Portanto pode ser proposta a identificação do ácido ferruloil-sinápico para o pico 19 do cromatograma de ESIN.

Os picos de número 11, 20 e de 23 a 28 apresentaram espectros de UV com bandas de absorção entre 254 e 365 nm característico de flavonóis. O pico de número 11 apresentou como íon não protonado a m/z 447, sendo que, sua fragmentação de segunda ordem (MS²[447]), originou o íon produto m/z 315, através da perda de uma pentose O-glicosilada ([M-132-H]-), onde m/z 315 refere-se a aglicona do flavonol isoramnetina através da quebra de ligação Y0, segundo Cuyckens e Claeys (2004). Ferreres et al. (2012), em um estudo realizado com algumas plantas do gênero *Bauhinia*, encontraram principalmente flavonoides do tipo flavan-3-ol ou mais conhecidos como flavonóis.

Por intermédio da sua fragmentação de terceira ordem (MS³ [447 → 315]), o íon mais estável formado foi m/z 152 pela fragmentação das ligações em posição 1,3A0, evidenciando que a pentose se encontra ligada na posição três do flavonoide, conforme Cuyckens e Claeys (2004). Portanto pode-se propor que o pico 11 trata-se da isoramnetina-3-O-pentose.

Evidenciou-se que outros três picos (25, 27 e 28) nos cromatogramas apresentavam o íon m/z 315, referente a isoramnetina, seja na fragmentação de segunda ordem de sua

molécula desprotonada (27) ou de terceira ordem (pico 25 e 28). As diferenças entre estes picos encontram-se na ligação e número de sacarídeos ligados a aglicona do flavonoide. O pico 25 possui como fragmento MS^2 o íon produto m/z 623, referente a perda de uma ramnose O-glicosilada ($[M-146 H]^-$), enquanto que o MS^3 forma os íons m/z 315, 300, onde o primeiro refere-se a perda de uma rutinosil ou o dissacarídeo ramnosil-hexosídeo e o segundo íon a perda de uma metila, presente na isoramnetina.

Portanto a molécula desprotonada do pico 25, que apresentou como íon percussor m/a 769, é a isoramnetina-3-O-ramnosil-rutinosídeo. Esse bioativo também foi identificado por Farag et al. (2015), nesta mesma espécie vegetal. O pico cromatográfico em 15 minutos (pico 27) possui como molécula desprotonada o íon m/z 623 e por apresentar as mesmas fragmentações sequenciais da molécula proposta anteriormente, deve-se tratar da isoramnetina-3-O-robinobiosídeo. Já o sinal em 15,3 minutos apresentou íon $[M-H]^-$ a m/z 477 e com fragmentos MS^2 e MS^3 sendo m/z 357 e 315 respectivamente, ou seja, o pico 28 apresentou uma quebra 0,2X da O-hexose ($[M-H-120]^-$) na formação do seu íon produto MS^2 enquanto o seu íon MS^3 foi formado pela perda Y0 ($[M-120-H]^-$) para evidenciar a aglicona desprotonada da isoramnetina. Por isso, a molécula desprotonada do pico 28 refere-se a isoramnetina-3-O-hexose.

Outro flavonol identificado nos extratos microencapsulados de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*, por meio dessa técnica, foi o kaempferol. Este flavonol apresentou como íon desprotonado a m/z 285 e o mesmo encontrou-se presente nos íons dos picos 20, 23, 24 e 26 com os tempos de retenção de 10,6, 12,8, 13,1 e 14,5 minutos. O flavonoide identificado no pico 20 apresentou como íon desprotonado o m/z 885 e como seus íons derivados o m/z 739 (MS^2) e o m/z 575 e 285 (MS^3).

Ao formar o íon de segunda ordem, o íon percussor m/z 885, apresentou uma perda de uma ramnose O-glicosilada ($[M-146-H]^-$), enquanto que o íon m/z 575 originou-se da fragmentação de uma hexose O-glicosilada ($[M-162-H]^-$) e o m/z 285 evidenciou a aglicona do kaempferol mediante a perdas sucessivas de outras duas unidades de ramnoses, demonstrando tratar-se do kaempferol-3-O-ramnosil-rutinosídeo.

Os picos 23 e 24, apresentaram íon desprotonado o m/z 739 e devido as fragmentações sequenciais semelhantes ao pico 20 (MS^2 [739]: m/z 593 e (MS^3 [739 \rightarrow 593]: m/z 285), que evidenciaram serem moléculas isômeras entre si, tendo o kaempferol como aglicona e perdas sequenciais de uma ramnose e uma rutinose, portanto, os picos 23 e 24 podem ser nomeados por dois isômeros do kaempferol-O-ramnosil-3-O-rutinosídeo, em consonância com os estudos realizados por Pizzolatti et al. (2003), Salatino et al. (1999), Ferreres et al. (2012),

Farag et al. (2015), Santos, Fortunato e Spotorno (2018).

O pico 26 apresentou [M-H]⁻ m/z 593, descrito anteriormente como íon produto do íon 739, assim, a diferença entre as duas moléculas, encontrou-se na assertiva de que o [M-H]⁻ m/z 593, apresentou uma ramnose a menos do que o íon m/z 739, portanto, trata-se do kaempferol 3-O-rutinosídeo.

Na Tabela 2, encontram-se as identificações das moléculas dos extratos microencapsulados de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*, baseadas no tempo de retenção, espectro de UV e fragmentação por espectrometria de massas sequencial.

Tabela 2 - Identificação de moléculas presentes nos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) por *cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MSⁿ)*.

N.º Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)		[M-H] ⁻	Fragmentos de [M-H] ⁻		Proposta de identificação	
		ESDC	ESIN		MS ²	MS ³		
1	1,0	-	-	217/ 279	209,0	191	147; 85	Ácido sacárico
2	1,1	+	-	225/258	377,2	161	101;	Não identificado
3	1,1	-	+	-	473,2	341	161; 101	Pentofuranosil hexopiranosil-(1→6)-hexosídeo
4	1,3	-	+	200/254	207,0	163	101; 83	Ácido-2-hidroxi-2-[2,3,4-trihidroxi-oxotetrahydro-furanil] acético
5	1,3	-	-	200/254	223,0	205	111; 83	Ácido sinápico
6	1,3	+	-	218/262	377,1	179	161; 101	Não identificado
7	1,8	+	-	200/250	454,2	274	256; 164	Não identificado
8	4,4	+	+	219/288/313	449,2	355	315	Não identificado
9	4,9	+	-	200/270/435	471,2	398	-	Não identificado
10	5,6	-	+	204/227/31	355,1	209	191; 147; 85	Ácido sacárico- <i>O</i> -ramnosídeo
11	5,7	+	+	202/223/313	447,2	315	152; 123	Isoramnetina-3- <i>O</i> -pentose
12	6,1	-	+	312/221	355,1	209	191; 147; 85	Ácido glucárico <i>O</i> -ramnosídeo
13	7,1	+	+	208/231/313	355,3	209	191; 147; 85	Ácido glucárico <i>O</i> -ramnosídeo
14	8,7	+	+	226/314	355,3	209	191; 147; 85	Ácido glucárico <i>O</i> -ramnosídeo
15	9,4	+	+	227/313	369,1	223	205; 111; 85	Ácido sinápico <i>O</i> -ramnosídeo

Tabela 2 - Identificação de moléculas presentes nos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) por *cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MSⁿ)*.

(conclusão)

N.º Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)		[M-H] ⁻	Fragmentos de [M-H] ⁻		Proposta de identificação	
		ESDC	ESIN		MS ²	MS ³		
16	9,7	+	+	224/313	369,2	223	205; 111; 85	Ácido sinápico <i>O</i> -ramnosídeo
17	10,0	+	+	221/311	369,3	223	205; 111; 85	Ácido sinápico <i>O</i> -ramnosídeo
18	10,1	+	+	225/269/316	369,3	223	205; 111; 85	Ácido sinápico <i>O</i> -ramnosídeo
19	10,4	-	+	225/271/326	399,3	223	205	Ácido ferruloil-sinápico
20	10,6	+	+	229/266/347	885,7	739	575; 285	Kaempferol-3- <i>O</i> -ramnosil-ramnosil-rutinosídeo
21	11,0	+	+	204/255/353	369,1	223	205	Ácido sinápico <i>O</i> -ramnosídeo
22	11,8	+	+	228/266/342	441,5	395	249	Não identificado
23	12,8	+	+	203/266/346	739,6	593	285	Kaempferol <i>O</i> -ramnosil-3- <i>O</i> -rutinosídeo
24	13,1	+	+	203/266/346	739,7	593	285	Kaempferol <i>O</i> -ramnosil-3- <i>O</i> -rutinosídeo
25	13,6	+	+	203/255/353	769,6	623	315;300;255	Isoramnetina 3- <i>O</i> -ramnosil-rutinosídeo
26	14,5	+	+	226/266/343	593,2	285	255	Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinosídeo
27	15,0	+	+	225/254/350	623,2	315	300; 271; 255	Isoramnetina 3- <i>O</i> -robinobiosídeo
28	15,3	-	+	232/268/334/366	477,4	357	315; 300	Isoramnetina 3- <i>O</i> -hexosídeo

ESDC: Extrato seco da decocção. ESIN: Extrato seco da infusão. CLAE-PDA-ESI-IT-MSⁿ: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por *electrospray* e analisador de armadilha de íons.

Fonte: Autoria própria (2019).

3.9 Bioacessibilidade *in vitro* de polifenóis e flavonoides

No presente estudo, realizou-se a bioacessibilidade de polifenóis e flavonoides por meio da digestão oral, gástrica, intestinal e colônica simulada dos extratos secos microencapsulados da fração aquosa das folhas de *B. forficata* Link subs. *forficata*, ESIN e ESDC. Os teores de polifenóis e flavonoides totais dos ESIN e ESDC, bem como seus índices de bioacessibilidade estão apresentados na Tabela 3.

O conteúdo total de polifenóis do ESIN foi estatisticamente diferente entre as fases oral (17,75 mg EAG.g⁻¹) e gástrica (14,80 mg EAG.g⁻¹), porém após a fase duodenal, estes se tornaram semelhantes (15,79 mg EAG.g⁻¹), diminuindo na fase colônica (0,60 mg EAG.g⁻¹). Ao se avaliar o índice de bioacessibilidade, considerando que a maior parte da absorção desses compostos ocorre no duodeno, verificou-se que 52,68% dos polifenóis estavam bioacessíveis, em relação ao teor destes antes da digestão. Pellegrini et al. (2018) e Tagliazucchi et al (2010) obtiveram resultados semelhantes, constatando-se que a fase oral afeta negativamente a recuperação dos polifenóis, sendo liberados da matriz após a fase gástrica e, principalmente, após a fase intestinal, devido às hidrólises ácida e alcalina nessas fases.

Referindo-se ao ESDC, o conteúdo de polifenóis apresentou um aumento significativo estatisticamente, nas fases oral (7,83 mg EAG.g⁻¹), gástrica (13,79 EAG.g⁻¹) e duodenal (16,99 EAG.g⁻¹), com teores semelhantes ao ESIN, exceto na fase colônica (0,88 EAG.g⁻¹). Vale ressaltar que os polifenóis que não são absorvidos no duodeno atingem o cólon, onde a microbiota colônica hidrolisa os glicosídeos em agliconas e as degrada para ácidos fenólicos simples, cuja atividade é de grande importância para a ação biológica, segundo D'Archivio et al. (2010).

Com relação aos flavonoides, no ESIN foram verificadas concentrações diminuídas em cada fase do processo digestivo (7,19 mg EAG.g⁻¹, 6,28 mg EAG.g⁻¹, 1,29 mg EAG.g⁻¹), com 13,24% de flavonoides bioacessíveis após o duodeno. No ESDC ocorreu uma diminuição da fase oral (3,56 EAG.g⁻¹) para a fase gástrica (1,13 EAG.g⁻¹), com um aumento progressivo na bioacessibilidade na fase duodenal (4,26 EAG.g⁻¹). Os teores de flavonoides, nesse extrato, foram mais bioacessíveis, quando comparado ao ESIN, com um aumento de 139,21% após a digestão no duodeno. Em contrapartida, Celep et al. (2018), em estudo com extrato metanólico liofilizado, das partes aéreas de *Lavandula stoechas*, não encontraram diferenças significativas nos níveis de polifenóis e flavonoides, antes e após à digestão *in vitro*.

Tabela 3 - Determinação espectrofotométrica de polifenóis e flavonoides totais durante a simulação da digestão *in vitro* dos extratos secos microencapsulados de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* e índice de bioacessibilidade.

	Polifenóis (mg EAG. g ⁻¹)		Flavonoides (mg EC. g ⁻¹)	
	ESIN	ESDC	ESIN	ESDC
ND	29,98 ± 0,08 ^{aA}	21,49 ± 0,14 ^{bA}	9,78 ± 0,28 ^{aA}	3,06 ± 0,03 ^{bA}
<i>Etapas da digestão gastrointestinal</i>				
Oral	17,75 ± 1,77 ^{aB}	7,83 ± 0,31 ^{bB}	7,19 ± 0,09 ^{aB}	3,56 ± 0,38 ^{bAD}
Gástrica	14,80 ± 2,31 ^{aC}	13,79 ± 0,26 ^{aC}	6,28 ± 0,74 ^{aC}	1,13 ± 0,09 ^{bC}
Duodenal	15,79 ± 1,21 ^{aBC}	16,99 ± 0,20 ^{aD}	1,29 ± 0,25 ^{aD}	4,26 ± 0,32 ^{bD}
Colônica	0,60 ± 0,07 ^{aD}	0,88 ± 0,04 ^{aE}	NI	0,13 ± 0,01 ^E
<i>Índice de bioacessibilidade (%)</i>				
Oral	59,21 ± 6,05 ^{aA}	36,42 ± 1,28 ^{bA}	73,57 ± 3,12 ^{aA}	116,09 ± 11,86 ^{bA}
Gástrica	49,38 ± 7,79 ^{aA}	64,17 ± 1,0 ^{bB}	64,08 ± 5,91 ^{aA}	36,61 ± 3,08 ^{bB}
Duodenal	52,68 ± 4,15 ^{aA}	79,06 ± 1,08 ^{bC}	13,24 ± 2,88 ^{aC}	139,03 ± 8,86 ^{bC}
Colônica	2,00 ± 0,23 ^{aB}	4,08 ± 0,23 ^{aD}	NI	4,24 ± 0,33 ^D

Médias ± desvios padrão (n = 3). ESIN: Extrato seco infusão. ESDC: Extrato seco decocção. EAG: Equivalência em ácido gálico. EC: Equivalência em catequina. ND: Não digerida. NI: Não identificado. ANOVA two-way, pós-teste de Tukey (p<0,05). Letras minúsculas diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas. O índice de bioacessibilidade foi calculado com base no teor de polifenóis e flavonoides antes da digestão.

A absorção dos polifenóis e flavonoides, liberados da matriz alimentar por mastigação, depende de suas propriedades físico-químicas como tamanho molecular, configuração, lipofilicidade, solubilidade e pKa, por isso há divergências nos estudos com relação ao conteúdo desses compostos, após a digestão *in vitro*. Para que estes compostos sejam absorvidos no intestino delgado, seus grupos hidroxilas glicosilados precisam ser biotransformados em agliconas, conforme já constatado por Hollman et al. (1999), Kumar e Pandey (2013), Pandey e Rizvi (2009).

3.10 Capacidade antioxidante dos polifenóis durante a simulação da digestão *in vitro*

Para investigar a influência da digestão gastrointestinal *in vitro* dos ESIN e ESDC das folhas de *B. forficata* Link subsp. *forficata*, na capacidade antioxidante, foram empregados os métodos da redução do íon férrico (Fe^{3+}) em ferroso (Fe^{2+}) pelo ensaio FRAP e a capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) (Tabela 4).

Após a digestão, observou-se uma redução significativa na capacidade antioxidante do ESIN, no ensaio FRAP, da fase oral ($13,45 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$) para duodenal ($6,06 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$), como também no ORAC, de $1902,22 \mu\text{mol Trolox.mg}^{-1}$ para $366,44 \mu\text{mol Trolox.mg}^{-1}$, da fase oral para duodenal. Em contrapartida, no ESDC, a atividade de redução férrica (FRAP), aumentou da fase oral ($2,94 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$) para gástrica ($11,27 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$), porém diminuiu na duodenal ($7,80 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$). A capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) também diminuiu da fase oral ($793,47 \mu\text{mol Trolox.mg}^{-1}$) para duodenal ($88,06 \mu\text{mol Trolox.mg}^{-1}$). Em ambos extratos, a fase colônica não teve atividade antioxidante nos métodos estudados, com exceção do ORAC no ESDC ($108,11 \mu\text{mol Trolox.mg}^{-1}$).

Nos bioativos presentes na fase duodenal do ESIN observou-se uma atividade aumentada (25,00%), no método ORAC, em relação ao ESDC (7,99%), fato relevante pois esse método verifica a capacidade sequestradora das frações hidrofílicas e lipofílica proporcional de um antioxidante frente à formação de uma radical peroxila, induzido pelo AAPH (2,2'-azobis(2'-amidinopropano) dihidroclorato) a 37°C , semelhante à temperatura corporal humana, cujo radical peroxila reage com a fluoresceína formando um produto não fluorescente, segundo Dávalos, Gómez-Cordovés, Bartolomé (2004) e Prior, Hoang, Gu (2003).

Tabela 4 – Capacidade antioxidantes dos extratos secos microencapsulados de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* nos ensaios FRAP (poder de redução do íon ferro) e ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio), antes e após a digestão e índice de bioacessibilidade da ação antioxidante.

	FRAP ($\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$)		ORAC ($\mu\text{mol Trolox.mg}^{-1}$)	
	ESIN	ESDC	ESIN	ESDC
ND	118,86 \pm 0,82 ^{aA}	57,68 \pm 0,93 ^{bA}	1465,63 \pm 1,97 ^{aA}	1102,03 \pm 0,92 ^{bA}
<i>Etapas da digestão gastrointestinal</i>				
Oral	13,45 \pm 0,11 ^{aB}	2,94 \pm 0,17 ^{bB}	1902,22 \pm 0,83 ^{aB}	793,47 \pm 2,16 ^{bB}
Gástrica	0,37 \pm 0,21 ^{aC}	11,27 \pm 0,31 ^{bC}	770,57 \pm 2,74 ^{aC}	777,50 \pm 1,69 ^{bC}
Duodenal	6,06 \pm 0,61 ^{aD}	7,80 \pm 0,85 ^{bD}	366,44 \pm 0,49 ^{aD}	88,06 \pm 2,65 ^{bD}
Colônica	SA	SA	SA	108,11 \pm 1,05 ^E
<i>Índice de bioacessibilidade da ação antioxidante (%)</i>				
Oral	11,31 \pm 0,02 ^{aA}	5,09 \pm 0,23 ^{bA}	129,83 \pm 0,07 ^{aA}	72,00 \pm 0,14 ^{bA}
Gástrica	0,32 \pm 0,17 ^{aB}	19,55 \pm 0,88 ^{bB}	52,57 \pm 0,11 ^{aB}	70,55 \pm 0,09 ^{bB}
Duodenal	5,09 \pm 0,50 ^{aC}	13,53 \pm 1,45 ^{bC}	25,00 \pm 0,0 ^{aC}	7,99 \pm 0,23 ^{bC}
Colônica	SA	SA	SA	9,81 \pm 0,08 ^D

Médias \pm desvios padrão (n = 3). ESIN: Extrato seco da infusão. ESDC: Extrato seco da decoção. ND: Não digerida. SA: Sem atividade. FRAP: Capacidade redutora do íon férrico Fe³⁺ a Fe²⁺. ORAC: $\mu\text{mol trolox equivalente/mg}$. ANOVA two way seguida do pós-teste Tukey (p<0,05). Letras minúsculas diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças estatisticamente significativas. O índice de bioacessibilidade foi calculado com base na atividade antioxidante dos extratos antes da digestão.

Resultados semelhantes foram verificados por Buniowska et al. (2017), cuja atividade antioxidante total, de uma mistura de suco de frutas exóticas adoçada com *Stevia rebaudiana*, diminuiu nos ensaios ORAC, após a digestão gástrica. Celep et al. (2018), também constataram uma redução na capacidade antioxidante total de extrato das folhas de *L. stoechas* ssp. *stoechas*, após a digestão *in vitro*. Em contrapartida, Pellegrini et al. (2017), na capacidade do poder de redução férrica (FRAP), obtiveram uma atividade antioxidante, após a fase oral, maior do que a de sementes de quinoa não digeridas.

4 Conclusões

As características físico-químicas, granulométricas e morfológicas dos extratos microencapsulados das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* mostraram-se adequadas para sua utilização em comprimidos e cápsulas. A difração de raios X mostrou que esses extratos possuíam características amorfas. A espectroscopia no infravermelho e a cromatografia de alta eficiência acoplada a espectroscopia de massas confirmaram que a microencapsulação preservou os compostos fenólicos, flavonóis e seus derivados *O*-glicosilados. Os polifenóis e os flavonoides bioacessíveis de cada extrato apresentaram atividade antioxidante, após as fases oral, gástrica e duodenal da digestão *in vitro*. Portanto, esses extratos microencapsulados são promissores para a aplicação em novas formulações farmacêuticas e produtos nutracêuticos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu qualquer subvenção específica de financiamento de agências de fomento dos setores público, privados ou sem fins lucrativos.

Referências

AGARWAL, R.; TANDON, P.; GUPTA, V. D. Phonon dispersion in poly (dimethylsilane). **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 691, n. 13, p. 2902-2908, 2006.

ALMINGER, M.; AURA, A. M.; BOHN, T.; DUFOUR, C.; EL, S. N.; GOMES, A.; SANTOS, C. N. In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 413-436, 2014.

AMADO, R. J.; RONDÓN, L. P.; PRADA, A. L.; ARRANZ, J. C. E.; COLARTE, A. I. Formulaci3n de c3psulas duras de *Tamarindus indica* L. **Revista Cubana de Farm3cia**, v. 48, n. 1, p. 118-118, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY- A.O.A.C. **Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry International**. 19th Edition, 2012.

ARAÚJO, R. R.; TEIXEIRA, C. C. C.; FREITAS, L. A. P. The preparation of ternary solid dispersions of an herbal drug via spray drying of liquid feed. **Drying Technology**, v. 28, n. 3, p. 412-421, 2010.

ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 6, p. 655-665, 2002.

ARPAGAUS, C.; JOHN, P.; COLLENBERG, A.; RÜTTI, D. Nanocapsules formation by nano spray drying. In: **Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries**. Academic Press, 2017. p. 346-401.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY- A.O.A.C. **Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry International**. 19th Edition, 2012.

BAKKALBAŞI, E.; MENTEŞ, Ö.; ARTIK, N. Food ellagitannins—occurrence, effects of processing and storage. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 3, p. 283-298, 2008.

BAKRY, A. M.; ABBAS, S.; ALI, B.; MAJEED, H.; ABOUELWAFI, M. Y.; MOUSA, A.; LIANG, L. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143-182, 2016.

BALLESTEROS, L. F.; RAMIREZ, M. J.; ORREGO, C. E.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. **Food Chemistry**, v. 237, p. 623-631, 2017.

BAZZO, Giovana Carolina; SILVA, Marcos Antonio Segatto. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 315-322, 2005.

BHANDARI, B. R.; DATTA, N.; CROOKS, R.; HOWES, T.; RIGBY, S. A semi-empirical approach to optimise the quantity of drying aids required to spray dry sugar-rich foods. **Drying Technology**, v. 15, n. 10, p. 2509-2525, 1997.

BORINI, G. B.; ANDRADE, T. C.; FREITAS, L.A.P. Hot melt granulation of coarse pharmaceutical powders in a spouted bed. **Powder Technology**, v. 189, n. 3, p. 520-527, 2009.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 5 ed. Volume 1. Brasília: Anvisa, 2010.

BODAKHE, S. H.; RAM, A. Hepatoprotective properties of *Bauhinia variegata* bark extract. **Yakugaku Zasshi**, v. 127, n. 9, p. 1503-1507, 2007.

BUNIEWSKA, M.; CARBONELL-CAPELLA, J. M.; FRIGOLA, A.; ESTEVE, M. J. Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with *Stevia rebaudiana*. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1834-1842, 2017.

CARLONI, P.; TIANO, L.; PADELLA, L.; BACCHETTI, T.; CUSTOMU, C.; KAY, A.; DAMIANI, E. Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 900-908, 2013.

CECHINEL-ZANCHETT, C. C; DE ANDRADE, S. F.; CECHINEL-FILHO, V. Ethnopharmacological, Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of *Bauhinia forficata*: A Mini-Review Covering the Last Five Years. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 7, p. 911-916, 2018.

CELEP, E.; İNAN, Y.; AKYÜZ, S.; YESILADA, E. The bioaccessible phenolic profile and antioxidant potential of *Hypericum perforatum* L. after simulated human digestion. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 717-723, 2017.

CELEP, E.; AKYÜZ, S.; İNAN, Y.; YESILADA, E. Assessment of potential bioavailability of major phenolic compounds in *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*. **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 111-117, 2018.

CHEN, Z. P.; SUN, J.; CHEN, H. X.; XIAO, Y. Y.; LIU, D.; CHEN, J.; CAI, B. C. Comparative pharmacokinetics and bioavailability studies of quercetin, kaempferol and isorhamnetin after oral administration of *Ginkgo biloba* extracts, *Ginkgo biloba* extract phospholipid complexes and *Ginkgo biloba* extract solid dispersions in rats. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1045-1052, 2010.

COUTO, R. O. D.; ARAÚJO, R. R.; TACON, L. A.; CONCEIÇÃO, E. C. D.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. D.; FREITAS, L. A. P. D. Development of a phytopharmaceutical intermediate product via spray drying. **Drying Technology**, v. 29, n. 6, p. 709-718, 2011.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1-15, 2004.

DA CUNHA, A. M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A. G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M. W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine**, v. 17, n. 1, p. 37-41, 2010.

DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. D. M. P.; AGUILAR, R.; RUDGE, M. C. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. **Phytomedicine**, v. 11, n. 2-3, p. 196-201, 2004.

DATTA, C.; DUTTA, A.; DUTTA, D.; CHAUDHURI, S. Adsorption of polyphenols from ginger rhizomes on an anion exchange resin Amberlite IR-400—Study on effect of pH and temperature. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 893-899, 2011.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 48-54, 2004.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; MASELLA, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1321-1342, 2010.

DE SOUZA, B. V. C.; MOREIRA ARAÚJO, R. S. D. R.; SILVA, O. A.; FAUSTINO, L. C.; GONÇALVES, M. F. B.; DOS SANTOS, M. L.; NUNES, L. C. C. *Bauhinia forficata* in the treatment of diabetes mellitus: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 28, n. 2, p. 129-138, 2018.

ECKER, A.; NASCIMENTO GONZAGA, T.K.S.; SEEGER, R.L.; SANTOS, M.M.; LORETO, J.S.; BOLÍGONO, A.A.; BARBOSA, N.V. High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: protective role of *Syzygium cumini* and *Bauhinia forficata*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 605-616, 2017.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 3, p. 805-812, 2007.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1139-1147, 2011.

FARAG, M. A.; SAKNA, S. T.; EL-FIKY, N. M.; SHABANA, M. M.; WESSJOHANN, L. A. Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC–PDA–qTOF-MS and chemometrics. **Phytochemistry**, v. 119, p. 41-50, 2015.

FERNANDES, F.H.A.; SANTANA, C.P.; SANTOS, R.L.; CORREIA, L.P.; CONCEIÇÃO, M.M.; MACÊDO, R.O.; MEDEIROS, A.C.D.; Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal Thermal Analysis and Calorimetric**. v. 113, n. 01, p. 443-447, 2013.

FOGLIANO, V.; COROLLARO, M. L.; VITAGLIONE, P.; NAPOLITANO, A.; FERRACANE, R.; TRAVAGLIA, F. ARLORIO, M. et al. In vitro bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. **Molecular Nutrition and Food Research**, 5, 1-12, 2011.

GALLEGOS-INFANTE, J. A.; ROCHA-GUZMÁN, N. E.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; MEDINA-TORRES, L.; GOMEZ-ALDAPA, C. A.; OCHOA-MARTÍNEZ, L. A.;

- MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, E. C.; HERNÁNDEZ-SANTOS, B.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, J. Physicochemical properties and antioxidant capacity of oak (*Quercus resinosa*) leaf infusions encapsulated by spray-drying. **Food Bioscience**, v.2, p.31–38, 2013.
- GALLO, L.; LLABOT, J. M.; ALLEMANDI, D.; BUCALÁ, V.; PIÑA, J. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. **Powder Technology**, Lausanne, v. 208, p. 205–214, 2011.
- GULLON, B.; PINTADO, M. E.; BARBER, X.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Bioaccessibility, changes in the antioxidant potential and colonic fermentation of date pits and apple bagasse flours obtained from co-products during simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 78, p. 169-176, 2015.
- GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; KUMAR, T. S.; GOMATHI, P.; KUMAR, R. S. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Bauhinia racemosa* against paracetamol and carbon tetrachloride induced liver damage in rats. **Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 3, n. 1, p. 12-0, 2004.
- HILL, A.; CARRINGTON, S. Understanding the links between rheology and particle parameters. **American Laboratory**, v. 38, n. 21, p. 22, 2006.
- HOLLMAN, P. C.; BIJSMAN, M. N.; VAN GAMEREN, Y.; CNOSSEN, E. P.; DE VRIES, J. H.; KATAN, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radical Research**, V. 31, N. 6, P. 569-573, 1999.
- ISLAM, M. Z.; KITAMURA, Y.; KOKAWA, M.; MONALISA, K.; TSAI, F. H.; MIYAMURA, S. Effects of micro wet milling and vacuum spray drying on the physicochemical and antioxidant properties of orange (*Citrus unshiu*) juice with pulp powder. **Food and Bioproducts Processing**, v. 101, p. 132-144, 2017.
- JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816-835, 2008.
- KANDANSAMY, K.; SOMASUNDARAM, P. D. Microencapsulation of colors by spray drying-a review. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 2, 2012.
- KHAZAEI, K. M.; JAFARI, S. M.; GHORBANI, M.; KAKHKI, A. H. Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 57-62, 2014.
- KIM, D. O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, 50, 3713-3717, 2002.
- KOMES, D.; HORŽIĆ, D.; BELŠČAK, A.; GANIĆ, K. K.; VULIĆ, I. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. **Food research international**, v. 43, n. 1, p. 167-176, 2010.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

LU, X.; WANG, J.; AL-QADIRI, H. M.; ROSS, C. F.; POWERS, J. R.; TANG, J.; RASCO, B. A. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 637-644, 2011.

MAHDAVI, S. A.; JAFARI, S. M.; GHORBANI, M.; ASSADPOOR, E. Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: a review. **Drying Technology**, v. 32, n. 5, p. 509-518, 2014.

MÄKILÄ, L.; LAAKSONEN, O.; KALLIO, H.; YANG, B. Effect of processing technologies and storage conditions on stability of black currant juices with special focus on phenolic compounds and sensory properties. **Food Chemistry**, v. 221, p. 422-430, 2017.

MARRETO, R. N.; FREIRE, J. T.; FREITAS, L. A. P. Drying of pharmaceuticals: The applicability of spouted beds. **Drying Technology**, v. 24, n. 3, p. 327-338, 2006.

MARQUES, L. G.; FERREIRA, M. C.; FREIRE, J. T. Freeze-drying of acerola (*Malpighia glabra* L.). **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 46, n. 5, p. 451-457, 2007.

MEDINA-TORRES, L.; SANTIAGO-ADAME, R.; CALDERAS, F.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; ROCHA-GUZMÁN, N. E.; MANERO, O. Microencapsulation by spray drying of laurel infusions (*Litsea glaucescens*) with maltodextrin. **Industrial Crops and Products**, v. 90, p. 1-8, 2016.

MENEZES, F. D. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S.; KUSTER, R. M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 8-13, 2007.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D. J.; MÉNARD, O.; RECIO, I.; SANTOS, C. N.; SINGH R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. **Food and Function**, 5, 1113-1124, 2014.

NEWMAN, A. W.; BYRN, S. R.; Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 19, p. 898-905, 2003.

ORTEGA, N.; MACIÀ, A.; ROMERO, M. P.; REGUANT, J.; MOTILVA, M. J. Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in vitro digestion model. **Food Chemistry**, 124, 65-71, 2011.

ÖZKAN, G.; BILEK, S. E. Microencapsulation of natural food colourants. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 3, n. 3, p. 145-156, 2014.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PELLEGRINI, M.; LUCAS-GONZALEZ, R.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; RICCI, A.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; STERZO, C. L.; VIUDA-MARTOS, M. Bioaccessibility of polyphenolic compounds of six quinoa seeds during in vitro gastrointestinal digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 77-88, 2017.

PELLEGRINI, M.; LUCAS-GONZALEZ, R.; SAYAS-BARBERÁ, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 1, p. 47-53, 2018.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA JR. A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. D.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonoids glycosides from leaves and flowers of *Bauhinia forficata* (*Leguminosae*). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3273-79, 2003.

PUMACAHUA-RAMOS, A.; DEMIATE, I. M.; SCHNITZLER, E.; BEDIN, A. C.; TELIS-ROMERO, J.; LOPES-FILHO, J. F. Morphological, thermal and physicochemical characteristics of small granules starch from *Mirabilis jalapa* L. **Thermochimica Acta**, v. 602, p. 1-7, 2015.

RAGUPATHI RAJA KANNAN, R.; ARUMUGAM, R.; ANANTHARAMAN, P. Fourier transform infrared spectroscopy analysis of seagrass polyphenols. **Current Bioactive Compounds**, v. 7, n. 2, p. 118-125, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26, 1231-1237, 1999.

REIN, M. J.; RENOUF, M.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; ACTIS-GORETTA, L.; THAKKAR, S. K.; DA SILVA PINTO, M. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 588-602, 2013.

REINECCIUS, G. A. Spray-drying of food flavors. **Flavor Encapsulation**, p. 55-66, 1988.

ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 1, p. 37-42, 2012.

ROLIM, L.A.R; NUNES, L.C.C; LYRA, A.M.; ALVES, M.A.; BARROS, N.V.A.; BATISTA, P.N.; ROLIM NETO, P.J.; MOREIRA-ARAÚJO, R.S.R.; SILVA, R.M.F.; OLIVEIRA, T.C.O. **Composição farmacêutica efervescente e uso de extrato etanólico de *Bauhinia forficata***. BR1020130241504 (2013).

SALATINO, A.; BLATT, C. T.; SANTOS, D. Y. D.; VAZ, A. M. Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. **Brazilian Journal of Botany**, v. 22, n. 1, p. 17-20, 1999.

SANTIAGO-ADAME, R.; MEDINA-TORRES, L.; GALLEGOS-INFANTE, J. A.; CALDERAS, F.; GONZÁLEZ-LAREDO, R. F.; ROCHA-GUZMÁN, N. E.; BERNAD-BERNAD, M. J. Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 571-577, 2015.

SANTOS, M.; FORTUNATO, R. H.; SPOTORNO, V. G. Analysis of flavonoid glycosides with potential medicinal properties on *Bauhinia uruguayensis* and *Bauhinia forficata* subspecies *pruinosa*. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2018.

SASIKALA, P.; CHANDRALEKHA, A.; CHAURASIYA, R. S.; CHANDRASEKHAR, J.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Ultrasound-assisted extraction and adsorption of polyphenols from Ginger Rhizome (*Zingiber officinale*). **Separation Science and Technology**, v. 53, n. 3, p. 439-448, 2018.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. **Biotechnology progress**, v. 23, n. 2, p. 302-315, 2007.

SCHÜSSELE, A.; BAUER-BRANDL, A. Note on the measurement of flowability according to the European Pharmacopoeia. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257, n. 1-2, p. 301-304, 2003.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 43, n. 1, p. 13-25, 2007.

SOUZA, J. P. B.; TACON, L. A.; CORREIA, C. C.; BASTOS, J. K.; FREITAS, L. A. P. Spray-dried propolis extract, II: Prenylated components of green propolis. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 7, p. 488-492, 2007.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. I- quantitative analysis of phenolics constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, p. 63-68, 1959.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 599-606, 2010.

TAN, L. W.; IBRAHIM, M. N.; KAMIL, R.; TAIP, F. S. Empirical modeling for spray drying process of sticky and non-sticky products. **Procedia Food Sci**, v. 1, p. 690-697, 2011.

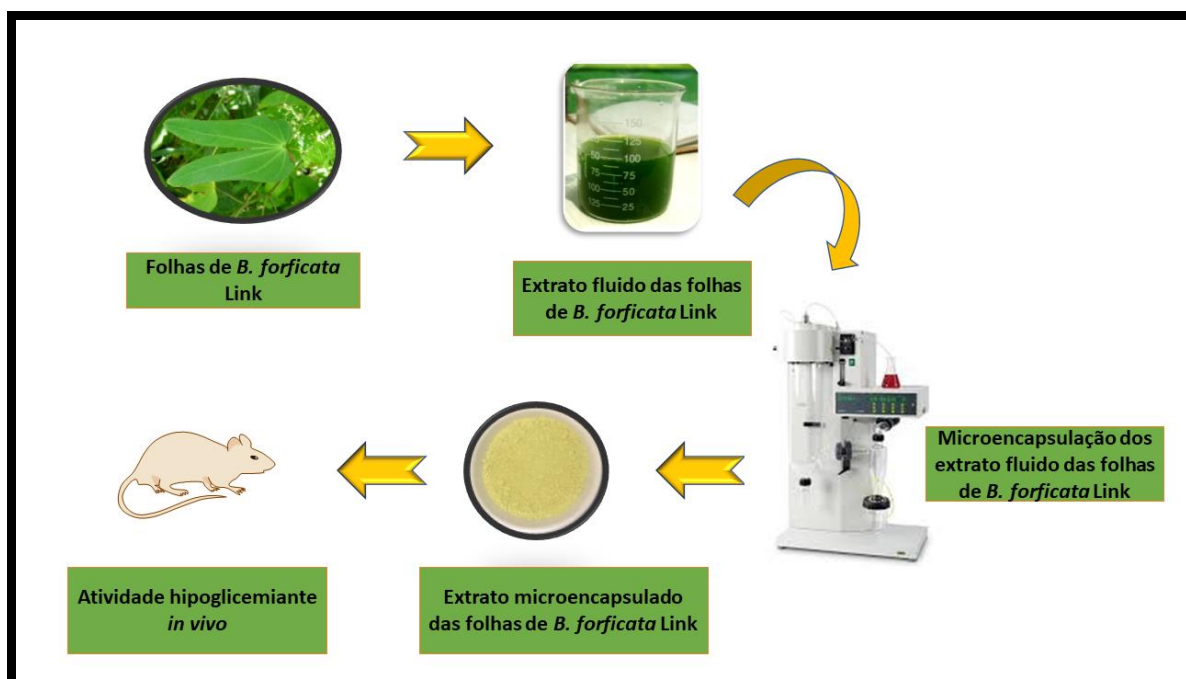
TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T. L. S.; SOARES, G. L. G.; RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155-163, 2012.

VASCONCELOS, E. A. F.; MEDEIROS, M. G. F.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius Raddi* (*Anacardiaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 243-249, 2005.

WANG, T.; LI, Q.; BI, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017.

YANG, W.; ALANNE, A. L.; LIU, P.; KALLIO, H.; YANG, B. Flavonol glycosides in currant leaves and variation with growth season, growth location, and leaf position. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 42, p. 9269-9276, 2015.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, 64, 555-559, 1999.



Capítulo 3

Efeitos hipoglicemiantes de extratos microencapsulados das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina

- Periódico a ser enviado: Food and Chemical Toxicology
- Fator de Impacto: 3.977
- QUALIS A2 em Biotecnologia

Efeitos hipoglicemiantes de extratos microencapsulados das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina

Bárbara Verônica Cardoso de Souza^a, Rita de Cássia Meneses Oliveira^b, Mariana de Moraes Sousa^c, Julianne Viana Freire Portela^d, Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante^e, Rosália Maria Tôrres de Lima^e, Antonielly Campinho Reis^e, José de Sousa Lima Neto^f, Esmeralda Maria Lustosa Barros^b, Alessandra Braga Ribeiro^f, Iramaia Angelica Neri Numa^g, Luís Felipe Lima Matos^f, João Marcelo de Castro e Sousa^e, Tarsia Giabardo Alves, Antonia Amanda Cardoso de Almeida^f, Kenedy Borges dos Santosⁱ, Guilherme de Castro Britoⁱ, Kalil Auzier Martins Costa^f, Maria do Carmo de Carvalho e Martins^b, Lívio César Cunha Nunes^f

^a*Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. E-mail: barbara.vscardoso@ufpi.edu.br**

^b*Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM), Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.*

^c*Departamento de Hospitalidade, Lazer e Produção Alimentícia, Instituto Federal do Piauí, Campus Zona Sul, São Pedro, Teresina, Piauí, Brasil.*

^d*Coordenação do curso de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Picos, Piauí, Brasil.*

^e*Laboratório de Toxicologia Genética, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.*

^f*Coordenação do curso de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.*

^g*Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.*

^h*Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.*

ⁱ*Coordenação de Biomedicina, Faculdade Uninovafapi, Teresina, Piauí, Brasil.*

*Autor correspondente

Departamento de Nutrição-CCS/UFPI, Ininga, CEP: 64048-455, Teresina, Piauí, Brasil

Telefone: + 55 86 99953 4243

E-mail: barbara.vscardoso@ufpi.edu.br

Resumo

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) caracteriza-se por uma hiperglicemia, devido a uma deficiência de insulina causada por disfunção das células β pancreáticas, que pode ser ocasionada pelo estresse oxidativo, com prevalência e morbimortalidade elevadas. Assim, a *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* é uma espécie vegetal com atividade antioxidante significativa e que pode ser utilizada no tratamento dessa patologia e prevenção de suas complicações. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos hipoglicemiantes de extratos microencapsulados, em camundongos diabéticos, bem como a toxicogenética por parâmetros hematológicos, bioquímicos, histopatológicos, além de seus efeitos genotóxicos em multi-órgãos. Realizou-se análises de bioativos e identificação dos compostos por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massas, além da capacidade antioxidante pelos ensaios da captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, pela captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico, poder de redução do íon ferro e pelo método da capacidade de absorção de radicais de oxigênio. Induziu-se o DM2 em camundongos *Swiss* por estreptozotocina e administrou-se os extratos, por 28 dias, sendo verificada a glicemia semanalmente e depois analisou-se os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos. Os resultados mostraram que o extrato seco da infusão (ESIN) teve um teor de bioativos superior ao extrato seco da decocção (ESDC), bem como maior capacidade antioxidante. A glicemia reduziu 77,26%, 57,79% e 45,15%, após a suplementação com ESIN (200 e 600 mg/kg/dia) e ESDC (600 mg/kg/dia), respectivamente, quando comparados com o grupo diabético tratado com metformina (600 mg/kg/dia) (21,53%). Observou-se também uma melhora da resposta glicêmica nesses mesmos grupos, além de uma recuperação das células β pancreáticas. Os extratos, na dose de 2000 mg/Kg, apresentaram efeitos genotóxicos, na medula óssea e fígado. Entretanto, esses efeitos não foram observados no pâncreas e no sangue periférico os danos foram reparados após 14 dias. Assim, este estudo demonstrou que esses extratos, apresentaram atividade hipoglicemiante, com um efeito benéfico superior ao da metformina, sendo potenciais agentes terapêuticos para aplicações em formulações farmacêuticas para o tratamento do DM2.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata* Link. Compostos bioativos. Capacidade antioxidante; Atividade antidiabética.

1 Introdução

O diabetes mellitus (DM) é uma doença com elevada prevalência, que acomete 425 milhões de pessoas em todo o mundo, podendo aumentar para 629 milhões de adultos até 2045, sendo o diabetes tipo 2 (DM2) responsável por mais de 90% dos casos. Embora haja conhecimento sobre seus fatores de risco e diversas políticas públicas com estratégias de prevenção, sua incidência continua aumentando globalmente, por isso pesquisas sobre DM e o desenvolvimento de medicamentos são incentivadas para a busca de novas alternativas para melhorar a qualidade de vida desses pacientes (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017; IDF, 2017).

A epidemiologia do diabetes tipo 2 é afetada por fatores genéticos e ambientais, sendo que os fatores genéticos exercem seus efeitos após a exposição às dietas hipercalóricas, hiperglicídicas e hiperlipídicas associadas ao sedentarismo. Estudos identificaram variantes genéticas de risco para DM2, mas constataram que estas respondem por apenas 10% do fenótipo, sugerindo que a hereditariedade dessa doença metabólica é baixa. Sendo, portanto, necessários mais estudos para elucidar a suscetibilidade genética ao DM2 (GRARUP et al., 2014; MORRIS et al., 2012).

A hiperglicemia é a principal característica do DM2, devido a uma deficiência de insulina causada por disfunção das células β pancreáticas e resistência à insulina nos tecidos, com morbimortalidade elevada e o surgimento de complicações a longo prazo, incluindo retinopatia, nefropatia, danos nos nervos periféricos e doenças cardiovasculares, causando incapacidade funcional e depressão nos pacientes, além de uma sobrecarga financeira para a família, devido aos gastos com insulina, monitoramento da glicemia, antidiabéticos orais e outros medicamentos, com um relevante impacto econômico nos países e nos sistemas de saúde (AJUWON; AYELESO; ADEFOLAJU, 2018).

Referindo-se à patogênese do DM2, concomitante à hiperglicemia e a hiperlipidemia, o estresse oxidativo tem desempenhado um papel relevante, sendo que no DM as mitocôndrias são as principais geradoras das espécies reativas de oxigênio (EROs). Durante o metabolismo oxidativo, um componente do oxigênio utilizado é reduzido a água e o oxigênio remanescente é transformado em radical livre de oxigênio ($O\cdot$), que é convertido em outro radical, como $ONOO^-$, OH e H_2O_2 (KANGRALKAR; PATIL; BANDIVADEKAR, 2010; MOUSSA, 2008).

O aumento na produção de EROs induz alteração na expressão e atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), o que torna os tecidos

mais suscetíveis ao estresse oxidativo, levando ao desenvolvimento das complicações diabéticas (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016). Assim, os antioxidantes como os flavonoides, que eliminam os radicais livres, podem ajudar a prevenir ou combater o DM2 e suas complicações, pois atuam no metabolismo da glicose, diminuindo a glicemia e melhorando a secreção de insulina e sua sensibilidade (HANHINEVA et al., 2010; WALTON, 2017).

A *Bauhinia forficata* Link é uma planta medicinal, pertencente à família *Fabaceae*, sendo uma espécie muito utilizada, nas formas de infusão e decocção, como hipoglicemiante na medicina popular (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012). Diversos estudos relataram os efeitos farmacológicos de suas folhas, devido à presença dos flavonoides, principalmente quercetina e kaempferol, sendo atribuído a um derivado deste último, a kaempferitrina, os efeitos antidiabéticos, bem como a prevenção de complicações associadas ao estresse oxidativo (ALKHALIDY et al., 2018; ECKER et al., 2017; DA CUNHA et al., 2010; JORGE et al., 2004; KHALIL; PEPATO; BRUNETTI, 2008; PIZZOLATTI et al., 2003; SALATINO et al., 1999; SALGUEIRO et al., 2016; SILVA et al., 2000; SOUSA et al., 2004; TZENG et al., 2009; VINAYAGAM; XU, 2015).

Existem algumas drogas comercialmente disponíveis para o tratamento do DM, entretanto, algumas delas não são acessíveis à população, além de possuir efeitos adversos à saúde como distúrbios gastrointestinais, hipoglicemia, ganho de peso, doenças cardiovasculares, toxicidade hepática e infecção do trato urinário. Por isso, a *B. forficata* Link subsp. *forficata* pode ser uma alternativa viável como coadjuvante no tratamento do DM2, com efeitos colaterais mínimos e baixo custo (DE PONTES et al., 2017; DE SOUZA et al., 2018), sendo bastante promissora a sua utilização como extratos secos microencapsulados para serem aplicados em formas farmacêuticas, em relação aos fluidos, devido aos menores custos de armazenamento e maior concentração e estabilidade das substâncias bioativas (ARPAGAUS et al., 2018).

No entanto, a maioria dos estudos com essa espécie vegetal foi realizada com folhas frescas ou extratos fluidos com solventes orgânicos (CECHINEL-ZANCHETT; DE ANDRADE; CECHINEL-FILHO, 2018; DE SOUZA et al., 2018). Assim, o presente trabalho avaliou os efeitos hipoglicemiantes de extratos secos microencapsulados, em modelo animal para diabetes induzidos por estreptozotocina, bem como sua toxicogenética por meio de parâmetros hematológicos, bioquímicos, histopatológicos, além de seus efeitos genotóxicos em multi-órgãos para aplicação em novas formulações farmacêuticas, como um coadjuvante no tratamento do diabetes mellitus tipo 2.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal, Preparação dos Extratos, Produtos Químicos e Reagentes

As folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* foram obtidas em Teresina, Piauí, Brasil (5°03'7.2" S 42°77'26.4" O), em janeiro de 2018. A exsicata da planta foi identificada e depositada na coleção etnobotânica do Herbário Graziela Barroso, da Universidade Federal do Piauí, sob voucher n° 31423. As folhas de *B. forficata* foram submetidas à secagem em estufa industrial, a uma temperatura de 40 °C, durante 52 h, e posteriormente foram pulverizadas em moinho. Os extratos aquosos foram obtidos por decocção e infusão e foram preparados na proporção de 10% (m/v), segundo Menezes et al. (2007) para esta espécie vegetal. O processo de secagem dos extratos foi realizado utilizando-se um *spray-dryer* BUCHI B-290.

Às soluções extrativas, constituídas de 70% de material vegetal, calculado de acordo com o resíduo seco (0,0315 g/mL), foram adicionados os adjuvantes de secagem ou agentes encapsulantes (maltodextrina e dióxido de silício coloidal) e sobre homogeneização, em agitador magnético, a preparação foi submetida ao aparelho nas seguintes condições: temperatura de entrada 110 °C, velocidade de fluxo 5,4 mL/min, injeção 15%, pressão de 0,9 barr e aspersão em 70%. A concentração dos agentes encapsulantes foi de 30% (15% de dióxido de silício coloidal e 15% de maltodextrina), obtida por meio de um planejamento fatorial 2², de acordo com Rolim et al. (2013), no qual obteve-se uma maior encapsulação e proteção dos constituintes bioativos dos extratos. Após a microencapsulação, os extratos secos da decocção (ESDC) e da decocção (ESIN) foram armazenados em tubos Falcons e mantidos em dessecador provido de sílica para análises posteriores.

Todos os produtos químicos e reagentes necessários para a realização deste estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Chem Ex. Co. St. Louis, Missouri, USA).

2.2. Compostos Fenólicos e Capacidade Antioxidante dos Extrato Secos (ESDC e ESIN)

As análises de polifenóis e flavonoides foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Instituto Federal do Piauí (IFPI). Os polifenóis totais foram analisados segundo o método proposto por Swain e Hills (1959), utilizando *Folin Ciocalteu* em meio alcalino, medido a 720 nm em espectrofotômetro UV-VIS e expressos em mg de ácido gálico.g⁻¹ de amostra. Os flavonoides totais foram quantificados pelo método do tricloreto de alumínio

(AlCl₃), de acordo com Zhishen, Mengcheng e Jianming, 1999, os quais foram medidos a 510 nm em espectrofotômetro UV-VIS e expressos em mg de catequina.g⁻¹ de amostra.

A capacidade antioxidante foi realizada pelos métodos da captura do radical DPPH· (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), pela captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}), poder de redução do íon ferro (FRAP), realizadas no Laboratório de Análises de Alimentos do Instituto Federal do Piauí (IFPI) e pelo método da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), realizado no Laboratório de Bioaromas e Compostos Bioativos, do Departamento de Ciências de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O método de sequestro do radical DPPH· foi realizado segundo Kim et al. (2002), com mensuração a 517 nm, em espectrofotômetro UV-VIS, após 30 minutos do início da reação. Os resultados foram expressos em Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC), em µmol de Trolox.g⁻¹ de amostra.

A atividade antioxidante, pelo método de sequestro do radical ABTS^{•+}, foi executada de acordo com Re et al. (1999), mensurada a 734 nm, em espectrofotômetro UV-VIS, após seis minutos do início da reação. Os resultados foram expressos em TEAC, em µmol de Trolox.g⁻¹ de amostra. O poder de redução do íon ferro (FRAP) foi avaliado segundo método proposto por Arnous et al. (2002). As amostras reagiram por 30 minutos com solução de cloreto de ferro (3 mM), em banho-maria a 37 °C. Adicionadas à solução ácida de 2, 4, 6 – tripiridil -1, 3, 5 – triazina (TPTZ) e mensuradas a 620 nm, em espectrofotômetro UV-VIS, após 10 minutos. Os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox (µmol de Trolox.mg⁻¹ de amostra).

O ensaio ORAC foi realizado conforme os métodos descritos por Prior, Hoang, Gu (2003) e Dávalos, Gómez-Cordovés, Bartolomé (2004). As reações foram realizadas em microplacas de poliestireno, específicas para reações de fluorescência, contendo 96 compartimentos (Corning Co[®], NC, USA). Para cada leitura de placa foi preparada uma curva padrão de trolox específica para a avaliação da fração hidrofílica, seguida de diluições apropriadas. Todas as leituras foram realizadas pelo leitor de microplacas NOVOstar (BMG Labtech[®], Offenburg, Germany), acompanhado com o Software de análise de dados MARS Data Analysis versão 1.3 (BMG Labtech[®], Offenburg, Germany).

Os resultados foram expressos em µmol equivalentes de Trolox, utilizando-se a curva padrão de Trolox, realizada para a fração hidrofílica (ORAC-H). A área da perda de fluorescência de uma amostra foi calculada subtraindo a área correspondente à do controle. As leituras foram realizadas em triplicata e os valores expressos como µmol Trolox

equivalente (TE).mg⁻¹ de amostra. As concentrações dos extratos utilizadas para essas análises foram 0,04 g/mL de água.

2.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas- CLAE-MSⁿ

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Bromatologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo (USP). Os principais polifenóis totais e flavonoides foram separados, identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray e analisador de armadilha de íons (CLAE-PDA-ESI-IT-MSⁿ), segundo Cuyckens e Claeys (2004), utilizando uma coluna de fase reversa Luna C18 (2) HST (100 × 3,0 mm, 2,5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA).

As amostras foram filtradas com filtro de nylon 0,22 µm (Millipore, São Paulo, Brasil) e 20 µL foram injetados no sistema de CLAE. A fase móvel foi constituída de água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B.), e foi executada a uma taxa de fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. Um programa de gradiente de 22 minutos foi usado no estudo, iniciando com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila (95:5, v/v), seguido por aceleração até 8% de acetonitrila em 5 min, aumentando para 15% em 8 min, mantendo-se nessa razão por 2 min, e então subindo para 20% de acetonitrila em 12 min, depois para 35% em 15 min e finalmente houve um decréscimo na proporção de acetonitrila para 5%.

O sistema cromatográfico foi um Shimadzu (modelo LC-20ADX Proeminence; Kyoto, Japão) equipado com duas bombas de alta pressão e PDA acoplado ao espectrômetro de massa Bruker (modelo Amazon Speed; Billerica, MA, EUA) com analisador de armadilha de íons e ionização por electrospray (ESI) operado em modo negativo e controlado pelo software HyStar sob a seguinte condição: voltagem capilar, 3,5 kv; temperatura seca, 230°C; fluxo de gás de dessolvatação (N₂), 360 L / h; o intervalo m / z foi de 100-1000. As amostras foram injetadas em triplicata e os polifenóis e flavonoides foram identificados correlacionando seus íons moleculares (m/z) e fragmentos principais com os padrões comerciais (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA).

2.4 Protocolo Experimental com Animais

Camundongos machos (*Mus musculus*), linhagem *Swiss*, de dois a três meses de idade, com 20 a 30 gramas, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em ambiente controlado de temperatura ($23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$), em ciclo claro/escuro de 12 horas (período claro de 6h – 18h), com livre acesso à água (*ad libitum*) e ração comercial para roedores.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI (CEEAA/UFPI N° 008/12) e desenvolvido seguindo as Normas de bem-estar e biossegurança na experimentação animal propostas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os experimentos com os camundongos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Genética Toxicológica – LAPGENIC, do Departamento de Farmácia e no Laboratório de Fisiologia, ambos da Universidade Federal do Piauí (ANEXO A).

2.4.1 Testes de toxicidade aguda dos extratos secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN) das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*

Estudos de toxicidade oral aguda foram realizados de acordo com Guia da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (OECD, 2002). Os camundongos foram alocados em quatro grupos (n=5), sendo que dois grupos receberam uma solução aquosa com os extratos secos microencapsulados das folhas de *B. forficata* Link subsp. *forficata* (ESIN2 e ESDC2), outro grupo que recebeu a solução somente com os adjuvantes de secagem (ADJV2) e um grupo controle negativo (NA) que recebeu somente água destilada. A dose administrada, via gavagem orogástrica, foi de 2000 mg/kg de peso corporal.

Os animais foram monitorados para análise de sinais de toxicidade por meio do *screening* hipocrático, que fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado de consciência e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre os sistemas nervoso central e autônomo conforme Malone e Robichaud (1983), Cunha et al. (2009) e Cunha et al. (2013).

Esse monitoramento ocorreu durante a primeira hora após a administração das substâncias e periodicamente, nas primeiras 24h, com especial atenção nas primeiras 4h, sendo o experimento realizado em três momentos: primeiro dia (T0), sétimo dia (T7) e 14 dia

(T14), além da avaliação ponderal nesses três tempos.

Os parâmetros avaliados foram a triagem da atividade geral do animal, tremor vocal, irritabilidade, resposta de força, aderência da cauda, contorção, tônus corporal, força no agarramento, coordenação negativa, reflexo corneal, tremores, convulsão, hipnose, ptose (inclinação ou queda da pálpebra superior), micção, defecação, piloereção (ereção involuntária ou eriçamento dos pelos), respiração e mortalidade, conforme Brito (1994) e Silva et al. (2016). Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para o monitoramento do consumo de ração, água e eliminação das excretas, durante 14 dias.

Para avaliação genotóxica durante o estudo de toxicidade aguda, realizou-se o ensaio cometa em diferentes tecidos e sangue periférico. A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por Dos Santos et al. (2012) e Speit, Rothfuss (2012). Alíquotas de 10 µL de sangue periférico caudal de camundongos machos foram colhidas, no sétimo dia (T7) e 14 dia (T14) de tratamento e submetidas ao ensaio cometa. No 14 dia de tratamento, alíquotas de 10 µL de homogenato celular de medula óssea, pâncreas, fígado e sangue periférico também foram colhidos e submetidas ao ensaio cometa.

O material celular foi misturado com uma fina camada de agarose *low melting point* 0,75% (90 µL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose controle negativo a 1,5%. As lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso) por até 72 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH > 13) por 20 minutos e, logo em seguida, expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0.90 V/cm) por 15 minutos em cuba de eletroforese.

Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M, pH 7.5 e coradas com solução de prata. Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (%FD). O ID foi calculado por meio da fórmula: $ID = \sum (\text{número de células em determinada classe de dano} \times \text{classe de dano})$, que variou de 0 a 400. E FD pela seguinte fórmula: $FD = 100 - \text{n}^\circ \text{ de células classe } 0$. A medula óssea foi colhida da epífese com soro bovino fetal, centrifugada a 1500 rpm. Após a colheita do fígado e do pâncreas, os órgãos foram macerados em PBS, centrifugados e submetidos ao procedimento supracitado.

2.4.2 Indução do diabetes

Um total de 37 camundongos machos foram utilizados para induzir o diabetes, por meio de uma injeção intraperitoneal de solução recém-preparada de estreptozotocina (STZ,

Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA), em dose única na concentração de 150mg/kg de peso, dissolvida em 0,01 M tampão citrato (pH 4,5), após um jejum de 12 horas segundo Salgueiro et al. (2016). Os camundongos saudáveis receberam o mesmo volume de veículo (tampão citrato). Setenta e duas horas após a indução, o nível de glicose no sangue dos camundongos foi medido tomando uma gota de sangue da ponta da cauda e colocada em um glicosímetro *On Call Plus*. Os camundongos com glicemia de jejum ≥ 240 mg/dL foram considerados diabéticos para este experimento.

2.4.3 *Desenho experimental*

Após o estabelecimento do modelo de DM2, os camundongos foram divididos aleatoriamente em sete grupos com cinco animais cada. O grupo controle negativo (NA) e o grupo diabético (DA) receberam somente água destilada, outro grupo diabético (DM) foi tratado com metformina (DM), na dose de 600mg/kg/dia, e os grupos de tratamento foram administrados com ESIN e ESDC nas doses de 200 mg/kg/dia (DSIN2 e DSDC2) e 600 mg/kg/dia (DSIN6 e DSDC6).

As doses utilizadas nesse estudo foram determinadas a partir do resultado de testes de toxicidade, e também guiados por doses utilizadas em estudos anteriores realizados por Da Cunha et al. (2010), Pereira et al. (2014) e Sousa et al. (2015). Todas as amostras foram administradas por via oral através de uma cânula orogástrica, por um período de 28 dias e os animais foram pesados semanalmente. Amostras de sangue da veia caudal foram colhidas a cada sete dias, após um jejum noturno de oito horas para estimativa da glicemia.

2.4.4. *Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)*

Durante a última semana de tratamento, o TOTG foi realizado nos camundongos, após jejum noturno de 12 horas, de acordo com Pan et al. (2017) e Zhu et al. (2017). Administrou-se uma solução oral de glicose (solução aquosa a 40%), na dose de 2 mg/kg de peso corporal. Em seguida, o sangue foi colhido da veia da cauda dos camundongos nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose, a qual foi aferida usando o glicosímetro.

2.4.5 *Colheita de Sangue e Tecidos*

2.4.5.1 *Determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos*

Após o período experimental, os animais foram anestesiados com tiopental de sódio (40 mg.kg⁻¹, intraperitoneal (i.p.)) e receberam pré-analgesia de lidocaína (10 ou mg.kg⁻¹, i.p.). As amostras de sangue foram colhidas por punção cardíaca e acondicionadas em microtubos com anticoagulante EDTA (ácido tretracético), na concentração de 10 mg/dL, para analisar os seguintes parâmetros hematológicos: eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, contagem total de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e plaquetas), por meio do analisador automático de células hematológicas *Advia 120/hematology* (Siemens), segundo Ferreira et al. (2016).

Realizou-se também testes bioquímicos com as amostras de sangue, conforme Ribeiro et al. (2012), nos quais o sangue foi centrifugado a 3000×g por 10 min a 4°C, imediatamente, e o soro foi obtido para determinação dos níveis de glicose, colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 com sistemas comerciais da LABTEST®. Após a morte do animal, foram colhidos coração, pulmões, estômago, fígado, pâncreas e rins, os quais foram limpos com solução de NaCl a 0,9%, pesados para calcular o índice relativo de cada órgão, sendo os três últimos órgãos fixados com formol a 10% para análises histopatológicas.

2.4.5.2 Exame histopatológico

Os exames histopatológicos foram realizados no Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal do Piauí. Os procedimentos foram realizados de acordo com Li et al. (2012) e Wang et al. (2017), nos quais os tecidos do fígado, rins e pâncreas foram desidratados em séries crescentes de etanol (70 - 100%), diafanização em xilol, seguido de inclusão em parafina histológica. Os blocos de inclusão foram seccionados, em micrótomo convencional, em uma espessura de 3 µm e os cortes obtidos foram submetidos ao processo de coloração por hematoxilina e eosina e as lâminas coradas foram examinadas em um microscópio eletrônico.

2.5 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como médias ± desvios padrão ou erros médios padrão (E.P.M.). Os dados foram analisados por teste de *t-student* para o teor de fenóis e

capacidade antioxidante, análise de variância (ANOVA), teste de Tukey para os demais experimentos e teste de Bonferroni para avaliação genotóxica. Esses dados, assim como as correlações e gráficos, foram analisados usando GraphPad Prism (versão 6.0), com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3 Resultados e discussão

3.1 Compostos Fenólicos e Capacidade Antioxidante dos Extratos Secos da decocção (ESDC) e da infusão (ESIN)

A Tabela 1 mostra a quantificação de polifenóis, flavonoides e a capacidade antioxidante dos extratos secos microencapsulados das folhas de *B. forficata* Link subsp. *forficata* (ESIN e ESDC), pelos métodos da captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH \cdot), captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS \bullet +), poder de redução do íon ferro (FRAP) e pelo método da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC). O teor de polifenóis totais e flavonoides apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os extratos, sendo possível inferir que o ESIN (29,98 mg EAG.g $^{-1}$ e 9,78 EC. g $^{-1}$) contém mais bioativos do que o ESDC (21,49 mg EAG.g $^{-1}$ e 3,06 EC.g $^{-1}$). Os resultados deste estudo, apresentam valores de flavonoides superiores ao obtidos por Da Cunha et al (2010), para extratos secos em estufa e por *spray drying* das folhas de *B. forficata*.

Tabela 1- Conteúdo de polifenóis, flavonoides e capacidade antioxidante dos extratos secos da decocção (ESDC) e da (ESIN) das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.

	ESIN	ESDC
Polifenóis (mg EAG. g $^{-1}$) ¹	29,98 \pm 0,08 ^a	21,49 \pm 0,14 ^b
Flavonoides (9,78 EC. g $^{-1}$) ²	9,78 \pm 0,28 ^a	3,06 \pm 0,03 ^b
DPPH \cdot (μ mol Trolox.g $^{-1}$) ³	101,60 \pm 0,35 ^a	64,72 \pm 0,47 ^b
ABTS \bullet + (μ mol Trolox.g $^{-1}$) ³	8,12 \pm 0,01 ^a	7,11 \pm 0,01 ^b
FRAP (μ mol Trolox.g $^{-1}$) ³	118,86 \pm 0,82 ^a	57,68 \pm 0,93 ^b
ORAC (μ mol Trolox.mg $^{-1}$) ⁴	1465,63 \pm 1,97 ^a	1102,03 \pm 0,92 ^b

Os valores são apresentados como médias \pm desvio padrão. ESIN: extrato seco da infusão. ESDC: extrato seco da decocção. DPPH \cdot : captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil. ABTS \bullet +: captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). FRAP: Poder de redução do íon ferro. ORAC: Capacidade de absorção de radicais de oxigênio. ^{a, b} letras diferentes na mesma linha mostram diferenças estatisticamente significativas entre os extratos ($p < 0,05$; pelo teste *t-student*); ¹ expressos em mg de equivalente de ácido gálico.g $^{-1}$ dos extratos secos para polifenóis totais (PT); ² mg de equivalente de catequina.g $^{-1}$ dos extratos secos para flavonoides totais (FT); ³ μ mol de equivalente de trolox.g $^{-1}$ dos extratos secos; ⁴ μ mol trolox equivalente.mg $^{-1}$ de amostra.

Referindo-se à atividade antioxidantes desses extratos, também foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre eles, em todos os ensaios (DPPH, ABTS, FRAP e ORAC), nos quais o ESIN obteve maior atividade (101,60 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, 8,12 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, 118,86 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, 1465,63 $\mu\text{mol Trolox.mg}^{-1}$), em relação ao ESDC (64,72 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, 7,11 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, 57,68 $\mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, 1102,03 $\mu\text{mol Trolox.mg}^{-1}$), mostrando que os tipos de flavonoides extraídos no processo de infusão tiveram uma melhor resposta ao estresse oxidativo (Tabela 1).

No presente estudo, ambos extratos apresentaram capacidade antioxidante, no ensaio ORAC, superior a do ácido ascórbico (1136,0 $\mu\text{mol trolox eq/g}$) e a de extratos etanólicos obtidos no estudo de Franco et al. (2018), para a mesma espécie vegetal, 855,8 $\mu\text{mol trolox eq/g}$, mostrando que o processo de extração e microencapsulação dos extratos estudados preservaram o conteúdo de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante. Esses resultados são importantes, pois esse ensaio possui algumas vantagens, em relação aos demais métodos antioxidantes, como o fato de ser realizado em temperatura e pH fisiológicos e, ao usar a fluorescência ao invés de absorbância, reduzindo a interferência dos compostos coloridos presentes nas amostras, conforme relataram Dávalos, Gómez-Cordovés, Bartolomé (2004) e Prior, Hoang, Gu (2003).

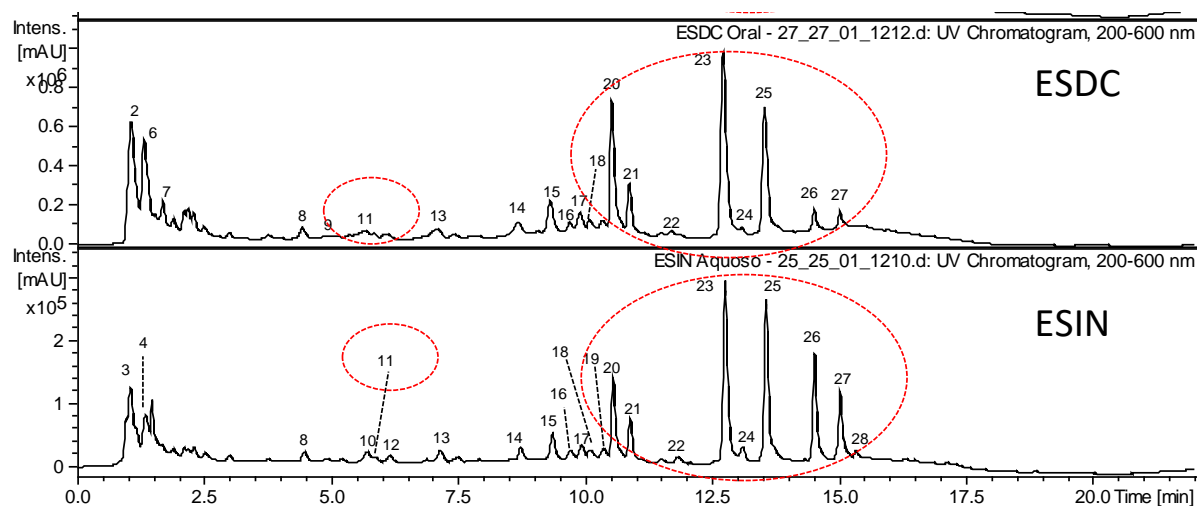
Os extratos ESIN e ESDC podem ser uma fonte potencial de compostos antioxidantes, que desempenham um papel na desintoxicação do corpo, eliminando as espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio gerados pela hiperglicemia, condição presente no DM, sugerindo que essa capacidade antioxidante contribui positivamente na prevenção e tratamento dessa patologia, além de atuarem como moléculas sinalizadoras no retículo endoplasmático mitocondrial e nas vias enzimáticas no metabolismo, ressalta-se, portanto, a relevância em verificar o conteúdo de compostos fenólicos, bem como a atividade antioxidantes presentes em extratos vegetais para avaliar sua atividade hipoglicemiante (BJØRKLUND; CHIRUMBOLO, 2017; SALIU et al., 2012).

3.2 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos acoplada à espectrometria de massas (CLAE-PDA-ESI-IT-MSⁿ)

Na análise cromatográfica foram identificados, nos extratos estudados, principalmente ácidos fenólicos e seus derivados glicosilados (entre 8 – 10 minutos) e flavonoides C- e O-glicosilados entre 10-20 minutos do cromatograma (Figura 1). Da Cunha et al. (2010), Da Silva e Filho (2002), Filho (2009) e Pizzolatti et al. (2003), em seus estudos com extratos das

folhas de *B. forficata* também constataram que os compostos fenólicos, especialmente flavonoides, são seus principais constituintes.

Figura 1 - Cromatogramas dos flavonoides e seus derivados *O*-glicosilados presentes nos ESDC e ESIN das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* obtidos pela análise de CLAE-PDA-ESI-IT-MSⁿ.



ESDC: extrato seco decocção. ESIN: extrato seco infusão. CLAE-PDA-ESI-IT-MSⁿ: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos acoplada a espectrometria de massas sequencial com ionização por *electrospray* e analisador de armadilha de íons.

Fonte: Autoria própria (2019).

Os picos de número 11, 20 e de 23 a 28 apresentaram espectros de UV com bandas de absorção entre 254 e 365 nm característico de flavonóis. O pico de número 11 apresentou como íon não protonado a m/z 447, sendo que, sua fragmentação de segunda ordem ($MS^2[447]$), originou o íon produto m/z 315, por perda de uma pentose *O*-glicosilada ($[M-132-H]^-$), onde m/z 315 refere-se a aglicona do flavonol isoramnetina através da quebra de ligação Y_0 , composto também identificado por Farag et al (2015), em seu estudo com oito espécies de *Bauhinia*.

Os picos 23 e 24 podem ser dois isômeros do kaempferol-*O*-ramnosil-3-*O*-rutinosídeo, devido as fragmentações sequenciais semelhantes ao pico 20 (MS^2 [739]: m/z 593 e (MS^3 [739 \rightarrow 593]: m/z 285), que evidenciam serem moléculas isômeras entre si, tendo o kaempferol como aglicona e perdas sequenciais de uma ramnose e uma rutinose. Farias e Mendez (2014), Ferreres et al. (2012), Santos, Fortunato e Spotorno (2018), também identificaram derivados de flavonoides em extratos dessa mesma espécie vegetal, incluindo glicosídeos de kaempferol, cujos íons foram identificados como flavonoides-*O*-glicosídeos.

3.3 Toxicidade aguda dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*.

A toxicidade aguda dos extratos secos microencapsulados das folhas de *B. forficata* Link subsp. *forficata* foi realizada em camundongos, de acordo com o Guia da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (OECD, 2002). Administrou-se uma dose máxima recomendada de 2000 mg/kg de peso corporal e, em seguida, os camundongos foram observados em relação às mudanças comportamentais gerais, sintomas de toxicidade e mortalidade após o tratamento nas primeiras quatro horas, que são as mais críticas, depois durante um período de 24 horas e, posteriormente, durante 14 dias. No final do experimento, nenhuma mortalidade, ou qualquer evidência observável de toxicidade comportamental foram verificadas.

Pereira et al. (2014) também realizaram um estudo de toxicidade aguda com extrato hidroalcoólico de *B. forficata* Link, nesta mesma dose, e não foi constatado nenhum óbito, indicando que este extrato não apresenta toxicidade relativa na concentração testada. Düsman et al. (2013), verificaram que esta planta tem um bom potencial para uso seguro como medicamento, pois mostraram que o extrato aquoso não apresentou atividade citotóxica nas células da medula óssea de ratos *Wistar*, além de contribuir para a redução dos danos cromossômicos induzidos pela quimioterapia, por sua atividade antimutagênica no pré-tratamento (71%), tratamento simultâneo (91%) e pós-tratamento (95%) com ciclofosfamida. Pepato et al (2004), em seu estudo com ratos diabéticos e normais, que receberam decocção aquosa de folhas de *B. forficata*, na concentração de 150 g/L, por via oral, durante 33 dias, também não encontraram efeitos tóxicos mensuráveis com os marcadores enzimáticos utilizados.

Dos Santos et al. (2011) estudaram os efeitos do extrato etanólico e das frações etérea, aquosa e acetato de etila de *B. platypetala*, administrados por via intraperitoneal em camundongos, sobre a atividade motora espontânea (motilidade total, locomoção, comportamento de criação e *grooming*), cujos resultados revelaram que esses extratos e suas frações não alteraram a atividade motora e a frequência respiratória e não induziram tremores e convulsões a 12,5, 25 ou 50 mg/kg (ip), não mostrando sinais de toxicidade, sendo que apenas a dose mais alta da fração etérea (50 mg / kg, ip.) causou uma diminuição significativa na motilidade total e locomoção.

A toxicidade sistêmica, além da avaliação do *screening* hipocrático, pode ser verificada por meio da redução nos consumos de água, ração, peso corporal e da massa

relativa dos órgãos, de acordo com González e Silva (2002) e Teo et al. (2002). O peso corporal é um dos parâmetros mais empregados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal. Lu et al. (2014) consideraram o aumento ou perda de peso corporal com importância toxicológica se a alteração for de pelo menos 10%. A administração aguda de ESDC2 e ESIN2 não reduziu nenhum dos parâmetros avaliados, em relação ao controle negativo (NA) (Tabela 2), não apresentando toxicidade significativa desses extratos.

Tabela 2 - Médias do peso corporal, consumo de ração, de água e excretas em camundongos tratados com dose aguda de extratos secos microencapsulados de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* em camundongos.

Parâmetros	NA	ADJV2	ESDC2	ESIN2
Peso corporal (g)	25,13±0,25	26,49±0,64	28,73±0,17*	28,24±0,69*
Consumo de ração (g)	10,00±0,86	9,23±0,65	8,76±1,34	9,88±0,31
Consumo de água (mL)	22,87±2,23	26,00±1,14	30,50±1,32*	31,10±1,05*
Excretas (g)	4,58±0,15	2,92±0,50	3,56±0,62	4,03±0,73

Os valores representam as médias \pm E.P.M. NA = Controle negativo. ADJV = Normais tratados com adjuvantes tratados na dose de 2000 mg/Kg. ESDC2 = Normais tratados com extrato seco da decoção na dose de 2000 mg/Kg. ESIN2 = Normais tratados com extrato seco da infusão na dose de 2000 mg/Kg. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, *one-way*, seguido de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao grupo NA.

Fonte: Autoria própria (2019).

Os resultados do monitoramento genotóxico realizado durante a toxicidade aguda podem ser observados nas Tabelas 3 e 4. Os índices e frequência de danos no DNA no sangue periféricos dos animais, após sete dias da administração dos extratos, apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo (NA), porém, após 14 da administração, observou-se que os danos no DNA foram reparados, quando comparados ao controle positivo (CPA).

Na medula óssea dos camundongos tratados com os extratos apresentaram efeitos genotóxicos, na dose de 2000 mg/Kg, nos grupos ADJV2, ESIN2 e ESDC2, com índices de danos de $161 \pm 7,43$, $150,60 \pm 2,88$ e $166 \pm 16,10$, respectivamente. No fígado também foram constatados danos, contudo estes foram inferiores aos verificados pela ciclofosfamida (CPA) ($264 \pm 44,61$), quando comparados ao controle negativo (NA) ($54,80 \pm 5,26$). Entretanto, esses efeitos não foram observados no pâncreas dos animais dos grupos tratados com os extratos ESIN2 ($54,20 \pm 9,52$) e ESDC2 ($61,20 \pm 12,07$), não apresentando diferenças estatísticas em relação ao controle negativo (NA) ($52,40 \pm 5,03$).

Tabela 3. Efeitos genotóxicos e de reparo dos extratos secos microencapsulados de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* avaliados pelo índice e frequência de danos em sangue periférico de camundongos.

Grupos	Administração oral (2000 mg/kg)	
	Índice de danos (0 a 400)	Frequência de danos (%)
NA	50,00±4,50	32,80±7,19
CPA	317,00±51,92*** ^a	99,80±0,44*** ^a
ADJV2 (T7)	317,00±20,17*** ^a	99,40±0,49*** ^a
ESIN2 (T7)	232,20±12,26*** ^a	93,00±3,14*** ^a
ESDC2 (T14)	237,60±14,91*** ^a	93,60±2,96*** ^a
ADJV2 (T14)	153,00±37,06*** ^{b,c}	61,80±9,44*** ^{b,c}
ESIN2 (T14)	124,20±5,97*** ^{b,c}	56,00±8,61*** ^{b,c}
ESDC2(T14)	151,60±30,04*** ^{b,c}	49,40±9,86*** ^{b,c}

Os valores representam as médias ± desvios padrão (100 células por experimento). NA = Controle negativo. CPA = ciclofosfâmina (50 mg/kg) (controle positivo). ADJV = Normais tratados com adjuvantes tratados na dose de 2000 mg/Kg. ESIN2 = Normais tratados com extrato seco da infusão na dose de 2000 mg/Kg. ESDC2 = Normais tratados com extrato seco da decoção na dose de 2000 mg/Kg. T7 = sétimo dia após a administração. T14 = 14º dia após a administração. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, *two-way*, seguido de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ^a em relação ao grupo NA, ^b em relação ao grupo CPA, ^c em relação ao T7.

Dos Santos et al. (2012), verificaram que o extrato etanólico de *Bauhinia platyptala* não induziu efeitos mutagênicos na linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*, mas a fração etérea de *B. platyptala* em concentrações mais altas (250–500 µg/mL) induziu citotoxicidade e mutagenicidade. O ensaio cometa realizado com esses dois extratos mostrou um ligeiro efeito citotóxico em células V79 de mamíferos, e tanto o extrato etanólico de *B. platyptala*, quanto sua fração etérea foram capazes de induzir quebras de fita de DNA nessas células. Vale ressaltar que no presente estudo, testou-se os extratos da *B. forficata* em uma concentração elevada de 2000 mg/Kg/peso.

De Sousa et al. (2004) e Varela-Barca, Agnez-Lima, De Medeiros (2007), em seus estudos com espécies de *Bauhinia*, mostraram resultados divergentes quanto ao potencial mutagênico de seus extratos, o que pode ser explicado pelos diferentes compostos químicos que podem estar presentes, dependendo do tipo de extratos. Hodek, Trefil, Stiborová (2002) e Skibola e Smith (2000) constataram que os flavonoides podem apresentar atividade antioxidante ou mutagênica em função de seu número e da posição dos grupos hidroxila nos anéis A e B, como também dependendo dos tipos de solventes utilizados para a extração desses compostos.

Tabela 4. Efeitos genotóxicos dos extratos secos microencapsulados de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* avaliados pelo índice e frequência de danos na medula óssea, fígado e pâncreas de camundongos, após 14 dias de tratamento.

Grupos	Índice de danos (0-400)			Frequência de danos (%)		
	Medula óssea	Fígado	Pâncreas	Medula óssea	Fígado	Pâncreas
NA	52,20±5,40	54,80±5,26	52,40±5,03	35,00±12,02	45,80±6,38	33,60±6,87
CPA	273,20±57,22*** ^a	264,40±44,61*** ^a	264,40±55,92*** ^a	94,20±5,80*** ^a	89,00±7,17*** ^a	87,20±5,45*** ^a
ADJV2	161,20±7,43*** ^a	103,40±7,12* ^a	63,20±9,52	88,60±5,77* ^a	77,00±5,56* ^a	44,00±4,18
ESIN2	150,60±2,88*** ^a	112,20±12,40** ^a	54,20±9,52	72,40±2,07* ^a	81,60±3,57* ^a	54,40±6,06
ESDC2	166,80±16,10*** ^a	110,40±12,93** ^a	61,20±12,07	82,00±3,93* ^a	77,16±6,04* ^a	51,80±3,49

Os valores representam as médias ± desvios padrão (100 células por experimento). NA = Controle negativo. CPA = ciclofosfamida (50 mg/kg) (controle positivo). ADJV = Normais tratados com adjuvantes tratados na dose de 2000 mg/Kg. ESIN2 = Normais tratados com extrato seco da infusão na dose de 2000 mg/Kg. ESDC2 = Normais tratados com extrato seco da decocção na dose de 2000 mg/Kg. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, *two-way*, seguido de pós-teste de Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01, *** p <0,001. ^a em relação ao grupo NA.

3.5 Efeitos dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) no peso relativos dos órgãos

O peso relativo dos principais órgãos de camundongos, tratados com uma dose única de ESIN e ESDC, não apresentou alterações significativas em relação ao controle negativo (NA). No tratamento durante 28 dias, observou-se uma redução do pâncreas nos grupos DM, DSIN2 e DSDC6, quando comparados ao NA, devido ao diabetes. O fígado não teve alteração nos animais tratados, com tamanhos semelhantes ao NA, com exceção do DSIN6 que teve um aumento, que foi observado também nos pulmões e estômago (Tabela 5).

Tabela 5. Pesos relativos dos órgãos (g/100 de peso corporal) de camundongos tratados com extratos secos microencapsulados de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* em camundongos.

Órgãos	Administração oral (14 dias) (2000 mg/kg)			
	NA	ADJV2	ESIN2	ESDC2
Fígado	6,14±0,26	3,61±0,85	4,26±0,30	5,60±0,40
Pâncreas	0,91±0,13	0,45±0,09	0,30±0,06	1,54±0,68
Rins	1,37±0,19	1,20±0,26	1,14±0,23	1,53±0,07
Coração	0,70±0,02	0,46±0,09	0,37±0,08	0,50±0,01
Pulmões	0,78±0,01	0,54±0,11	0,54±0,11	0,99±0,30
Estômago	1,08±0,06	0,69±0,15	0,69±0,14	0,81±0,08

Órgãos	Administração oral (28 dias) (200 mg/kg e 600 mg/kg)						
	NA	DA	DM	DSIN2	DSIN6	DSDC2	DSDC6
Fígado	5,31±0,18	6,12±1,04	4,66±0,38	5,20±0,55	8,50±0,56*	5,19±0,34	5,21±0,26
Pâncreas	0,84±0,08	0,49±0,08	0,42±0,05*	0,28±0,10*	0,65±0,14	0,61±0,06	0,47±0,06*
Rins	1,12±0,15	1,31±0,29	0,94±0,24	0,75±0,19	1,86±0,18	0,90±0,17	0,94±0,17
Coração	0,58±0,04	0,57±0,09	0,39±0,05	0,45±0,05	0,88±0,15	0,35±0,01	0,49±0,06
Pulmões	0,70±0,02	0,71±0,07	0,51±0,05	0,69±0,07	1,22±0,11*	0,59±0,03	0,84±0,05
Estômago	0,92±0,03	0,97±0,18	0,83±0,10	0,76±0,28	1,77±0,23*	0,97±0,06	0,95±0,04

Pesos relativos calculados com base no peso absoluto do órgão (g) pelo valor do peso do animal vivo (g)x100. Os valores representam as médias ± E.P.M. NA = Controle negativo. ADJV = Normais tratados com adjuvantes tratados na dose de 2000 mg/Kg. ESDC2 = Normais tratados com extrato seco da decocção na dose de 2000 mg/Kg. ESIN2 = Normais tratados com extrato seco da infusão na dose de 2000 mg/Kg. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey. *p<0,05 comparado ao grupo NA.

3.6 Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) nos parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos foram analisados, pois são critérios importantes para avaliar a extensão da homeostasia e das alterações resultantes de processos patológicos e de toxicidade, conforme Ashafa et al. (2009) e Okonkwo et al. (2016). Foram constatadas diminuições nos neutrófilos e aumento dos linfócitos em todos grupos tratados com a dose máxima de 2000 mg/kg/peso, quando comparados ao NA. Isso pode ser justificado pelo fato de compostos bioativos, em altas doses, passam de antioxidantes para pró-oxidantes, que podem causar inflamação e induzir apoptose, porém esse último efeito pode ser benéfico quando aplicado no tratamento de neoplasias, segundo Cerqueira, De Medeiros e Augusto (2007).

No tratamento de 28 dias, os leucócitos estavam aumentados nos grupos DM, DSIN6 e DSDC2, alteração que pode ser justificada pelo diabetes, que é uma doença crônica e inflamatória, conforme relatado por Asmat, Abad e Ismail (2016). Os linfócitos e neutrófilos também apresentaram alterações no DM, mostrando que esse grupo, tratado com a metformina (600 mg/kg/peso), foi o que apresentou mais alterações (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros hematológicos após administração oral de extratos secos microencapsulados de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* em camundongos.

Parâmetros	Administração oral (14 dias) (2000 mg/kg)			
	NA	ADJV2	ESIN2	ESDC2
HEM (10 ⁶ /uL)	9,3±0,5	7,8±0,3	6,9±0,6	8,7±0,7
HGB (g/dL)	14,5±0,4	14,9±0,5	14,5±0,4	16,2±0,6
HTC (%)	53,5±1,6	45,8±5,2	42,5±4,7	49,6±0,5
LTC (10 ³ /uL)	2522,0±163,9	3115,0±425,0	2913,3±403,5	2235,0±8
NTL (%)	55,3±9,3	3,6±2,1*	9,6±1,2*	5,5±0,3*
LTL (%)	31,0±5,5	78,2±14,1*	86,4±3,2*	74,2±10,0*
MNT (%)	12,0±2,0	5,2±4,1	2,8±0,1	12,2±0,2
ESL (%)	0,7±0,3	0,1±0,0	0,1±0,0	0,7±0,1
BSL (%)	3,7±0,6	12,8±7,8	4,3±0,5	12,4±4,1
PLT (10 ³ /uL)	803,0±25,0	789,0±55,0	644,7±42,0	592,0±116,0

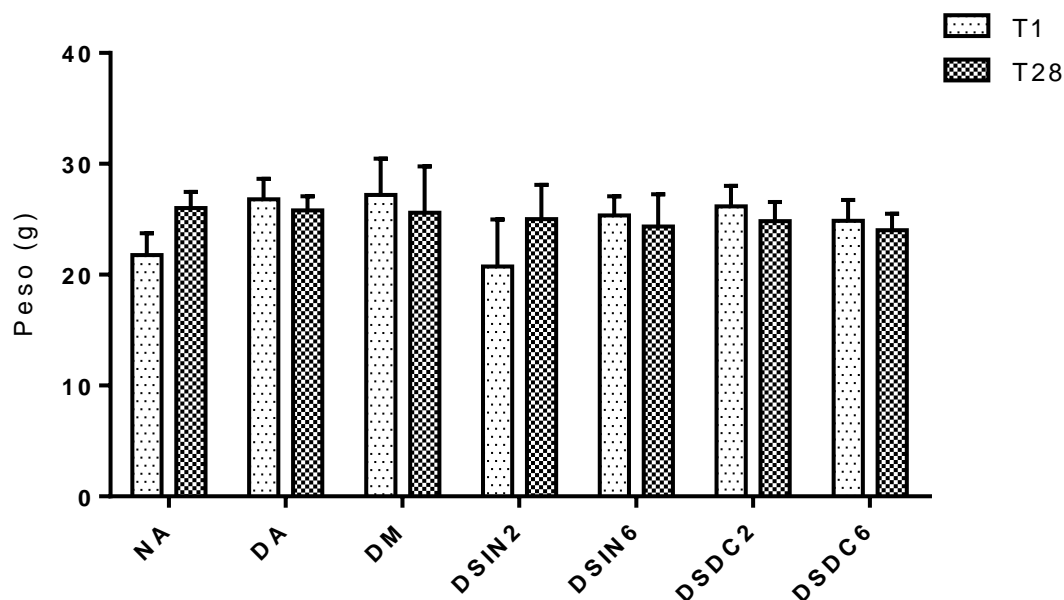
Parâmetros	Administração oral (28 dias) (200 mg/kg e 600 mg/kg)						
	NA	DA	DM	DSIN2	DSIN6	DSDC2	DSDC6
HEM (10 ⁶ /uL)	9,5±0,2	9,6±0,6	8,7±0,4	7,9±0,6	8,9±0,3	9,2±0,3	9,4±0,2
HGB (g/dL)	14,6±0,3	14,5±0,8	14,5±0,5	13,5±0,8	13,7±0,5	15,7±0,6	14,70±0,3
HTC (%)	52,7±0,8	52,6±4,3	52,2±0,9	46,3±4,9	44,7±3,2	51,3±1,8	51,87±1,3
LTC (10 ³ /uL)	2290,5±40,1	2210,0±92,9	3265,7±198,2*	2310,3±59,9	3810,0±109,7*	3321,7±143,6*	2578,0±168,0
NTL (%)	42,2±11,3	36,4±7,3	2,6±0,7*	28,7±0,3	12,0±1,4*	2,8±0,81*	5,9±1,4*
LTL (%)	46,7±11,0	58,6±8,2	88,4±2,2*	66,0±8,7	81,0±3,3	75,3±9,82	77,6±6,4
MNT (%)	7,8±1,9	4,0±1,1	4,2±1,3	4,5±1,5	6,7±1,8	3,9±0,96	4,6±1,4
ESL (%)	0,3±0,2	0,6±0,2	0,6±0,2	0,2±0,25	0,0±0,0	0,2±0,02	0,15±0,0
BSL (%)	2,0±0,6	0,4±0,2	5,6±0,9	0,5±0,3	0,5±0,2	7,9±1,59*	2,9±1,0
PLT (10 ³ /uL)	772,8±28,9	1007,4±80,9	832,5±134,5	695,2±73,8	835,0±49,8	913,8±49,4	826,1±46,9

HEM: hemácias; HGB: hemoglobina, HTC: hematócrito; LTC: leucócitos; NTL: neutrófilos; LTL: linfócitos; MNT: monócitos; ESL: eosinófilos; BSL: basófilos e PLT: plaquetas. Os valores representam as médias ± E.P.M. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey. *p<0,05 comparado ao grupo NA.

3.7 Efeitos dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) no peso, nível de glicose sanguínea e tolerância oral à glicose

A Figura 2 mostra o efeito dos extratos ESIN e ESDC no peso corporal, que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados em relação ao grupo controle negativo (NA), tanto no dia 1, quanto no dia 28. Um estudo realizado por Martínezmartínez et al. (2018), com ratos diabéticos, mostrou que esses animais também não tiveram um ganho ponderal significativo, ao longo do tratamento com o decocto das folhas de *B. forficata*.

Figura 2 - Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* no peso corporal de camundongos diabéticos.



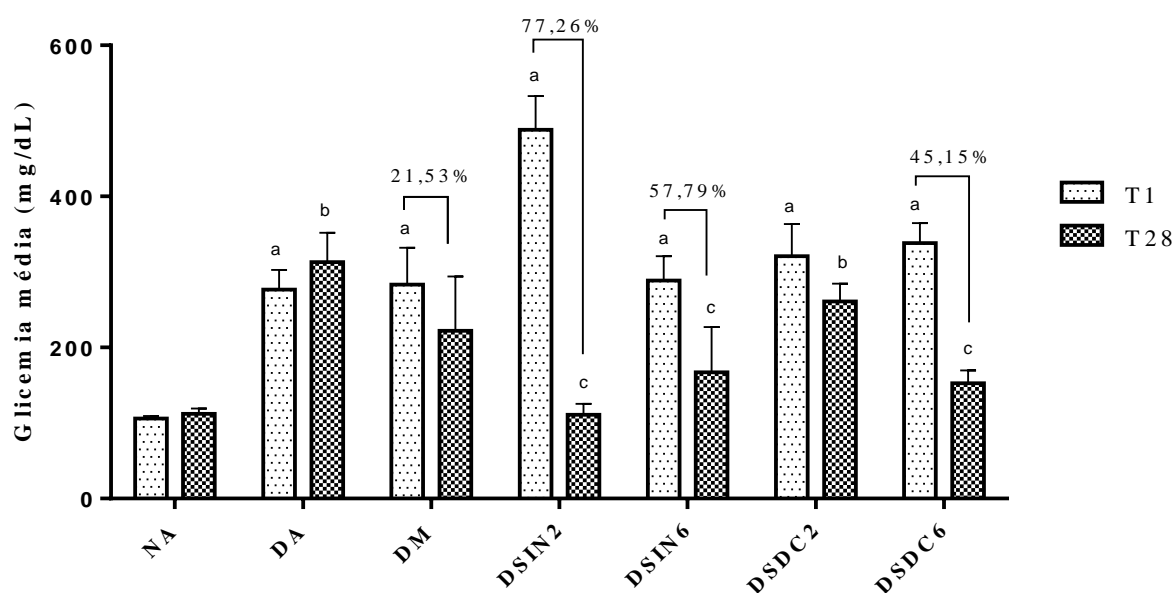
Os valores representam as médias \pm E.P.M. NA = Controle negativo. DA = Diabéticos sem tratamento. DM = Diabéticos tratados com metformina na dose de 600 mg/Kg. DSIN2 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 200 mg/Kg. DSIN6 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 600 mg/Kg. DSDC2 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 200 mg/Kg. DSDC6 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 600 mg/Kg. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Autoria própria (2019).

O nível da glicemia de jejum de todos os grupos experimentais foi mostrado na Figura 3. O nível de glicose no sangue dos grupos diabéticos teve uma elevação significativa em comparação com os camundongos normais (NA) ($p < 0,05$), indicando o estabelecimento bem-

sucedido do modelo de DM2. Após quatro semanas de suplementação com os extratos ESIN e ESDC, os níveis de glicose no sangue dos grupos DSIN2 (200 mg/kg/dia), DSIN6 (600 mg/kg/dia), DSDC6 (600 mg/kg/dia) reduziram de forma significativa, 77,26%, 57,79% e 45,15%, respectivamente, quando comparados com o grupo diabético tratado com metformina (600 mg/kg/dia), que reduziu apenas 21,53% da glicemia, ao final dos 28 dias e, que não apresentou diferença estatística em relação ao grupo DA.

Figura 3 - Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* na glicose sanguínea de camundongos diabéticos.



Os valores representam as médias \pm E.P.M. NA = Controle negativo. DA = Diabéticos sem tratamento. DM = Diabéticos tratados com metformina na dose de 600 mg/Kg. DSIN2 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 200 mg/Kg. DSIN6 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 600 mg/Kg. DSDC2 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 200 mg/Kg. DSDC6 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 600 mg/Kg. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey. ^a $p < 0,05$ comparado ao NA em T1, ^b $p < 0,05$ comparado ao NA em T28, ^c $p < 0,05$ comparado ao DA em T28.

Fonte: Autoria própria (2019).

Dos grupos tratados com os extratos, somente o grupo DSDC2 (200mg/kg/dia), não obteve uma redução da glicemia, sendo semelhante ao grupo diabético sem tratamento (DA). Esses resultados mostram a eficácia dos extratos microencapsulados das folhas de *B. forficata* subsp. *forficata* na redução da glicemia, em camundongos diabéticos, nas duas doses testadas e nos dois tipos de extratos ESIN e ESDC, com exceção da dose de 200mg/kg/dia desse último extrato, sendo que ambos extratos tiveram resultados de glicemias semelhantes ao grupo não diabéticos (NA) ($p > 0,05$), confirmando que são eficazes no tratamento do DM2.

Esses resultados são importantes, pois esses extratos podem ser usados pelos pacientes diabéticos, associados a um fármaco sintético ou ao uso da insulina para melhorar a sua eficácia, possibilitando que o indivíduo seja tratado com doses mais baixas da droga e do hormônio, reduzindo os efeitos colaterais, como aqueles causados pela metformina, por exemplo (náuseas, diarreia, flatulência, inapetência e dor estomacal), conforme Cobble e Peters (2009) e De Souza et al. (2018). Sendo que os extratos de algumas espécies de *Bauhinia* podem até melhorar esses sintomas gastrointestinais, principalmente a diarreia, de acordo com o estudo realizado por Ahmed et al. (2012).

Os efeitos benéficos no DM2 dos extratos ESIN e ESDC podem estar relacionados com os vários flavonoides glicosídeos, quercetina e kaempferol, presentes nas folhas da *B. forficata* subsp. *forficata*, por meio de sua atuação em múltiplos locais do metabolismo dos carboidratos, nas vias reguladoras da glicose, melhorando sua tolerância pelos tecidos, biossíntese de glicogênio, captação de glicose e liberação de insulina, conforme já constatado por Cazarolli et al. (2009), Santos, Fortunato, Spotorno (2018) e Sharma, Balomajumder, Roy (2008). Entretanto, no presente estudo, como não foi identificada a quercetina, na análise cromatográfica, pode-se inferir que a redução da glicemia pode ter sido causada pelo kaempferol.

Cazarolli et al. (2013) investigaram um possível mecanismo de ação do derivado do kaempferol, a kaempferitrina, considerada como o marcador bioquímico dessa espécie vegetal, no qual verificaram que o aumento da captação de glicose causada por esse bioativo, no tecido muscular, ocorre através das vias clássicas de sinalização da insulina, envolvendo fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K), MAP-quinase (MAPK), translocação e síntese do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), além de estimular a síntese de glicogênio.

Alkhalidy et al. (2018) observaram que uma única dose diária de kaempferol, via oral, pode melhorar significativamente a hiperglicemia e aumentar a tolerância à glicose em camundongos deficientes em insulina, o que está associado ao aumento da eliminação e utilização da glicose, em particular a oxidação no tecido muscular e supressão da produção de glicose hepática.

Um estudo realizado por Da Cunha et al. (2010), com extratos das folhas de *B. forficata* Link, secos por *spray drying* e em estufa, obtidos a partir de extrato fluido usando como solventes etanol e água (1: 2), verificaram resultados semelhantes ao presente estudo, ao constatar uma redução da glicose em jejum, após sete dias de tratamento, na dose 200 mg/kg de peso corporal em ratos diabéticos induzidos por STZ.

Uma pesquisa sobre a atividade antidiabética com oito espécies de *Bauhinia* foi

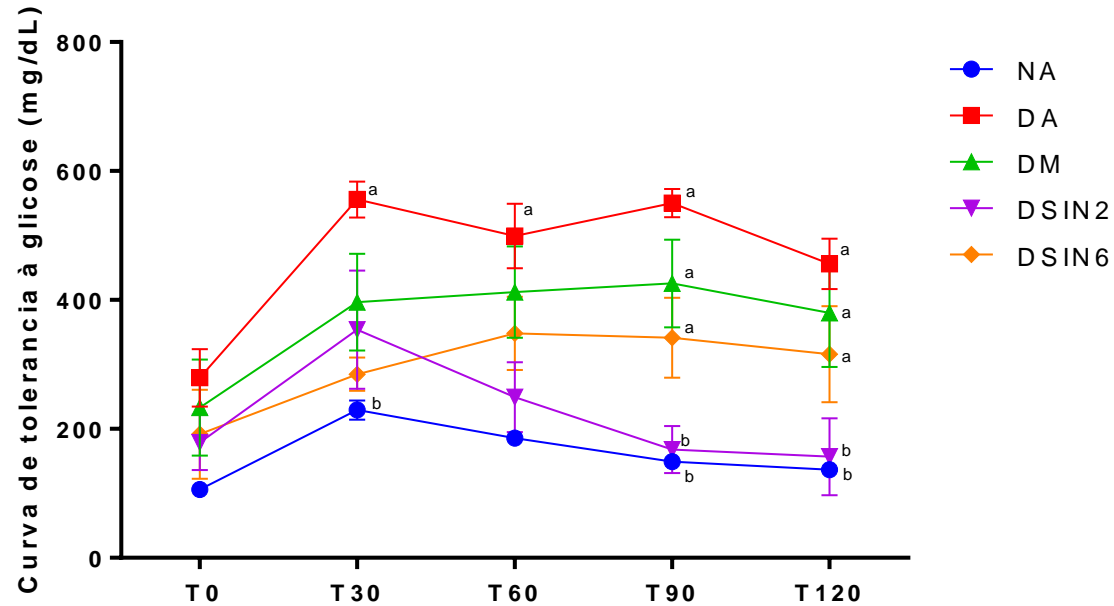
realizada por Farag et al. (2015), usando o ensaio de inibição da alfa-glicosidase, cujos resultados mostraram que essas diferentes espécies estudadas possuem um potencial efeito antidiabético, pois retardam a digestão dos carboidratos, resultando em níveis mais baixos de glicose pós-prandial e, portanto, podem ajudar a evitar altos picos de glicose no DM2, sendo confirmado também, por Ferreres et al. (2012), o uso de espécies de *Bauhinia* como agentes antidiabéticos.

Em contrapartida, Volpato et al. (2008) administraram em ratas grávidas e não grávidas, por via oral, extrato aquoso das folhas de *B. forficata*, nas doses de 500 mg/kg, 600 mg/kg e 1000 mg/kg, durante 21 dias e constataram que esse extrato não foi tóxico, nas doses testadas, mas não modificou a hiperglicemia materna. Salgueiro et al. (2016), em sua pesquisa com camundongos diabéticos, tratados diariamente, por 21 dias, com a infusão das folhas de *B. forficata* subsp. *pruirosa*, na concentração de 313 mg/kg/peso, também não observaram uma redução da glicemia desses animais, sugerindo que a kaempferitrina, principal substância responsável pela ação hipoglicêmica, pode ter sido perdida durante o preparo da infusão ou a ausência da mesma nesta subespécie de *Bauhinia*. Esses resultados controversos podem ainda ser justificados por diferenças no modelo experimental utilizado, tipos e métodos de preparo de extratos e/ou frações, diferentes doses e tempo de administração, além da constituição genética da espécie, fatores ambientais e variações estacionais (MARTÍNEZMARTÍNEZ et al., 2018).

Os efeitos dos ESIN e ESDC na tolerância à glicose em camundongos diabéticos induzidos por STZ foram mostrados nas Figuras 4 e 5. A suplementação oral de glicose resultou no aumento gradual do nível de glicose no sangue em 30 minutos de todos os grupos e permaneceu em um nível alto nos próximos 90 minutos, sendo que os animais do DSIN2 (168 mg/dL), já apresentou uma diminuição na glicemia com diferença estatística do grupo diabético sem tratamento (DA) (550 mg/dL), sendo os valores de glicemia semelhantes ao grupo NA (149,33 mg/dL), permanecendo assim até o final do experimento (T120), cujos níveis de glicose reduziram um pouco mais para ambos (DSIN2=157,0 mg/dL e NA=136,5 mg/dL), podendo-se sugerir que a glicose estava sendo metabolizada pela insulina, reduzindo a glicemia, nesses grupos.

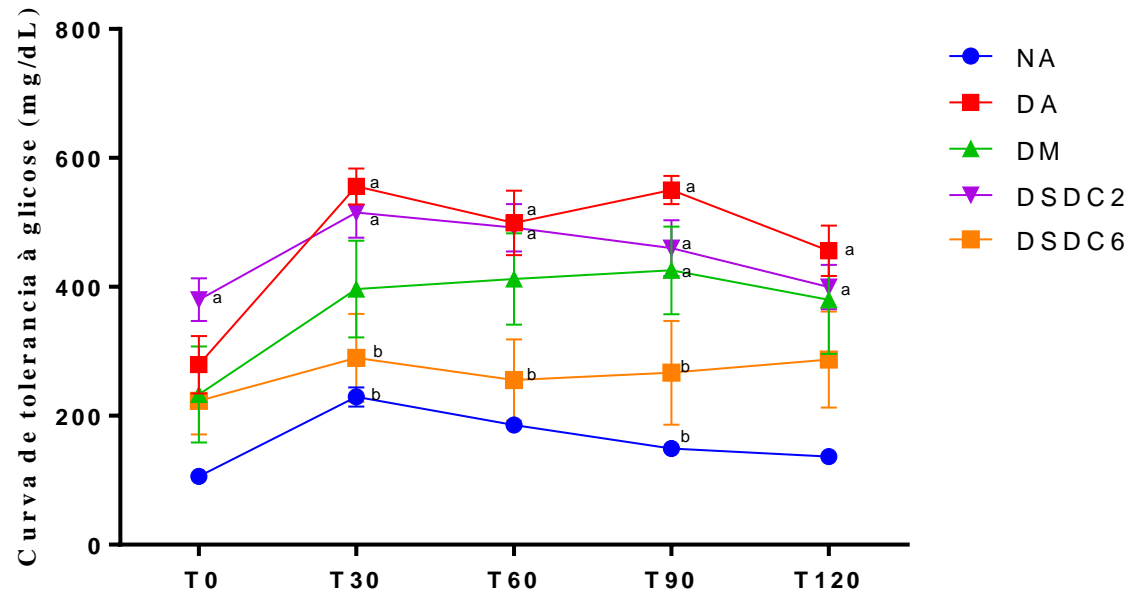
Referindo aos grupos de animais tratados com o ESDC, o grupo que apresentou melhor resposta glicêmica foi o DSDC6, com glicemia de 287,3 mg/dL, quando comparado ao DSDC2 (399,5 mg/dL). Fato confirmado no T28, na glicemia de jejum, que houve uma redução na glicose sanguínea dos animais tratados com ESIN e ESDC, nas doses de 200 e 600 mg/kg/dia, com exceção do DSDC2.

Figura 4 - Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* na tolerância oral da glicose de camundongos diabéticos.



Os valores representam as médias \pm E.P.M. NA = Controle negativo. DA = Diabéticos sem tratamento. DM = Diabéticos tratados com metformina na dose de 600 mg/Kg. DSIN2 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 200 mg/Kg. DSIN6 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 600 mg/Kg. DSIN2 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 200 mg/Kg. DSIN6 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 600 mg/Kg. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). ^a $p < 0,05$ comparado ao NA, ^b $p < 0,05$ comparado ao DA. Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 5 - Efeito dos extratos secos da decocção (ESDC) de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* na tolerância oral da glicose de camundongos diabéticos.



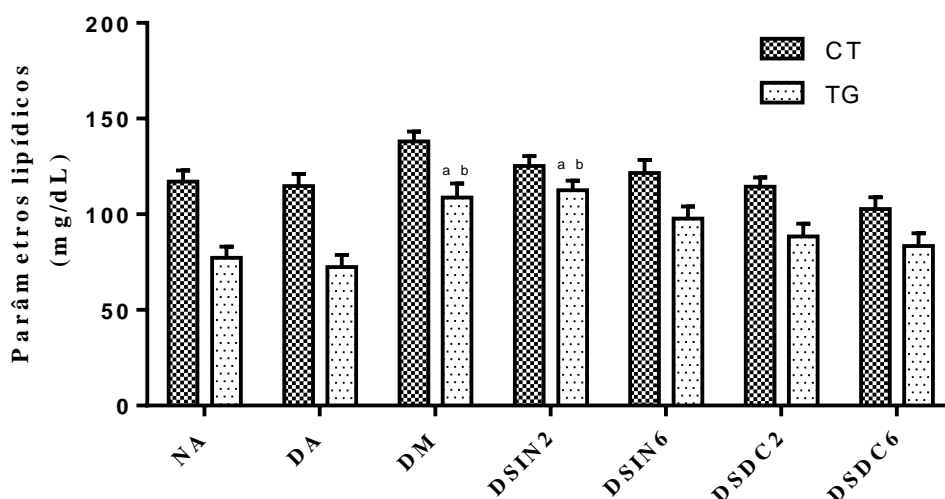
Os valores representam as médias \pm E.P.M. Os valores representam as médias \pm E.P.M. NA = Controle negativo. DA = Diabéticos sem tratamento. DM = Diabéticos tratados com metformina na dose de 600 mg/Kg. DSIN2 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 200 mg/Kg. DSIN6 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 600 mg/Kg. DSDC2 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 200 mg/Kg. DSDC6 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 600 mg/Kg. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). ^a $p < 0,05$ comparado ao NA ^b $p < 0,05$ comparado ao DA.

Fonte: Autoria própria (2019).

3.7 Efeitos dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) nos parâmetros lipídicos, nas enzimas hepáticas e na função renal

Os níveis de colesterol total (CT) de todos os grupos foram semelhantes estatisticamente em relação ao NA (117 mg/dL \pm 5,95). Os níveis de triglicerídeos (TG) dos grupos DA (72,40 mg/dL \pm 6,33), DSIN6 (97,67 mg/dL \pm 6,48), DSDC2 (88,40 mg/dL \pm 6,75) e DSDC6 (83,40 mg/dL \pm 6,62) apresentaram níveis semelhantes ao NA, não sendo observado diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados, apenas os grupos DM e DSIN2 apresentaram níveis elevados, quando comparados ao NA (Figura 6).

Figura 6 - Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* nos parâmetros lipídicos de camundongos diabéticos.



Os valores representam as médias \pm E.P.M. Os valores representam as médias \pm E.P.M. NA = Controle negativo. DA = Diabéticos sem tratamento. DM = Diabéticos tratados com metformina na dose de 600 mg/Kg. DSIN2 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 200 mg/Kg. DSIN6 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 600 mg/Kg. DSDC2 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 200 mg/Kg. DSDC6 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 600 mg/Kg. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). ^a $p < 0,05$ comparado ao NA, ^b $p < 0,05$ comparado ao DA. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos níveis de colesterol.

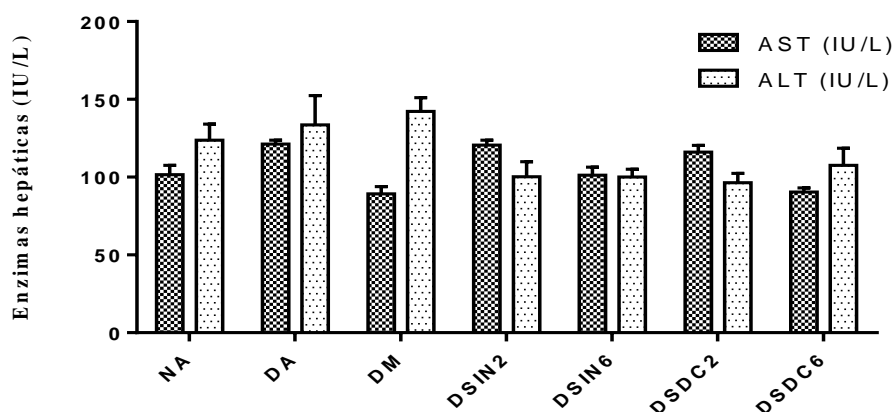
Fonte: Autoria própria (2019).

Corroborando com este estudo, Damasceno et al. (2004), Pepato et al. (2010) e Pepato et al. (2002), com relação às atividades hipocolesterolemiantes e antilipidêmicas dessa espécie, os resultados não têm sido significativos. Contudo, De Sousa Lino et al. (2004) verificaram uma redução de parâmetros lipídicos em ratos tratados com extrato etanólico,

aquoso e hexânico das folhas de *B. forficata* Link, nas doses de 200 e 400 mg/kg/dia, durante sete dias.

A Figura 7 mostra os efeitos dos ESIN e ESDC nas enzimas hepáticas em camundongos diabéticos. As atividades das enzimas hepáticas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), nos grupos tratados com os extratos, não apresentaram alterações estatisticamente significativas, ao se comparar com os camundongos não diabéticos (NA), mostrando a ausência de sinais de toxicidade hepática. Em contrapartida, Salgueiro et al. (2016), em estudo com ratos diabéticos, constataram um aumento significativo na AST, quando comparado ao grupo controle negativo, porém os níveis de ALT não foram alterados com o tratamento da infusão de *B. forficata*.

Figura 7 - Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* nas enzimas hepáticas de camundongos diabéticos.



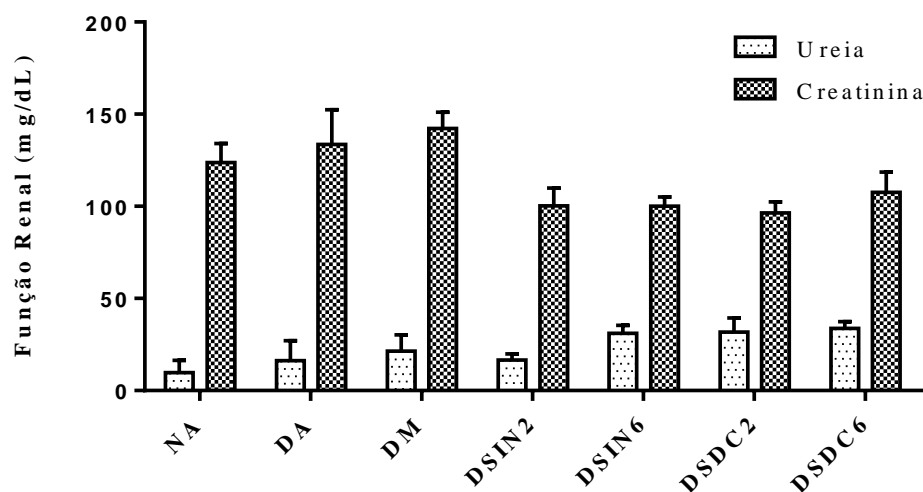
Os valores representam as médias \pm E.P.M. NA = Controle negativo. DA = Diabéticos sem tratamento. DM = Diabéticos tratados com metformina na dose de 600 mg/Kg. DSIN2 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 200 mg/Kg. DSIN6 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 600 mg/Kg. DSDC2 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 200 mg/Kg. DSDC6 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 600 mg/Kg. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Autoria própria (2019).

Os níveis de ureia e creatinina não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos tratados, após 28 dias de administração dos extratos ESIN e ESDC, em relação ao grupo controle negativo (NA), mostrando que a função renal desses animais não teve nenhuma alteração ao longo do tratamento (Figura 8). No entanto, Mollica et al. (2017), em seu estudo com a infusão das folhas da espécie vegetal *Juglans regia* L., constataram um aumento dos níveis de ureia e creatinina, em ratos tratados na dose 25 mg/kg e uma redução

na dose de 50 mg/kg, em comparação com o grupo controle negativo.

Figura 8 - Efeito dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* na função renal de camundongos diabéticos.



Os valores representam as médias \pm E.P.M. Os valores representam as médias \pm E.P.M. NA = Controle negativo. DA = Diabéticos sem tratamento. DM = Diabéticos tratados com metformina na dose de 600 mg/Kg. DSIN2 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 200 mg/Kg. DSIN6 = Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 600 mg/Kg. DSDC2 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 200 mg/Kg. DSDC6 = Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 600 mg/Kg. As diferenças nos grupos experimentais foram determinadas por ANOVA, one-way, seguido de pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Aatoria própria (2019).

3.8 Efeitos dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) na morfologia do fígado, rins e pâncreas

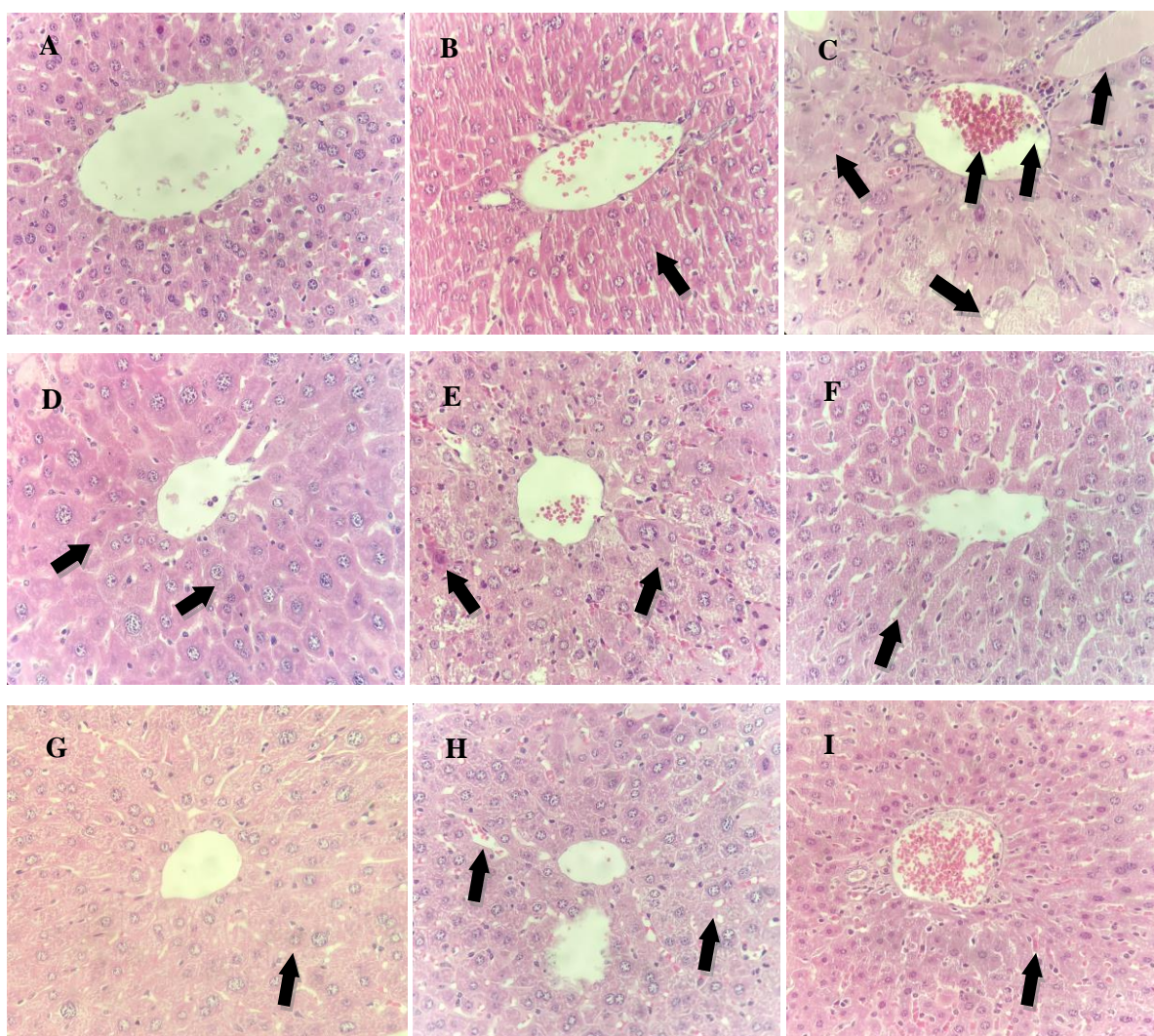
Os efeitos dos ESIN e ESDC na morfologia do fígado, rins e pâncreas de camundongos diabéticos foram analisados por meio de exames histopatológicos e são mostrados nas Figuras 9, 10 e 11.

A histopatologia do fígado do grupo controle negativo (NA), apresentou uma arquitetura hepática controle negativo, com morfologia controle negativo dos hepatócitos e sinusóides hepáticos organizados ordenadamente (Figura 9 A). Entretanto, o grupo DA apresentou alterações hepatocelulares, com diminuição entre os sinusóides (Figura 9 B).

O tratamento com a metformina (DM) ocasionou perda da arquitetura controle negativo dos sinusóides, bem como de outras células, incluindo os hepatócitos, além de ter sido verificado edema nesse tecido e gotículas de gordura, o que não foi observado nos grupos

NA e DA (Figura 9 C).

Figura 9 - Análise histopatológica dos efeitos dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) no fígado de camundongos *Swiss*.



A: NA (Controle negativo). B: DA (Diabéticos sem tratamento). C: DM (Diabéticos tratados com metformina na dose de 600 mg/Kg). D: DSIN2 (Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 200 mg/Kg). E: DSIN6 (Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 600 mg/Kg). F: ESIN2 (Normais tratados com extrato seco da infusão na dose de 2000mg/Kg). G: DSDC2 (Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 200 mg/Kg). H: DSDC6 (Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 600 mg/Kg) I: ESDC2 (Normais tratados com extrato seco da decocção na dose de 2000 mg/Kg). Fotomicrografias representativas de secções coradas com hematoxilina e eosina (H & E) X40; Barra de Escala = 10 μ m.

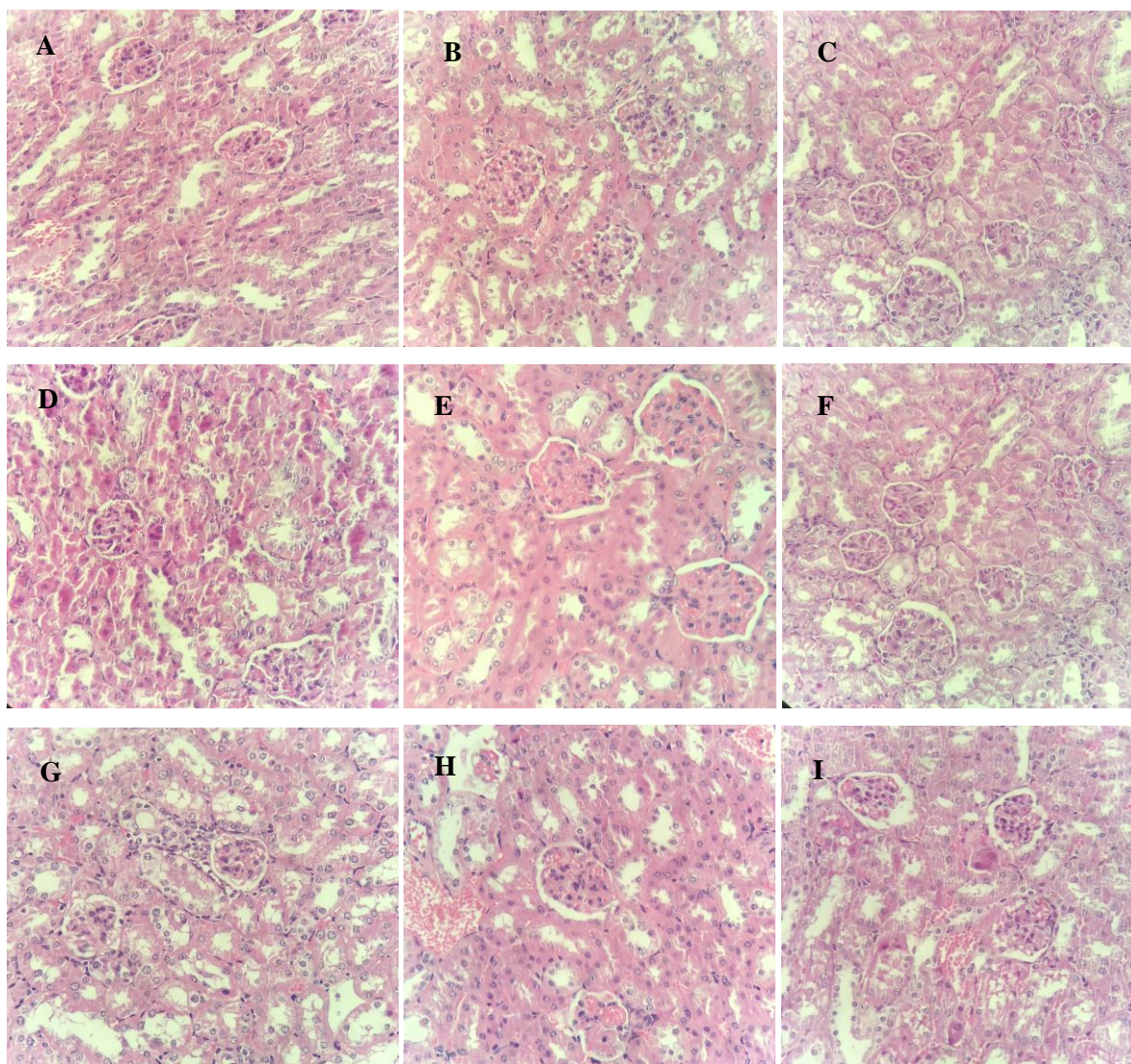
Fonte: A autoria própria (2019).

Nos grupos DSIN2, DSIN6 e ESIN2 observaram-se algumas células de Kupffer em torno da veia central, cujas características estão de acordo com a histologia controle negativo, porém houve uma perda leve a moderada da arquitetura do fígado com alguns hepatócitos não dispostos radialmente, em relação ao NA (Figuras 9 D, E e F). Nos grupos DSDC2, DSDC6 e ESDC2, além do que foi observado nos demais grupos tratados, verificou-se gotículas de

gordura e um aumento da vascularização e da presença de eritrócitos no espaço de Disse (Figuras 9 G, H e I). Vale ressaltar que as alterações observadas nas análises histopatológicas não alteraram as enzimas hepáticas investigadas.

A análise histopatológica dos rins dos camundongos diabéticos mostrou córtex renal com corpúsculos renais e seus glomérulos, além de túbulos proximais e distais, com revestimento epitelial intacto da membrana basal glomerular e epitélio tubular, além de vasos sanguíneos, semelhantes ao grupo controle negativo (NA), não apresentando alterações nesses órgãos, em nenhum dos grupos estudados (Figura 10), em consonância com os resultados obtidos nos níveis de ureia e creatinina, que também não apresentaram alterações em relação ao grupo controle negativo, confirmando que não houve alteração da função renal desses animais.

Figura 10 - Análise histopatológica dos efeitos dos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) nos rins de camundongos *Swiss*.



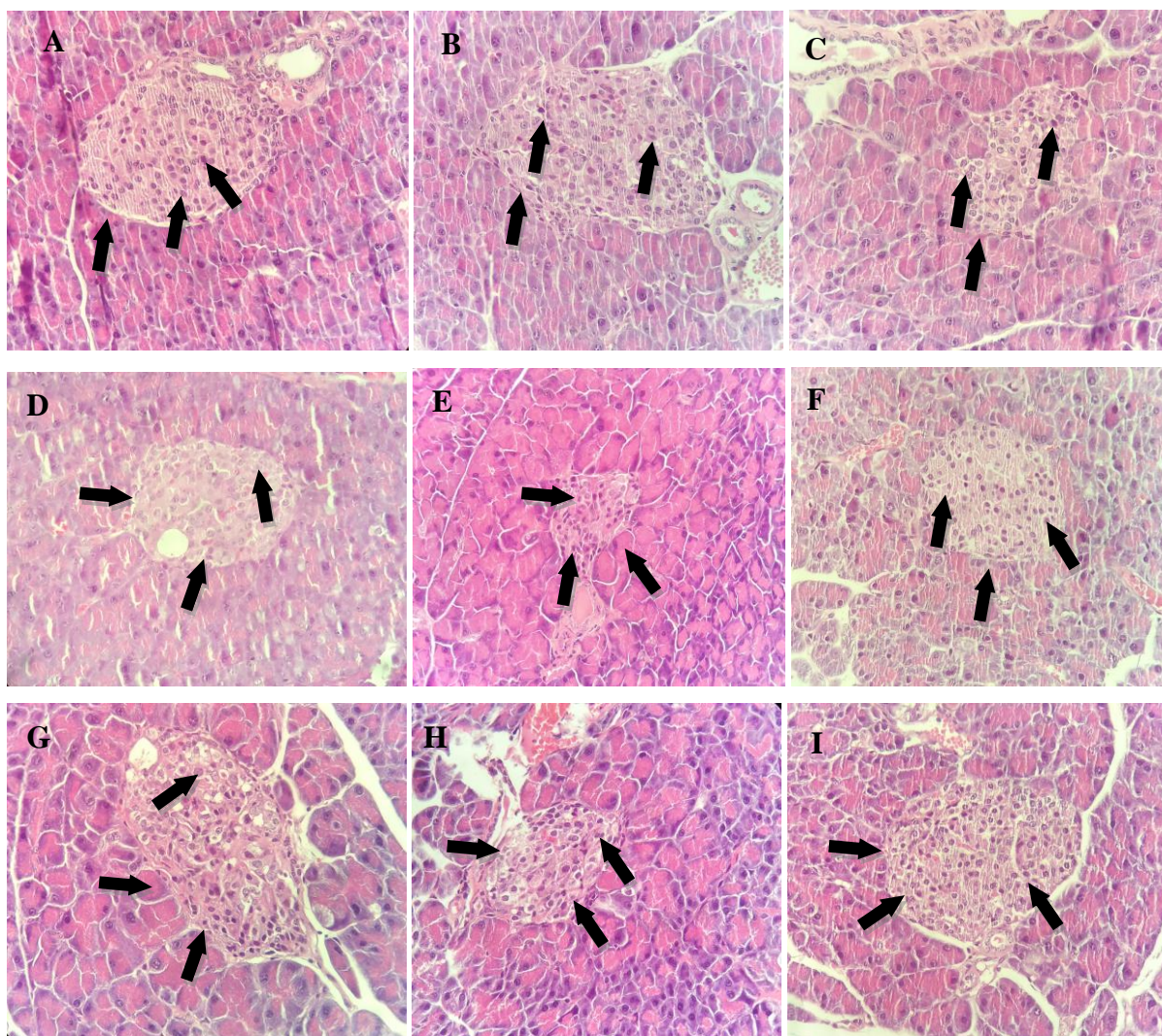
A: NA (Controle negativo). B: DA (Diabéticos sem tratamento). C: DM (Diabéticos tratados com metformina na dose de 600 mg/Kg). D: DSIN2 (Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 200 mg/Kg). E: DSIN6 (Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 600 mg/Kg). F: ESIN2 (Normais tratados com extrato seco da infusão na dose de 2000 mg/Kg). G: DSDC2 (Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 200 mg/Kg). H: DSDC6 (Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 600 mg/Kg). I: ESDC2 (Normais tratados com extrato seco da decocção na dose de 2000 mg/Kg). Fotomicrografias representativas de secções coradas com hematoxilina e eosina (H & E) X40; Barra de Escala = 10 μ m.

Fonte: A autoria própria (2019).

O estudo histopatológico do pâncreas de camundongos diabéticos mostrou que a indução do diabetes pela STZ causou alterações necróticas e cariólise, com uma diminuição das ilhotas de Langerhans e das células β pancreáticas, observadas no grupo diabético sem tratamento (DA). O grupo tratado com metformina (DM), apresentou um pouco mais de células β do que o grupo DA, porém foi inferior ao grupo NA. Nos grupos DSIN2, DSIN6 e ESIN2, observou-se uma recuperação total das células β pancreáticas, bem como do

parênquima pancreático. Os grupos DSDC2, DSDC6 e ESDC2, mostraram-se semelhantes aos demais grupos tratados com ESIN, entretanto o grupo ESDC2, além do aumento das células β , verificou-se uma leve diminuição das células α , em relação ao NA (Figura 11).

Figura 11 - Análise histopatológica dos efeitos extratos secos da infusão (ESIN) e da decocção (ESDC) no pâncreas de camundongos Swiss.



A: NA (Controle negativo). B: DA (Diabéticos sem tratamento). C: DM (Diabéticos tratados com metformina na dose de 600 mg/Kg). D: DSIN2 (Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 200 mg/Kg). E: DSIN6 (Diabéticos tratados com extrato seco da infusão na dose de 600 mg/Kg). F: ESIN2 (Normais tratados com extrato seco da infusão na dose de 2000mg/Kg). G: DSDC2 (Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 200 mg/Kg). H: DSDC6 (Diabéticos tratados com extrato seco da decocção na dose de 600 mg/Kg) I: ESDC2 (Normais tratados com extrato seco da decocção na dose de 2000 mg/Kg). Fotomicrografias representativas de secções coradas com hematoxilina e eosina (H & E) X40; Barra de Escala = 10 μ m.

Fonte: Autoria própria (2019).

Como o DM2 é um distúrbio que surge do mau funcionamento do pâncreas endócrino, no qual houve uma perda ou disfunção progressiva de células β pancreáticas produtoras de

insulina, que pode ser devido à resistência à insulina e à glicolipototoxicidade, análises histopatológicas desse órgão são importantes, conforme já constatado por Bakhti, Böttcher, Lickert (2018) e Defronzo et al. (2015). Essa teoria de que a principal causa do DM2 está relacionada com a secreção e ação da insulina tem sido confirmada recentemente por Chen et al. (2019), embora outros fatores também são relevantes, como a ativação de vias de resposta ao estresse intracelular e redes de comunicação inter-órgãos mediadas por moléculas inflamatórias (citocinas) e hormônios peptídicos. Como ainda não há tratamento que possa parar ou reverter a progressão dessa doença, os resultados desse estudo são promissores, pois como foram observados, os extratos ESIN e ESDC recuperaram as células β pancreáticas, sendo possíveis alternativas para o tratamento do DM2.

Alves et al. (2019) afirmaram que pesquisas sobre princípios ativos naturais tem crescido nos últimos anos, para a busca de novos fármacos com maior atividade terapêutica, menor toxicidade, melhor biocompatibilidade e maior acessibilidade à população que, devido a aspectos culturais, aceitam bem a fitoterapia, tem tido boas perspectivas no mercado de produtos terapêuticos feitos a partir de compostos bioativos presentes nas plantas medicinais. Portanto, estudos como este são relevantes para o desenvolvimento de medicamentos seguros e de recursos naturais que sejam eficazes no tratamento do diabetes mellitus.

4 Conclusão

As análises cromatográficas mostraram que a técnica de microencapsulação preservou os polifenóis, flavonoides e seus derivados O-glicosilados nos extratos secos da infusão e da decocção, além de capacidade antioxidantes significativa, podendo ser a responsável pelo efeito benéfico na regeneração das células β pancreáticas, com redução dos níveis de glicose sanguínea em camundongos diabéticos, com efeito superior ao da metformina. Durante os estudos de toxicidade aguda, os extratos apresentaram efeitos genotóxicos na medula óssea e no fígado. Entretanto, esses efeitos não foram observados no pâncreas e no sangue periférico, os danos foram reparados após 14 dias de tratamento. Os extratos microencapsulados promoveram uma regeneração das células β pancreáticas, reduzindo os níveis de glicose sanguínea em camundongos diabéticos, com efeito benéfico superior ao da metformina, mostrando potencial terapêutico para aplicações em formulações farmacêuticas com atividade antidiabética.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu qualquer subvenção específica de financiamento de agências de fomento dos setores público, privados ou sem fins lucrativos.

Referências

- AHMED, A. S.; ELGORASHI, E. E.; MOODLEY, N.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African *Bauhinia* species used traditionally to treat diarrhoea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 3, p. 826-839, 2012.
- AJUWON, O.; AYELESO, A.; ADEFOLAJU, G. The Potential of South African Herbal Tisanes, Rooibos and Honeybush in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3207, 2018.
- ALKHALIDY, H.; MOORE, W.; WANG, Y.; LUO, J.; MCMILLAN, R.; ZHEN, W.; LIU, D. The flavonoid kaempferol ameliorates streptozotocin-induced diabetes by suppressing hepatic glucose production. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2338, 2018.
- ALVES, E. P.; FREIRES, I. A.; ROSALEN, P. L.; RUIZ, A. L.; GRANVILLE-GARCIA, A. F.; GODOY, G. P.; PEREIRA, J. V. Antimicrobial and Antiproliferative Activity of *Bauhinia forficata* Link and *Cnidioscolus quercifolius* extracts commonly Used in Folk Medicine. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 18, n. 8, p. 635-640, 2017.
- ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 655-665, 2002.
- ASHAFA, A. O. T., YAKUBU, M. T., GRIERSON D. S., AFOLAYAN A. J. Effects of aqueous extract from the leaves of *Chrysocoma ciliata* L. on some biochemical parameters of Wistar rats. **African Journal of Biotechnology**, vol. 8, p. 1425 -1430, 2009.
- ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress-a concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.
- ARPAGAUS, C.; COLLENBERG, A.; RÜTTI, D.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. **International journal of pharmaceutics**, v. 546, p. 194–214, 2018.
- BAKHTI, M.; BÖTTCHER, A.; LICKERT, H. Modelling the endocrine pancreas in health

and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, p. 1, 2018.

BJØRKLUND, G.; CHIRUMBOLO, S. Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. **Nutrition**, v. 33, p. 311-321, 2017.

BRITO, Alba Souza. Manual de ensaios toxicológicos in vivo. In: **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Ed. UNICAMP, Campinas, 1994. 122p.

CAZAROLLI, L. H.; FOLADOR, P.; MORESCO, H. H.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2''-O- α -l-rhamnopyranosyl)- β -l-fucopyranoside on ¹⁴C-glucose uptake. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, n. 2-3, p. 407-412, 2009.

CAZAROLLI, L. H.; PEREIRA, D. F.; KAPPEL, V. D.; FOLADOR, P.; FIGUEIREDO, M. D. S. R. B.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Insulin signaling: a potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 712, n. 1-3, p. 1-7, 2013.

CECHINEL-ZANCHETT, C. C.; DE ANDRADE, S. F.; CECHINEL-FILHO, V. Ethnopharmacological, Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of *Bauhinia forficata*: A Mini-Review Covering the Last Five Years. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 7, p. 911-916, 2018.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441, 2007.

CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Diabetes type 2. **The Lancet**, v. 389, n. 10085, p. 2239-2251, 2017.

CHEN, L.; GNANARAJ, C.; ARULSELVAN, P.; EL-SEEDI, H.; TENG, H. A review on advanced microencapsulation technology to enhance bioavailability of phenolic compounds: Based on its activity in the treatment of Type 2 Diabetes. **Trends in Food Science & Technology**, 2019. In Press.

COBBLE, M. E.; PETERS, A. L. Clinical practice in type 2 diabetes: after metformin and lifestyle, then what?. **Journal of Family Practice**, v. 58, n. 11, p. S7-S7, 2009.

CUNHA, L.C.; AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, M.C.; FREITAS, H.O.G.; SENA, A.A.S.; LINO JUNIOR, R.S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 2, p. 403-11, 2009.

CUNHA, L.C.; MELO, D F.A; PEREIRA, M.E.; MELO, D.S.; PARENTE, L.L.; SILVA, M.A.C.; CONCEIÇÃO, E.C.; GONZAGA, L.Q.S. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (*Tiliaceae*), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 357-362, 2013.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1-15, 2004.

DA CUNHA, A. M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A. G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M. W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine**, v. 17, n. 1, p. 37-41, 2010.

DA SILVA, K. L.; FILHO, V. C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. D. M. P.; AGUILAR, R.; RUDGE, M. C. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. **Phytomedicine**, v. 11, n. 2/3, p. 196, 2004.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 48-54, 2004.

DEFRONZO, R.A.; FERRANNINI, E.; GROOP, L.; HENRIQUE, R.R.; HERMAN, W.H.; HOLST, J.J.; SIMONSON, D.C. Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15019, 2015.

DE PONTES, M. A. N.; DE LIMA, D. S.; DE OLIVEIRA, H. M. B. F.; DE OLIVEIRA FILHO, A. A. *Bauhinia forficata* L. e sua ação hipoglicemiante. **Archives of Health Investigation**, v. 6, n. 11, 2017.

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

DE SOUZA, B.V.C.; MOREIRA-ARAÚJO, R.S.D.R.; SILVA, O.A.; FAUSTINO, L.C.; GONÇALVES, M.F.B.; DOS SANTOS, M.L; NUNES, L.C.C. *Bauhinia forficata* in the treatment of diabetes mellitus: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 28, n. 2, p. 129-138, 2018.

DOS SANTOS, F. J. B.; MOURA, D. J.; PÉRES, V. F.; DE MOURA SPEROTTO, A. R.; CARAMÃO, E. B.; CAVALCANTE, A. A. D. C. M.; SAFFI, J. Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platypetala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. **Journal of ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 474-482, 2012.

DÜSMAN, E.; ALMEIDA, I. V. D.; COELHO, A. C.; BALBI, T. J.; DÜSMAN TONIN, L. T.; VICENTINI, V. E. P. Antimutagenic effect of medicinal plants *Achillea millefolium* and *Bauhinia forficata* in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

ECKER, A.; NASCIMENTO GONZAGA, T.K.S.; SEEGER, R.L.; SANTOS, M.M.; LORETO, J.S.; BOLÍGONO, A.A.; BARBOSA, N.V. High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: protective role of *Syzygium cumini* and *Bauhinia forficata*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 605-616, 2017.

FARAG, M. A.; SAKNA, S. T.; EL-FIKY, N. M.; SHABANA, M. M.; WESSJOHANN, L. A. Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from

Egypt using UCLAE–PDA–qTOF-MS and chemometrics. **Phytochemistry**, v. 119, p. 41-50, 2015.

FARIAS, L. S.; MENDEZ, A. SL. LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp. *pruinosa*. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 483-486, 2014.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VINHOLES, J.; SILVA, S.T.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 894-904, 2012.

FERREIRA, F. A. G.; SILVA, F. C.; CARVALHO, C. M.; COSTA, J. C.; FERREIRA, J. M. R. Perfil hematológico e bioquímico plasmático de camundongos após ingestão da planta *Arrabidaea chica*. **Scientia Plena**, v. 12, n. 9, 2016.

FILHO, Valdir Cechinel. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 23, n. 10, p. 1347-1354, 2009.

FRANCO, R. R.; JUSTINO, A. B.; SILVA, H. C. G.; PEIXOTO, L. G.; ESPINDOLA, F. S. Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 215, p. 140-146, 2018.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. 1.ed. Porto Alegre: **UFRGS**, 2002, 270p.

GRARUP, N.; SANDHOLT, C. H.; HANSEN, T.; PEDERSEN, O. Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: from genome-wide association studies to rare variants and beyond. **Diabetologia**, v. 57, n. 8, p. 1528-1541, 2014.

HANHINEVA, K.; TÖRRÖNEN, R.; BONDIA-PONS, I.; PEKKINEN, J.; KOLEHMAINEN, M.; MYKKÄNEN, H.; POUTANEN, K. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1365-1402, 2010.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-biological interactions**, v. 139, n. 1, p. 1-21, 2002.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**, 8th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2017.

JORGE, A. P.; HORST, H.; DE SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, n. 2-3, p. 89-96, 2004.

KIM, D. O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. **Journal of Agricultural Food and**

Chemistry, 50, 3713-3717, 2002.

KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biological Research**, v. 41, n. 2, p. 165-171, 2008.

KANGRALKAR, V. A.; PATIL, S. D.; BANDIVADEKAR, R. M. Oxidative stress and diabetes: a review. **International Journal of Pharmaceutical Applications**, v. 1, n. 1, p. 38-45, 2010.

LI, P. B.; LIN, W. L.; WANG, Y. G.; PENG, W.; CAI, X. Y.; SU, W. W. Antidiabetic activities of oligosaccharides of *Ophiopogon japonicus* in experimental type 2 diabetic rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 749-755, 2012.

LU, L.; FAN, Y.; YAO, W.; XIE, W.; GUO, J.; YAN, Y.; YANG, F.; XU, L. Safety assessment of the fermented *Phylloporia ribis* (*Lonicera japonica* Thunb.) mycelia by oral acute toxicity study in mice and 90-day feeding study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 18-24, 2014.

MARTÍNEZMARTÍNEZ, B. B.; PEREIRA, A. C. C.; MUZZETTI, J. H.; DE PAIVA TELLES, F.; MUNDIM, F. G. L.; TEIXEIRA, M. A. *Bauhinia forficata* and glucocorticoid-induced insulin resistance. **International Journal of Scientific Research**, v. 6, n. 10, 2018.

MENEZES, F. D. S., MINTO, A. B. M., RUELA, H. S., KUSTER, R. M., SHERIDAN, H., FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 8-13, 2007.

MOLLICA, A.; ZENGİN, G.; LOCATELLI, M.; STEFANUCCI, A.; MACEDONIO, G.; BELLAGAMBA, G.; NOVELLINO, E. An assessment of the nutraceutical potential of *Juglans regia* L. leaf powder in diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 554-564, 2017.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. The pharmacological evaluation of natura products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 127-147, 1983.

MORRIS, A. P.; VOIGHT, B. F.; TESLOVICH, T. M.; FERREIRA, T.; SEGRE, A. V.; STEINTHORS DOTIR, V.; PROKOPENKO, I. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9, p. 981, 2012.

MOUSSA, S. A. Oxidative stress in diabetes mellitus. **Romanian Journal of Biophysics**, v. 18, n. 3, p. 225-236, 2008.

OECD, **Test Guideline TG-423**. 2002. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/testno-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en> Acesso em 05 janeiro de 2019.

OKONKWO, C. O. J.; EHILEBOH, A. D.; NWOBODO, E.; DIKE, C. C. The effects of acute gasoline vapour inhalation on some haematological indices of albino *Wistar* rats. **Journal of Acute Disease**, v. 5, n. 2, p. 123–125, 2016.

PAN, Y.; WANG, C.; CHEN, Z.; LI, W.; YUAN, G.; CHEN, H. Physicochemical properties and antidiabetic effects of a polysaccharide from corn silk in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 370-378, 2017.

PEREIRA, A. C. S.; RIBEIRO, G. E.; SOUZA, L. C. R.; RUFINO, L. R. A.; CABRAL, I. S. R.; BORIOLLO, M. F. G.; FIORINI, J. E. Biologic activity of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia forficata* Link on *Herpetomonas samuelpessoai* (Galvão.) Roitman. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 16, n. 3, p. 585-592, 2014.

PEPATO, M. T.; KELLER, E. H.; BAVIERA, A. M.; KETTELHUT, I. C.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 191-197, 2002.

PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 1, p. 7, 2004.

PEPATO, M. T.; CONCEIÇÃO, C. Q.; GUTIERRES, V. O.; VENDRAMINI, R. C.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P.; BRUNETTI, I. L. Evaluation of the spouted bed dried leaf extract of *Bauhinia forficata* for the treatment of experimental diabetes in rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 42, p. 7157-7164, 2010.

PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA JR. A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. D.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonoids glycosides from leaves and flowers of *Bauhinia forficata* (*Leguminosae*). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3273-79, 2003.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.

RIBEIRO, A.F.C.; TELLES, T.C.; FERRAZ, V.P.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; CASSALI, G.D.; CARVALHO, A.T.; MELO, M.M. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.2, p.364-373, 2012.

ROLIM, L.A.R.; NUNES, L.C.C; LYRA, A.M.; ALVES, M.A.; BARROS, N.V.A.; BATISTA, P.N.; ROLIM NETO, P.J.; MOREIRA-ARAÚJO, R.S.R.; SILVA, R.M.F.; OLIVEIRA, T.C.O. **Composição farmacêutica efervescente e uso de extrato etanólico de *Bauhinia forficata***. BR1020130241504 (2013).

SALATINO, A.; BLATT, C. T.; SANTOS, D. Y. D.; VAZ, A. M. Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. **Brazilian Journal of Botany**, v. 22, n. 1, p. 17-20, 1999.

SALGUEIRO, A. C. F., FOLMER, V., DA SILVA, M. P., MENDEZ, A. S. L., ZEMOLIN, A. P. P., POSSER, T., PUNTEL, G. O. Effects of *Bauhinia forficata* tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

SALIU, J.A.; ADEMILUYI, A.O.; AKINYEMI, A.J.; OBOH, G. Propriedades antidiabetes e anti-hipertensoras in vitro de extratos fenólicos de folhas amargas (*Vernonia amygdalina* Del.). **Journal of Food Biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 569-576, 2012.

SANTOS, M.; FORTUNATO, R. H.; SPOTORNO, V. G. Analysis of flavonoid glycosides with potential medicinal properties on *Bauhinia uruguayensis* and *Bauhinia forficata* subspecies *pruinosa*. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2018.

SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2376-2383, 2008.

SILVA, A. P. S. C. L.; OLIVEIRA, G. A. L.; SOUSA, A. M. L.; MEDEIROS, S. C.; DAVID, J. M.; COSTA JUNIOR, J. S.; LOPES, L. S.; FREITAS, R. M. Pre-clinical toxicology of garcinielliptone FC, a tautomeric pair of polyprenylated benzophenone, isolated from *Platonia insignis* Mart seeds. *Phytomedicine (Stuttgart)*, v. 23, p. 477-482, 2016

SILVA, K. D.; WEBER BIAVATTI, M.; NAIR LEITE, S.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (*Leguminosae*). **Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences**, v. 55, n. 5-6, p. 478-480, 2000.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free radical biology and medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 375-383, 2000.

SPEIT, G.; ROTHFUSS, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: **DNA Repair Protocols**. Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p. 79-90.

SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R.M.B. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(a)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. **Journal of natural products**. v. 67, p. 829–832, 2004.

SOUSA, R.V.R.B.; GUEDES, M.I.F.; MARQUES, M.M.M.; VIANA, D.A.; SILVA, I.N.G.; RODRIGUES, P.A.S.; VIEIRA, I.G.P. Hypoglycemic effect of new pectin isolated from *Passiflora glandulosa* cav in alloxan induced diabetic mice. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1571-1586, 2015.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punnus domestica*. I- quantitative analysis of phenolics constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, p. 63-68, 1959.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V.A. A 90-day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in SpragueDawley rats. **Toxicology**, 179: 183-196, 2002.

TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES; T. L. S.; SOARES, G. L. G.; RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155-163, 2012.

TZENG, Y.M., CHEN, K., RAO, Y.K., LEE, M.J. Kaempferitrin activates the insulin signaling pathway and stimulates secretion of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. **Europe Journal Pharmacology**. v. 607, p. 27–34, 2009.

VARELA-BARCA, F.; AGNEZ-LIMA, L. F.; DE MEDEIROS, S. R. B. Base excision repair pathway is involved in the repair of lesions generated by flavonoid-enriched fractions of pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) stem bark. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 48, n. 8, p. 672-681, 2007.

VINAYAGAM, Ramachandran; XU, Baojun. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 60, 2015.

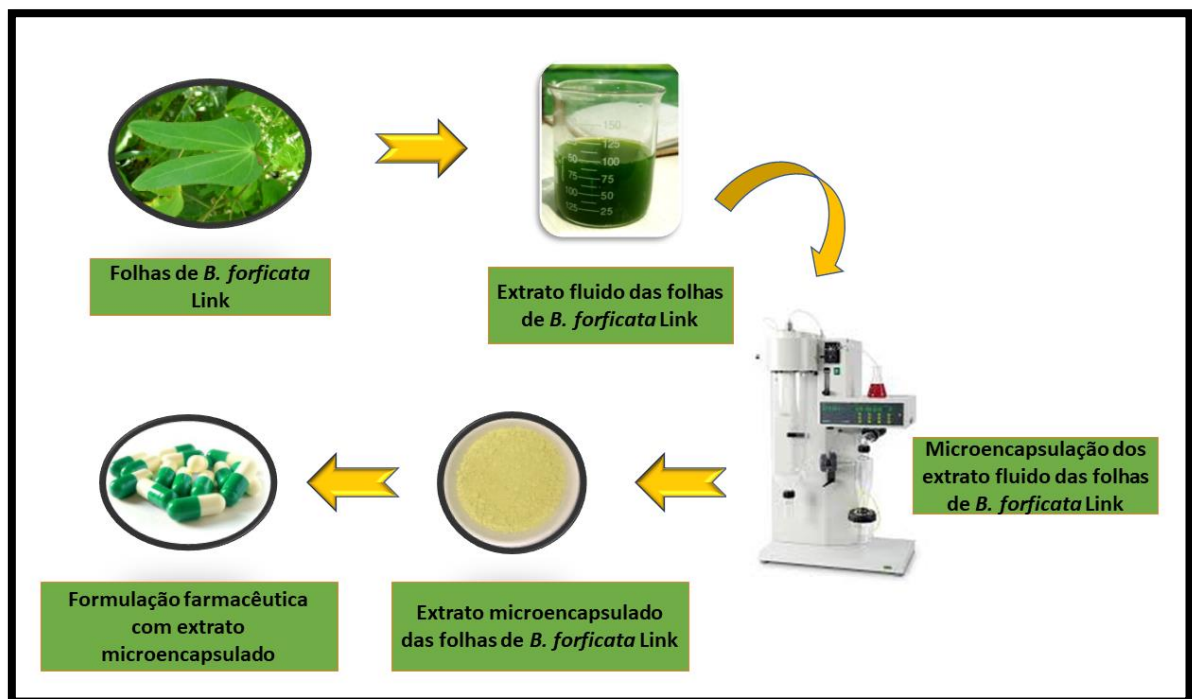
VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; RUDGE, M. V. C.; PADOVANI, C. R.; CALDERON, I. D. M. P. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 131-137, 2008.

WALTON, Emma Louise. Oxidative stress and diabetes: Glucose response in the cROSSfire. 2017.

WANG, C.; CHEN, Z.; PAN, Y.; GAO, X.; CHEN, H. Anti-diabetic effects of *Inonotus obliquus* polysaccharides-chromium (III) complex in type 2 diabetic mice and its sub-acute toxicity evaluation in controle negativo mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 498-509, 2017.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, 64, 555-559, 1999.

ZHU, D.; ZHANG, X.; NIU, Y.; DIAO, Z.; REN, B.; LI, X.; LIU, X. Cichoric acid improved hyperglycaemia and restored muscle injury via activating antioxidant response in MLD-STZ-induced diabetic mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 138-149, 2017.



Patente

- Patente submetida ao INPI (BR 10 2019 002952-8)

“Formulação contendo extrato microencapsulado de *Bauhinia forficata* link subsp. *forficata* com atividade antioxidante e hipoglicemiante para o tratamento do diabetes mellitus”

RESUMO

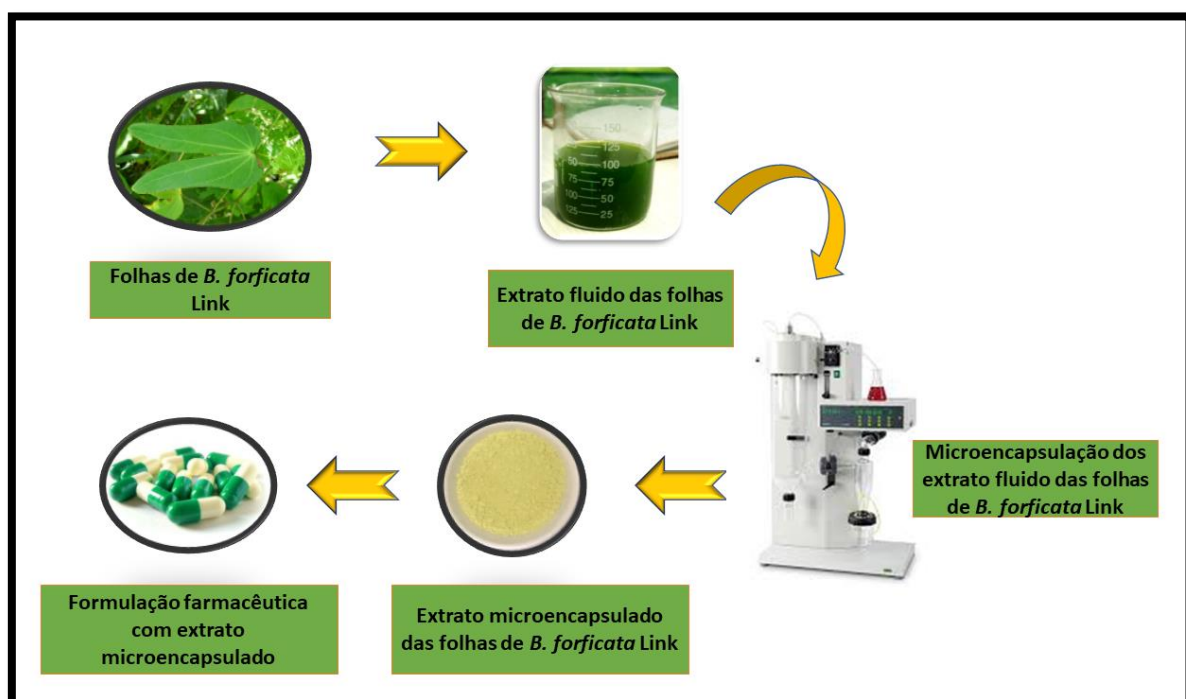
A presente invenção trata de uma formulação contendo extratos aquosos secos microencapsulado de *Bauhinia forficata* link subsp. *forficata* para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2, para uso via oral nas apresentações de comprimidos, cápsulas, granulados e pós. A invenção foi formulada para ser consumida por portadores de diabetes mellitus tipo 2, por apresentar-se eficaz na redução da glicemia, proporcionando uma recuperação das ilhotas Langerhans e das células β pancreáticas, além de possuir efeito antioxidante.

REINVIDICAÇÕES

1. “Formulação contendo extrato microencapsulado de *Bauhinia forficata* link subsp. *forficata* com atividade antioxidante e hipoglicemiante para o tratamento do diabetes mellitus” **caracterizada por** compreender: extrato seco microencapsulado (30 a 70%), materiais encapsulantes maltodextrina (5 a 30%) e aerosil (5 a 30%) em temperatura de entrada entre 110 a 180°C, velocidade de fluxo 5 a 9 mL/min, injeção 15%, pressão de 0,1 a 0,9 barr e aspensão em 50 a 70%.
2. “Formulação contendo extrato microencapsulado de *Bauhinia forficata* link subsp. *forficata* com atividade antioxidante e hipoglicemiante para o tratamento do diabetes mellitus” de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser a microencapsulação na temperatura de entrada entre 110 a 180°C, velocidade de fluxo 5 a 9 mL/min, injeção 15%, pressão de 0,1 a 0,9 barr e aspensão em 50 a 70%.
3. “Formulação contendo extrato microencapsulado de *Bauhinia forficata* link subsp. *forficata* com atividade antioxidante e hipoglicemiante para o tratamento do diabetes mellitus” de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender extrato seco microencapsulado, obtido do extrato fluido das folhas por processo exclusivamente aquoso, na proporção de 50 a 90%, 10 a 50% das folhas secas, na temperatura de 80 a 110 °C, no tempo de 5 a 25 minutos.
4. “Formulação contendo extrato microencapsulado de *Bauhinia forficata* link subsp. *forficata* com atividade antioxidante e hipoglicemiante para o tratamento do diabetes mellitus” de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** ser microencapsulado pela técnica *spray drying*, usando a temperatura de entrada entre 110 a 180°C, velocidade de fluxo 5 a 9 mL/min, injeção 15%, pressão de 0,1 a 0,9 barr e aspensão em 50 a 70%;
5. “Formulação contendo extrato microencapsulado de *Bauhinia forficata* link subsp. *forficata* com atividade antioxidante e hipoglicemiante para o tratamento do diabetes mellitus” de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, **caracterizado por** na forma de cápsula, comprimido, granulado ou pó para administração oral.
6. “Formulação contendo extrato microencapsulado de *Bauhinia forficata* link subsp. *forficata* com atividade antioxidante e hipoglicemiante para o tratamento do diabetes mellitus”

caracterizado por ser antioxidante e hipoglicemiante e efeito benéfico nas ilhotas Langerhans e nas células β pancreáticas.

7. “Formulação contendo extrato microencapsulado de *Bauhinia forficata* link subsp. *forficata* com atividade antioxidante e hipoglicemiante para o tratamento do diabetes mellitus” **caracterizado por** ser para uso via oral, para animais e humanos para o tratamento diabetes mellitus.

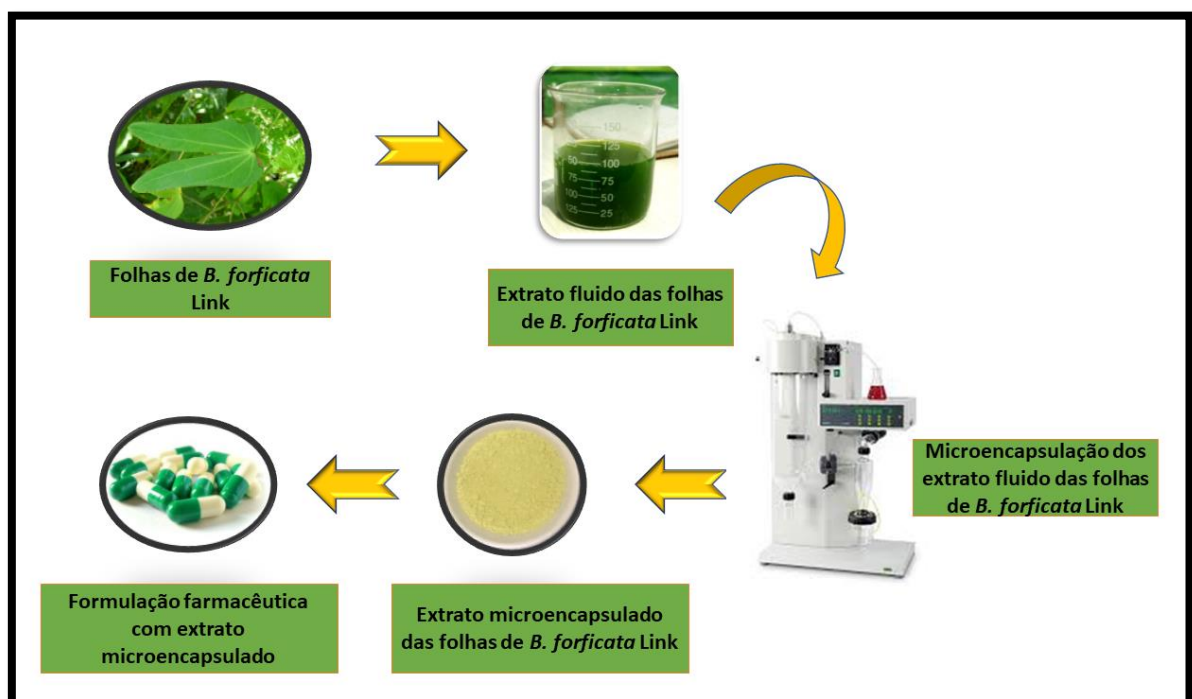


Conclusões

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se inferir que:

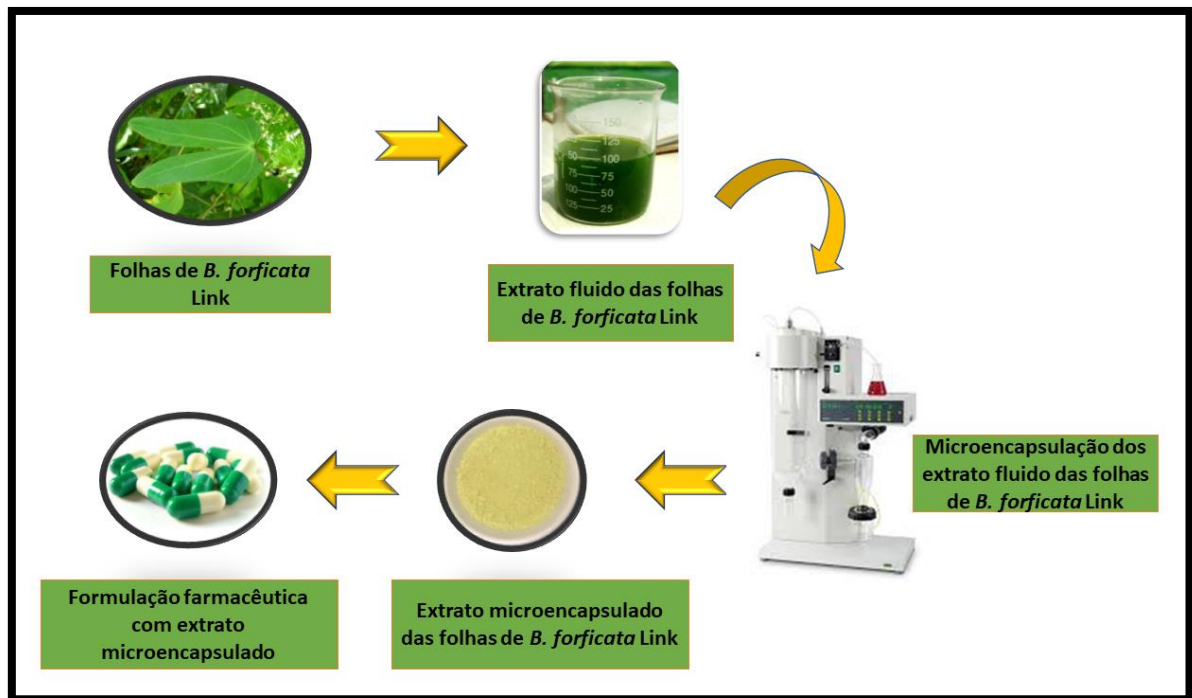
- O estudo sobre as patentes com *Bauhinia forficata* mostraram seu potencial terapêutico no tratamento do diabetes mellitus tipo2, sendo de grande interesse científico sua aplicação em formulações farmacêuticas.
- As características físico-químicas, granulométricas e morfológicas dos extratos microencapsulados das folhas de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata* mostraram-se adequadas para sua utilização em comprimidos e cápsulas.
- A espectroscopia no infravermelho e a cromatografia de alta eficiência acoplada a espectroscopia de massas confirmaram que a microencapsulação preservou os compostos fenólicos, flavonóis e seus derivados O-glicosilados.
- Os polifenóis e os flavonoides bioacessíveis, em cada etapa da digestão *in vitro* apresentaram atividade antioxidante.
- Os extratos microencapsulados promoveram uma regeneração das células β pancreáticas, reduzindo os níveis de glicose sanguínea em camundongos diabéticos, com efeito benéfico superior ao da metformina, mostrando potencial terapêutico para aplicações em formulações farmacêuticas com atividade antidiabética.



Perspectivas

6 PERSPECTIVAS

- Identificar os principais polifenóis totais e flavonoides dos extratos microencapsulados de *Bauhinia forficata* Link subsp. *forficata*, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por *eletrospray* e analisador de armadilha de íons (CLAE-MSⁿ), em cada etapa do processo de digestão gastrointestinal simulado.
- Realizar as análises das principais enzimas antioxidantes no fígado dos camundongos diabéticos.
- Realizar estudos desses extratos nos receptores de insulina e avaliar a genotoxicidade em doses menores.



Anexos

ANEXO - A: Aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM ANIMAIS
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 32155734 – e-mail: cceapi@ufpi.br

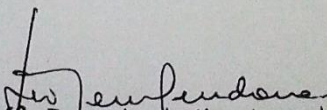
Teresina, 16 de maio de 2012.

Ao (A)

Prof (a): Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira e Francisco de Assis Oliveira
Departamento: UFPI/CCS/NPPM

Sr. (a) Pesquisador (a),

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado: **“Estudo químico-farmacológico de plantas medicinais do cerrado e da caatinga do nordeste brasileiro e de produtos sintéticos e seus derivados bioativos.”**, foi avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais – CEEA/UFPI teve parecer **APROVADO** sob o nº. **008/12**. Esclarecemos que o mesmo se encontra de acordo com os requisitos exigidos para apreciação de projetos de pesquisa.


Prof.^a Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

Atenciosamente,

ANEXO B – Comprovante de depósito da patente no INPI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550-Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

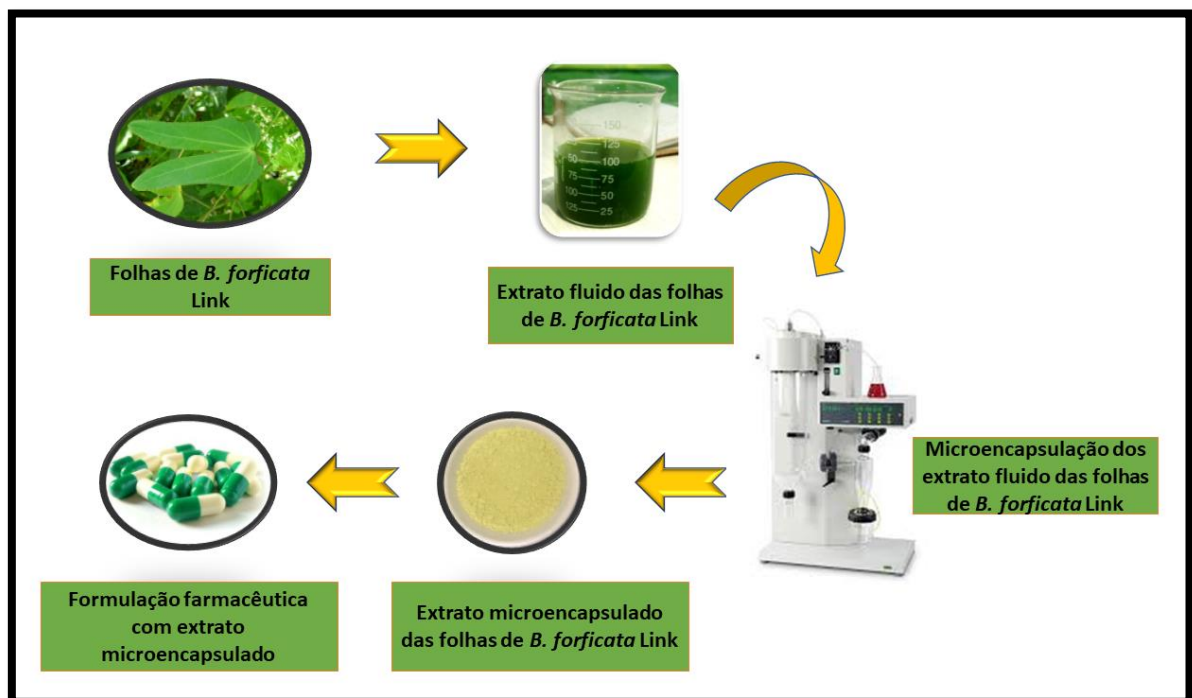
DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Universidade Federal do Piauí, através do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI – NINTEC –, efetuou às 12:10 horas do dia 14/02/2019, sob o número de Protocolo do INPI: **870190014724** o depósito de Pedido de Patente de Invenção intitulado **"FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO MICROENCAPSULADO DE BAUHINIA FORFICATA LINK SUBSP. FORFICATA COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E HIPOGLICEMIANTE PARA O TRATAMENTO DO DIABETES MELLITUS"**, com o número **BR 10 2019 002952-8** desenvolvido pelos inventores:

Lívio César Cunha Nunes
 Bárbara Verônica Cardoso de Souza
 Oskar Almeida Silva
 Rita de Cássia Meneses Oliveira
 Maria do Carmo de Carvalho Martins
 Mirian Lima dos Santos
 Mariana de Moraes Sousa
 Julianne Viana Freire Portela
 Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araujo
 Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante
 Alessandra Braga Ribeiro
 Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho
 Esmeralda Maria Lustosa Barros
 Maria Fabricia Beserra Gonçalves
 João Marcelo de Castro e Sousa
 Antonielly Campinho dos Reis
 Luís Felipe Lima Matos
 Antonia Amanda Cardoso de Almeida
 Rosália Maria Tórres de Lima.


Teresina, 14 de fevereiro de 2019.

 Profa. Dra. Maria Rita de Moraes Chaves Santos
 Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia



Apêndices

APÊNDICE A - Publicação na Expert Opinion on Therapeutic Patents-A1- Biotecnologia

 Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Expert Opinion on Therapeutic Patents


ISSN: 1354-3776 (Print) 1744-7674 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ietp20>


Bauhinia forficata in the treatment of diabetes mellitus: a patent review


Bárbara Verônica Cardoso de Souza, Regilda Saraiva dos Reis Moreira Araújo, Oskar Almeida Silva, Lucas Costa Faustino, Maria Fabrícia Beserra Gonçalves, Mirian Lima Dos Santos, Grasielly Rocha Souza, Lindalva Moura Rocha, Mônica Larissa Sousa Cardoso & Lívio César Cunha Nunes


To cite this article: Bárbara Verônica Cardoso de Souza, Regilda Saraiva dos Reis Moreira Araújo, Oskar Almeida Silva, Lucas Costa Faustino, Maria Fabrícia Beserra Gonçalves, Mirian Lima Dos Santos, Grasielly Rocha Souza, Lindalva Moura Rocha, Mônica Larissa Sousa Cardoso & Lívio César Cunha Nunes (2017): Bauhinia forficata in the treatment of diabetes mellitus: a patent review, Expert Opinion on Therapeutic Patents


To link to this article: <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1409208>

 Accepted author version posted online: 23 Nov 2017.
Published online: 08 Dec 2017.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 Article views: 11

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)
