

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação dos compostos bioativos e da citotoxicidade das folhas de *Bauhinia forficata* e de seu potencial antioxidante, antiglicante e como inibidora de enzimas relacionadas com a hiperglicemia e hiperlipidemia pós-prandial

Victor Hugo Mota Alves

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação dos compostos bioativos e da citotoxicidade das folhas de *Bauhinia forficata*  
e de seu potencial antioxidante, antiglicante e como inibidora de enzimas relacionadas  
com a hiperglicemia e hiperlipidemia pós-prandial

Victor Hugo Mota Alves

Foued Salmen Espindola

(Instituto de Biotecnologia)

Rodrigo Rodrigues Franco

(Instituto de Biotecnologia)

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do  
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação dos compostos bioativos e da citotoxicidade das folhas de *Bauhinia forficata*  
e de seu potencial antioxidante, antiglicante e como inibidora de enzimas relacionadas  
com a hiperglicemia e hiperlipidemia pós-prandial

Victor Hugo Mota Alves

Foued Salmen Espindola

(Instituto de Biotecnologia)

Rodrigo Rodrigues Franco

(Instituto de Biotecnologia)

Homologado pela coordenação do Curso  
de Biotecnologia em \_\_/\_\_/\_\_

Coordenador do Curso Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG

Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação dos compostos bioativos e da citotoxicidade das folhas de *Bauhinia forficata*  
e de seu potencial antioxidante, antiglicante e como inibidora de enzimas relacionadas  
com a hiperglicemia e hiperlipidemia pós-prandial

Victor Hugo Mota Alves

Aprovado pela Banca Examinadora em:     /     /     Nota: \_\_\_\_\_

---

Foued Salmen Espindola  
Presidente da Banca

Uberlândia,     de                                     de

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que nunca pouparam esforços para me ver crescer na vida.

## RESUMO

A *Bauhinia forficata* é uma planta originária da Mata Atlântica, que possui diversos usos fitoterápicos. O mais comum deles é o uso como tratamento complementar para o *Diabete Mellitus* do tipo 2. O *Diabetes Mellitus* é uma patologia que comumente atinge pessoas que possuem alguma deficiência na resposta à insulina. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o potencial fitoterápico da *B. forficata*, utilizando-se de particionamento líquido-líquido do extrato etanólico, onde foram obtidas as frações dos solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. Para tal foram realizados diversos testes, entre eles tem a caracterização fitoquímica dos compostos fenólicos, atividade antioxidante e antiglicante, além da capacidade na inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase, a  $\alpha$ -glicosidase e a lipase pancreática, relacionadas com hiperglicemia e hiperlipidemia pós-prandiais. Teste de citotoxicidade também foi realizado para determinar a porcentagem de hemólise causada pelos extratos da planta em eritrócitos. As duas melhores frações foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas para determinar os constituintes presentes em cada uma. A prospecção fitoquímica demonstrou altas concentrações de flavonoides e taninos condensados na fração de acetato de etila (196,03 mgGAE/g; 112,29 mgCE/g; 23,92 mgQE/g). No ensaio ORAC tivemos altos valores para quase todas as frações com similaridade significativa, com exceção da fração água. Para o método de FRAP as frações ButOH (1483,40  $\mu$ mol Trolox eq/g) e ACOET (1469,41  $\mu$ mol Trolox eq/g) apresentaram os melhores valores. No ensaio de DPPH as frações de acetato e o n-butanol foram as frações com menores  $IC^{50}$  ( $8,5 \pm 1,2$  e  $6,3 \pm 1,1$ , respectivamente). Nos testes de antiglicação, apesar das frações apresentarem resultados distintos entre os métodos, as frações de acetato de etila e n-butanol se destacam com resultados bons, como no método BSA/frutose ( $8,6 \pm 2,5$  e  $16,7 \pm 5,7$ , respectivamente). Para a inibição enzimática as frações acetato de etila e o n-butanol se destacam na inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, com baixos valores de  $IC^{50}$  (acetato de etila:  $0,4 \pm 0,1$  e n-butanol:  $0,13 \pm 0,02$  para a  $\alpha$ -amilase; e acetato de etila:  $8,2 \pm 3,3$  e n-butanol:  $17,1 \pm 6,1$  para a  $\alpha$ -glicosidase), para a enzima lipase pancreática os melhores  $IC^{50}$  foram as frações n-butanol e a fração residual ( $26,7 \pm 7,8$  e  $18,6 \pm 1$ , respectivamente). O teste de capacidade hemolítica demonstrou que as frações de *B. forficata* não possuem níveis altos de hemólise, tendo sua média abaixo dos 20% nas concentrações mais altas de extrato. Devido ao destaque nos ensaios anteriores, as frações acetato de etila e n-butanol foram escolhi-

das para a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas, onde foram encontradas diversas moléculas já descritas por outros autores como moléculas importantes na inibição enzimática, na atividade antioxidante e antiglicante, além disso, outras moléculas das classes dos flavonoides com altas capacidades terapêuticas. Dado os resultados de alta atividade antioxidante, baixos valores de IC<sub>50</sub> para a inibição da glicação e das enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase pancreática, pode-se abrir mais espaço para estudos futuros a respeito da atividade antidiabética dos biocompostos da *B. forficata* como fitoterápico e o possível desenvolvimento de fármacos para o diabetes.

**Palavras-chave:** Pata-de-vaca, Diabetes Mellitus, fitoterápicos

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	v
RESUMO .....	vi
SUMÁRIO .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. OBJETIVOS GERAIS .....	3
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	3
2.1. EXTRAÇÃO, PARTICIONAMENTO E DILUIÇÃO DOS EXTRATOS .....	3
2.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	4
2.2.1. DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES.....	4
2.2.2. DETERMINAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS (PROANTOCIANIDINAS)	5
2.2.3. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS .....	5
2.3. ENSAIOS ANTIOXIDANTES.....	5
2.3.1 CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC) .....	5
2.3.2 POTENCIAL ANTIOXIDANTE REDUTOR FÉRRICO (FRAP) .....	6
2.3.3 MÉTODO DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) .....	7
2.4. DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA .....	8
2.4.1. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -AMILASE .....	8
2.4.2. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -GLICOSIDASE.....	9
2.4.3. TIPO DE INIBIÇÃO.....	10
2.4.4. INIBIÇÃO DA ENZIMA LIPASE PANCREÁTICA .....	10
2.5. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (CAPACIDADE ANTIGLICANTE).....	10
2.5.1. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO BSA (ALBUMINA SÉRICA BOVINA) /FRUTOSE .....	10
2.5.2. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO BSA/METILGLIOXAL .....	12
2.5.3. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO ARGININA/ METILGLIOXAL .....	13
2.6. CITOTOXICIDADE DAS PARTIÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>B. forficata</i> PELO MÉTODO DE HEMÓLISE .....	14
2.7. HPLC-ESI-MS / MS .....	14
2.8 ANALISES ESTATÍSTICAS .....	15
3. RESULTADOS.....	15
3.1. EXTRAÇÃO, PARTICIONAMENTO E DILUIÇÃO DOS EXTRATOS .....	15



3.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	16
3.2.1. DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES.....	16
3.2.2. DETERMINAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS (PROANTOCIANIDINAS) .....	17
3.2.3. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS .....	17
3.2.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	18
3.3. ENSAIOS ANTIOXIDANTES.....	18
3.3.1. CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC) .....	18
3.3.2. POTENCIAL ANTIOXIDANTE REDUTOR FÉRRICO (FRAP) .....	19
3.3.3. MÉTODO DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) .....	20
3.4. DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA .....	21
3.4.1. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -AMILASE .....	21
3.4.2. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -GLICOSIDASE.....	21
3.4.3. TIPOS DE INIBIÇÃO .....	22
3.4.4. INIBIÇÃO DA ENZIMA LIPASE PANCREÁTICA .....	24
3.5. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (CAPACIDADE ANTIGLICANTE).....	24
3.5.1. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO BSA (ALBUMINA SÉRICA BOVINA) /FRUTOSE .....	25
3.5.2. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO BSA/METILGLIOXAL .....	25
3.5.3. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO ARGININA/ METILGLIOXAL .....	26
3.6. CITOTOXICIDADE DAS PARTIÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>B. forficata</i> PELO MÉTODO DE HEMÓLISE .....	27
3.7. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA - ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA .	28
4. DISCUSSÃO.....	33
5. CONCLUSÃO .....	37
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

A *Bauhinia forficata* Link é listada como uma planta nativa da Mata Atlântica, de acordo com o Catálogo de Plantas e Fungos do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (FORZZA; JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2010), porém se adaptou a outros biomas e atualmente pode ser facilmente encontrada no Cerrado brasileiro. Essa espécie pertence à família Fabaceae e possui diversas aplicações fitoterápicas. Sua utilização tem sido amplamente estudada como tratamento complementar do *Diabetes Mellitus* do Tipo 2 (DMT2) por sua ação insulinomimética (SALGUEIRO et al., 2016). Estudos anteriores, utilizando-se extratos hidrometanólicos das folhas de *B. forficata*, demonstraram o efeito inibidor enzimático, com as enzimas  $\alpha$ -glicosidase e as colinesterases, além do potencial antioxidante (FERRERES et al., 2012). A infusão de *B. forficata* é um dos fitoterápicos indicados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil como um tratamento auxiliar ao DMT2 (BRAZIL, 2006).

O diabetes é uma doença dividida em 2 tipos: no qual existe uma desregulação na produção de insulina no pâncreas (*Diabetes Mellitus* do tipo 1) ou uma resistência do organismo aos efeitos da insulina (*Diabetes Mellitus* do tipo 2), ela acomete grande parte da população mundial, sendo responsável por até 5% das mortes globais todo ano (OMS, 2018). Essa anormalidade da ação da insulina provoca efeitos drásticos, sendo um deles a hiperglicemia, que é o aumento de glicose na circulação sanguínea. Tal aumento induz estresses oxidativos no corpo e aumento da glicação de proteínas, que acarretam em evolução de outras doenças ou até mesmo o comprometimento de órgãos e membros (BAYNES, 1991). Devido a essa resistência do organismo à insulina, o DMT2 atinge o corpo humano de forma crônica, até hoje é incurável, porém tratável (OMS, 2018). Em geral o tratamento para o DMT2 consiste em dietas balanceadas, práticas regulares de exercícios físicos, para o controle da glicemia sanguínea e em estágios mais graves faz-se o uso de insulina exógena e sensibilizadores, porém o estudo de tratamentos complementares para auxiliar o tratamento alopático vem crescendo com o tempo, dando destaque aos fitoterápicos (DE SOUZA et al., 2018)

O estresse oxidativo é causado pelo dano das espécies reativas de oxigênio livres no meio celular, tais espécies podem ser originárias de diferentes condições como doenças ou até mesmo podem estar relacionadas com o estresse psicológico ou efeitos ambi-

entais (ADACHI; KAWAMURA; TAKEMOTO, 1993). Tal estresse pode levar a alterações químicas celulares e modificações entre as interações dos demais processos intracelulares e extracelulares, como dano permanente ao DNA e RNA, além de dano nas enzimas que reparam o DNA, e também danos às proteínas do citoplasma (SILVA; JASIULIONIS, 2014; ZHANG, 2010). Inúmeros fitoterápicos têm sido descritos como bons antioxidantes, diminuindo os radicais livres celulares, como a *B. forficata* (FRANCO et al., 2018).

Além do estresse oxidativo provocado por radicais livres existe outro mecanismo considerado importante, devido ao dano que ele provoca no organismo do indivíduo diabético, chamado de produtos finais de glicação avançada (ou AGEs, do inglês Advanced Glycated End-products) (PEPPA; URIBARRI; VLASSARA, 2003). Ambos os processos são naturais no corpo, porém com o aumento de glicose livre no sangue provocado pelo diabetes mellitus há o aparecimento de doenças secundárias como complicações cardiovasculares, retinopatias, catarata, acidente vascular cerebral, pé diabético, além de doenças gastrointestinais e uma maior deterioração celular (BAYNES, 1991).

O organismo humano absorve monossacarídeos, mas não polissacarídeos. Dessa forma, faz-se necessário o uso de catalizadores enzimáticos pelo organismo para hidrolisar esses polissacarídeos em monossacarídeos absorvíveis (glicose, frutose, manose e galactose), mais especificamente as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (BERG et al., 2015). A primeira é excretada principalmente pelas glândulas salivares e pelo pâncreas e a outra é presente no intestino delgado, e nesta sequência elas hidrolisam os carboidratos da dieta até a glicose, que é transferida para o sangue (BERG et al., 2015). Sendo esta uma das principais via para obtenção da glicose, inibi-la ou diminui-la é de grande auxílio para o tratamento do DMT2 (ZAREI; POURSHARIFI, 2015). Outro fator relevante para a melhora da ação da insulina é a dieta pobre em ácidos graxos, pois ela está associada com a melhora da mesma (WANG et al., 2006). A resistência à insulina está entre os mecanismos que se beneficiam de uma dieta desregulada ou do acúmulo desses ácidos graxos no organismo, visto isso, é essencial a busca do controle desse acúmulo, que é intermediado pela enzima lipase pancreática, auxiliando a melhora na resposta à insulina (ALMEIDA et al., 2009).

Estudos anteriores já demonstraram boas atividades do extrato etanólico das folhas de *B. forficata* em ensaios antioxidantes, antiglicantes e inibidora enzimática

(FRANCO et al., 2018), do qual esse trabalho deriva buscando o particionamento do extrato etanólico e avaliando qual a melhor partição em que os compostos tem a melhor atividade nos parâmetros dessas condições de estresse oxidativo, formação de AGEs, hiperglicemia e hiperlipidemia pós-prandiais.

### 1.1. OBJETIVOS GERAIS

Procura-se elucidar neste trabalho as propriedades das partições da folha de *B. forficata* como antioxidante, antiglicante, inibidor enzimático e citotoxicidade.

### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fracionar o extrato bruto e avaliar a capacidade das folhas como:
  - antioxidante, pelos métodos de DPPH, FRAP e ORAC;
  - antiglicante, pelos métodos de antiglicação de BSA/frutose, BSA/metilglioxal e arginina/metilglioxal;
  - inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase e lipase;
  - citotoxicidade de cada fração pelo ensaio de hemólise, utilizando-se eritrócitos de ratos Wistar;
  - Determinar quantitativamente por meio de métodos de prospecção fitoquímica as proporções de flavonoides, fenóis totais e taninos condensados;
  - Elucidar as moléculas das melhores frações através de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. EXTRAÇÃO, PARTICIONAMENTO E DILUIÇÃO DOS EXTRATOS

Para a obtenção do extrato bruto, foram utilizadas 500 g de folhas secas de *B. forficata*. Foi feita a maceração estática, onde o material permaneceu imerso em 2,5 litros do solvente etanólico (proporção de 1:5 m/v) durante seis dias em média. Após esse período, a solução com os extrativos foi filtrada e o solvente removido em rotaevaporador sobre pressão reduzida a 40° C. O resíduo do material vegetal foi então remacerado por mais duas vezes, utilizando-se o solvente recuperado na rotaevaporação. O

extrato foi congelado e liofilizado para a remoção de água e posteriormente utilizado para o particionamento.

Para o particionamento, foi feita a diluição de 5g do extrato bruto em 50 mL de solução hidrometanólica na proporção de 1:9. Misturou-se a solução hidrometanólica com o extrato bruto, depois filtrou-se a solução em papel filtro com o auxílio de funil comum. A massa residual no papel filtro foi descontada para avaliação do rendimento final de cada fração. Utilizando-se de um funil de bromo a partição foi realizada com solventes de polaridade crescentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, completando-se com o residual que foi denominado de fração água. Para tal foi realizada três extrações com 50 mL de cada solvente. Os solventes foram rotaevaporados com pressão reduzida a 40°C, congeladas e liofilizadas para a remoção da água remanescente e em seguida armazenadas a -20° C.

## 2.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A prospecção fitoquímica teve por finalidade a caracterização dos compostos fenólicos nas frações, determinando quantitativamente as concentrações de flavonoides, taninos condensados e fenóis totais (ZOU et al., 2011).

### 2.2.1. DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES

Adicionou-se 30 µL de cada fração de 10 mg/ml em triplicada em uma placa de 96 poços, foi acrescentado 180 µL de água milli-Q e 10 µL de solução de 5% de NaNO<sub>2</sub> em todos os poços com pipeta multicanal e incubou por 6 minutos à 25° C. Adicionou-se 20 µL de AlCl<sub>3</sub> a 10% (m/v) e deixou em repouso por 6 minutos, depois foi adicionou à mistura 60 µL de solução a 4% de NaOH e incubou mais 15 minutos. A curva padrão foi preparada para análise dos dados utilizando-se quercetina (QE) nas concentrações de 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml. Tanto a curva padrão quanto o branco (medida negativa com etanol) foram adicionados na mesma proporção das frações nos poços (30 µL). A placa foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 510 nm, onde o branco foi descontado das amostras posteriormente. Tais medidas foram expressas em mg de equivalentes de quercetina por grama de material vegetal (mg QE/g) (ZOU, 2011).

## 2.2.2. DETERMINAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS (PROANTOCIANIDINAS)

Adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de cada fração de 10 mg/ml em triplicada em uma placa de 96 poços, foi feito o acréscimo de 200  $\mu\text{L}$  de solução de 4% de vanilina em metanol em todos os poços com pipeta multicanal e foi incubado por 15 minutos à 25° C. A curva padrão foi preparada para análise dos dados utilizando-se catequina (CE) nas concentrações de 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Tanto a curva padrão quanto o branco (medida negativa, usar água ou metanol) foram adicionados na mesma proporção das frações nos poços (10  $\mu\text{L}$ ). A placa foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 500 nm, onde o branco foi descontado das amostras posteriormente. Tais medidas foram expressas em mg de equivalentes de catequina por grama de material vegetal (mg CE/g) (ZOU et al., 2011).

## 2.2.3. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

Adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de cada fração de 10 mg/ml em triplicada em uma placa de 96 poços, foi acrescentado 195  $\mu\text{L}$  de água milli-Q e 25  $\mu\text{L}$  de reagente Folin-Ciocalteu em todos os poços com pipeta multicanal e incubou-se por 6 minutos à 25° C. Adicionou-se 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 7% e foi incubado por duas horas no escuro à 25° C. A curva padrão foi preparada para análise dos dados utilizando-se ácido gálico (GAE) nas concentrações de 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Tanto a curva padrão quanto o branco (medida negativa) foram adicionados na mesma proporção do extrato nos poços (5  $\mu\text{L}$ ). A placa foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm, onde o branco foi descontado das amostras posteriormente. Tais medidas foram expressas em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de material vegetal (mg GAE/g) (ZOU et al., 2011).

## 2.3. ENSAIOS ANTIOXIDANTES

### 2.3.1 CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC)

Neste ensaio o radical peroxil, gerado pela reação do AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)] que é capaz de oxidar a fluoresceína, (GLAZER, 1988).

Assim o azobis foi utilizado para produzir o radical peroxil por aquecimento, o que degrada a molécula fluorescente, resultando na perda de fluorescência. Este ensaio avaliou a atividade antioxidante através da inibição da oxidação da fluoresceína, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons de moléculas antioxidantes (PRIOR et al., 2003).

Para o ensaio todos os reagentes foram preparados com tampão ORAC a 75 mM e pH 7,4. Com o tampão previamente preparado, preparou-se o radical Azobis a 153 mM, cobrindo com papel alumínio para evitar a reação do radical com a luz. Já a curva padrão foi realizada com Trolox (pesou-se 0,0125g de Trolox em 5 mL de tampão ORAC) e diluiu serialmente para as concentrações de 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125 e 250  $\mu$ M. Preparou-se fluoresceína em tampão ORAC pesando 0,016 g de fluoresceína diluídos em 100 ml do tampão, pegou-se 1 ml dessa primeira solução e diluiu em mais 99 ml de tampão para se ter uma solução de fluoresceína de 1:99. Pegou-se 1 ml da segunda solução e diluiu em mais 50 ml de tampão, chegando a uma concentração de  $8,5 \times 10^{-5}$  mM de fluoresceína.

Em uma microplaca de 96 poços de cor preta pipetou-se 25  $\mu$ L do extrato em triplicata, no caso da curva pipetou-se a mesma quantidade dos extratos e para o controle positivo pipetou-se soluções de ácido ascórbico nas mesmas concentrações das frações. Para o Branco, acrescentou-se 25  $\mu$ L de tampão ORAC em triplicata na microplaca, este foi o valor do branco que foi então descontado da absorbância das amostras e da curva padrão. Adicionou-se a todos os poços 150  $\mu$ L da solução de fluoresceína à concentração de  $8,5 \times 10^{-5}$  mM e momentos antes da leitura ainda se acrescentou 30  $\mu$ L da solução de Azobis. Utilizou-se o espectrofluorímetro para análise da fluorescência, com excitação a 485 nm e emissão a 528 nm, em temperatura de 37 °C durante 90 minutos em um intervalo de leitura de 90 segundos.

### 2.3.2 POTENCIAL ANTIOXIDANTE REDUTOR FÉRRICO (FRAP)

Este método colorimétrico pode ser considerado um método indireto para a determinação antioxidante. Nele os antioxidantes presentes na amostra reduzem  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , o qual é quelado pela 2,4,6-tri (2 piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo  $Fe^{2+}$  - TPTZ, de coloração azul, lida no comprimento de onda de 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996).

Inicialmente preparou-se o tampão de acetato de sódio à 0,3 M e pH 3,6. Em seguida preparou-se uma solução de HCl à 40 mM, após homogeneizado e transferiu-se para um frasco de vidro e foi armazenado em temperatura ambiente. A solução anterior foi utilizada no preparo da solução de TPTZ à 10 mM, posteriormente armazenando-o em frasco âmbar e em refrigeração. A solução com íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) foi preparado pesando-se 0,108 g de cloreto férrico, diluindo-o em 20 mL de água destilada.

Utilizando-se as soluções de TPTZ e a solução de cloreto férrico, juntamente com o tampão de acetato de sódio, preparou-se o reagente FRAP, na seguinte proporção: 10 partes de tampão de acetato de sódio para 1 parte de cada solução, 1 parte de solução TPTZ e 1 parte de solução de cloreto férrico. Para a curva padrão foi utilizado Trolox (pesou-se 0,0125g de Trolox em 5 mL de tampão FRAP) e diluiu serialmente para as concentrações de 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ . Para o controle positivo preparou-se soluções de ácido ascórbico nas mesmas concentrações das frações.

A reação foi feita em microplaca de 96 poços adicionando-se 10  $\mu\text{L}$  da amostra ou as diluições da curva Trolox, mais 25  $\mu\text{L}$  de água destilada e 250  $\mu\text{L}$  tampão FRAP. Após a preparação da placa, incubou-se a mesma por 6 minutos a 37°C. Após incubação, leu-se a placa em espectrofotômetro em 593 nm de absorbância.

### 2.3.3 MÉTODO DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Tal método baseia-se na doação de um elétron ou hidrogênio da amostra para o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), quando há reação de redução do radical no poço da microplaca há indicação positiva de absorbância que é lida à 517 nm (YILDIRIM; MAVI; KARA, 2001). Foi realizado o ensaio de  $\text{IC}_{50}$  para avaliar a concentração necessária para que cada fração atinja 50% da capacidade inibitória, construindo uma curva para cada fração.

Primeiramente a solução de DPPH foi preparada a uma concentração de 0,06 mM. Com a concentração do DPPH devidamente corrigida iniciou-se o processo de pipetagem em microplaca, adicionando 75  $\mu\text{L}$  da amostra testada e mais 225  $\mu\text{L}$  da solução DPPH e incubando por 30 minutos a 30° C e ao abrigo da luz. Ao final da incubação, foi feita a leitura da placa no comprimento de onda de 517 nm. Para obtenção dos valores de branco foram pipetados em outra microplaca 50  $\mu\text{L}$  das amostras testadas e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de metanol em cada poço, lendo a placa em espectrofotômetro.



$$CA = (\%) = \left( \frac{Abs\ controle - (Abs\ amostra - Abs\ branco)}{Abs\ controle} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: CA é Capacidade Antioxidante, Abs controle é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH, Abs amostra é a absorbância da mistura (DPPH + amostra), Abs branco é a absorbância da amostra em metanol.

## 2.4. DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

### 2.4.1. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -AMILASE

As partições das folhas da pata-de-vaca foram analisadas quanto à sua capacidade de inibição sobre a enzima  $\alpha$ -amilase pelo método GALC2CNP modificado, foram necessários o substrato  $\alpha$ -(2-cloro-4-nitrofenil)- $\beta$ -1,4-galactopiranosilmaltosídeo (GAL-G2- $\alpha$ -CNP) e fração de saliva enriquecida com a enzima  $\alpha$ -amilase salivar (JUSTINO *et al.*, 2018). A amostra de saliva foi obtida pelo método de salivação, onde o indivíduo voluntário salivou e posteriormente a mesma foi submetida a cromatografia e com isso foi obtido fração enriquecida em  $\alpha$ -amilase salivar que foi armazenada a -20°C. No momento de realização do teste a saliva foi então descongelada e centrifugada a 12000 xg por 10 minutos a 20°C. O sobrenadante foi fracionado em uma coluna de Q-Sepharose, fazendo uso de tampão contendo 50 mM de Tris-HCL (pH 8,0), 10 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e 10 mM de EGTA (ácido etilenoglicol tetra-acético). O volume de exclusão da coluna de Q-Sepharose foi dialisado em tampão de bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,0, liofilizado e solubilizado em 50 mM de tampão ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico (MES), contendo 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 140 mM de tiocianato de potássio e 300 mM de cloreto de sódio pH 6,0.

As frações foram dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido) à uma concentração de 10 mg/ml e diluídas serialmente mais seis vezes, e posteriormente incubadas com a fração enriquecida de amilase (proporção 1:10) durante 30 minutos a 37°C. A reação iniciou-se com a adição de 320  $\mu$ L do substrato GAL-G2- $\alpha$ -CNP (12 mM), as absorbâncias foram medidas utilizando comprimento de onda de 405 nm, durante 3 minutos com intervalos de 1 minuto, a 37°C. O controle positivo utilizado foi a Acarbose, diluída nas mesmas concentrações das frações. Os ensaios foram realizados em triplicata, com dife-

rentes concentrações de extrato afim de determinar a menor concentração de amostra que atingiu 50% de inibição da enzima (IC<sub>50</sub>) e o resultado apresentado em porcentagem de inibição da  $\alpha$ -amilase que foi calculado pela Equação 4 que segue abaixo. Equações 2 e 3 determinaram a atividade da enzima em U.m/L e %, respectivamente, e foram utilizadas no cálculo da inibição (JUSTINO *et al.*, 2018).

$$\text{Ativ. de } \alpha - \text{amilase (U /mL)} = [(\delta\text{Abs /minuto}).Vf.Fd] / \xi.Vs.I \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Ativ. da } \alpha - \text{amilase (\%)} = [(A \text{ amostra}) / (A \text{ controle})] . 100 \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - (\text{Atividade da } \alpha - \text{amilase em \%}) \quad \text{Equação 4}$$

Onde,  $\delta\text{Abs /minuto}$  significa a diferença das absorbâncias por minuto ( $\text{Abs}_3 - \text{Abs}_1/2$ ); ( $\text{Abs} = \text{Absorbância}$ );  $Vf$  é o volume total da reação (328 $\mu\text{L}$ );  $Vs$  é o volume de amostra de fração somado com a enzima  $\alpha$ -amilase que corresponde a 8  $\mu\text{L}$ ;  $Fd$  é o fator de diluição da saliva (50);  $\xi$  é o coeficiente de absorvidade do 2-cloro-p-nitrofenol;  $I$  consiste no comprimento de percurso da luz (0,97);  $A \text{ controle}$  é a atividade da  $\alpha$ -amilase e  $A \text{ amostra}$  é a atividade da  $\alpha$ -amilase na presença das frações.

#### 2.4.2. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -GLICOSIDASE

O ensaio de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase foi feito utilizando-se fração enriquecida em  $\alpha$ -glicosidase obtida a partir de solução preparada com de 0,1 g de pó cetônico de intestino de rato diluído em 3 ml de tampão fosfato de potássio a 50 mM, seguido de centrifugação a 12000g por 30 minutos, o sobrenadante foi coletado. O controle positivo utilizado foi a Acarbose, diluída nas mesmas concentrações das frações. Foram utilizados 75  $\mu\text{L}$  do sobrenadante que contem a enzima, adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de Glutati-ona reduzida (GSH) 1,5 mM e por fim 15  $\mu\text{L}$  de amostra ou do controle positivo. A solução contendo a enzima, o GSH e a amostra foram incubadas a 37°C por vinte minutos, posteriormente separou-se placa de 96 poços e adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução anterior e 220 de substrato (Substrato p-nitrofenil-alfa-D-glicopiranosídeo (301,25 g/mol) a 4 mM). O ensaio cinético foi conduzido a 405 nm durante 30 minutos com intervalos de leitura a cada 5 minutos e a porcentagem de inibição é dada pelo Equação 5 (JUSTINO *et al.*, 2018).

$$Inibição = \left( \frac{(ASC\ controle - ASC\ amostra)}{ASC\ controle} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde: ASC controle é a área sob a curva na ausência da fração, e ASC amostra é a área sob a curva na presença da fração.

#### 2.4.3. TIPO DE INIBIÇÃO

Para esclarecer o tipo de inibição exercido pelas partições sobre as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, a plotagem dos dados utilizando Lineweaver-Burk foi realizada.

#### 2.4.4. INIBIÇÃO DA ENZIMA LIPASE PANCREÁTICA

O ensaio teve como materiais necessários o tampão Tris-HCl 0,05 M, que contém  $CaCl_2$  0,01 M e NaCl 0,025 M (pH 8), o substrato 4-nitrofenil palmitato a 0,8 mM e enzima lipase pancreática suína em concentração 10 mg/ml. A enzima foi centrifugada em 2000g por 3 minutos. O controle positivo utilizado foi o ORLISTAT, diluído em DMSO nas mesmas concentrações das frações. O procedimento ocorreu com a adição de 100  $\mu$ L da enzima e 50  $\mu$ L da amostra ou do controle positivo. Incubou-se durante 10 minutos a 37°C, em poço separado adicionou-se 100  $\mu$ L da enzima e 50 de tampão (controle negativo), por fim adicionou-se 50  $\mu$ L de substrato e realizou-se a leitura durante 30 minutos a 25°C a 410 nm e a porcentagem de inibição é dada pelo Equação 6 (JUSTINO et al., 2018):

$$Inibição(\%) = \left( \frac{(ASC\ controle - ASC\ amostra)}{ASC\ controle} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde: ASC controle é a área sob a curva na ausência da fração, e ASC amostra é a área sob a curva na presença da fração.

### 2.5. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (CAPACIDADE ANTIGLICANTE)

#### 2.5.1. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO BSA (ALBUMINA SÉRICA BOVINA) /FRUTOSE

O ensaio contou com a preparação de quatro conjuntos de micro tubos distintos, sendo o primeiro conjunto os que possuem amostras que foram testadas (450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA a concentração de 50 mg/ml em tampão fosfato, 150 µL de frutose 1,25 mM em tampão fosfato e 50 µL do agente antiglicantes, que foram os extratos particionados das folhas de *B. forficata*). O segundo conjunto foram os controles positivos, onde não houve glicação (450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA a concentração de 50 mg/ml em tampão fosfato, 150 µL de frutose 1,25 mM em tampão fosfato e 50 µL de quercetina (inicialmente com 10 mg/ml e diluída serialmente mais seis vezes)). No terceiro conjunto foi onde ocorreu a glicação, sendo assim considerada o controle negativo (450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA a concentração de 50 mg/ml em tampão fosfato, 150 µL de frutose 1,25 mM em tampão fosfato e 50 µL de água). Já o quarto conjunto consistiu no tubo branco, onde não houve a presença de frutose e de agentes antiglicantes, ( 450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA a concentração de 50 mg/ml em tampão fosfato, 150 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida) e 50 µL de água).

As amostras foram incubadas por 3 dias em condições de privação de luz a 37°C, após a incubação foram adicionados 800 µL de ácido tricloroacético 20%, posteriormente centrifugou-se os tubos a 10000g por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 800 µL de tampão fosfato. Foram pipetados 300 µL da solução de pellet ressuspendido em placa de 96 poços preta, foi pipetado somente tampão fosfato em alguns poços para que fosse descontado seus valores das demais amostras. A leitura foi realizada no comprimento de onda de excitação (350 nm) e de emissão (420 nm). A porcentagem de inibição foi calculada conforme a Equação 7 (JUSTINO et al., 2018).

$$IG (\%) = 100 - \left( \frac{(IF \text{ amostra} - IF \text{ branco})}{(IF \text{ controle} - IF \text{ branco})} \right) 100 \quad \text{Equação 7}$$

Sendo: IF amostra a intensidade de fluorescência na presença da fração, IF branco a intensidade de fluorescência na ausência de frutose e fração, e IF controle a intensidade de fluorescência na ausência da fração.

### 2.5.2. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO BSA/METILGLIOXAL

O ensaio contou com a preparação de quatro conjuntos de micro tubos distintos, sendo o primeiro conjunto os que possuem amostras que foram testadas (450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA a concentração de 50 mg/ml em tampão fosfato, 150 µL de metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato e 50 µL do agente antiglicantes, que foram os extratos particionados das folhas de *B. forficata*). O segundo conjunto foram os controles positivos, onde não houve glicação (450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA a concentração de 50 mg/ml em tampão fosfato, 150 µL de metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato e 50 µL de quercetina (inicialmente com 10 mg/ml e diluída serialmente mais seis vezes)). No terceiro conjunto foi onde ocorreu a glicação, sendo assim considerada o controle negativo (450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA a concentração de 50 mg/ml em tampão fosfato, 150 µL metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato e 50 µL de água). Já o quarto conjunto consistiu no tubo branco, onde não houve a presença metilglioxal e de agentes antiglicantes, ( 450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA a concentração de 50 mg/ml em tampão fosfato, 150 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida) e 50 µL de água).

O procedimento teve sequência de uma incubação por 3 dias no escuro a 37°C, feita a incubação, realizou-se a centrifugação dos tubos a 10000g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspensando o pellet em 800 µL de tampão fosfato, foram pipetados 300 µL de amostra na microplaca preta de 96 poços, foi pipetado somente tampão fosfato em alguns poços para que fosse descontados seus valores das demais amostras. A leitura foi então realizada em comprimento de onda de excitação (340 nm) e de emissão (380 nm). A porcentagem de inibição foi calculada pela Equação 7 (JUSTINO et al., 2018).

$$IG (\%) = 100 - \left( \frac{(IF \text{ amostra} - IF \text{ branco})}{(IF \text{ controle} - IF \text{ branco})} 100 \right) \quad \text{Equação 7}$$

Sendo: IF amostra a intensidade de fluorescência na presença da fração, IF branco a intensidade de fluorescência na ausência de metilglioxal e da fração, e IF controle a intensidade de fluorescência na ausência da fração.

### 2.5.3. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO ARGININA/ METILGLIOXAL

O ensaio contou com a preparação de quatro conjuntos de micro tubos distintos, sendo o primeiro conjunto os que possuem amostras que foram testadas (450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de arginina 106,6 mM em tampão fosfato, 150 µL de metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato e 50 µL do agente antiglicantes, que foram os extratos particionados das folhas de *B. forficata*). O segundo conjunto foram os controles positivos, onde não houve glicação (450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de arginina 106,6 mM em tampão fosfato, 150 µL de metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato e 50 µL de quercetina (inicialmente com 10 mg/ml e diluída serialmente mais seis vezes)). No terceiro conjunto foi onde ocorreu a glicação, sendo assim considerada o controle negativo (450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de arginina 106,6 mM em tampão fosfato, 150 µL metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato e 50 µL de água). Já o quarto conjunto consistiu no tubo branco, onde não houve a presença metilglioxal e de agentes antiglicantes, (450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de arginina 106,6 mM em tampão fosfato, 150 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida) e 50 µL de água).

O procedimento foi então seguido de incubação por 3 dias no escuro a 37°C, feita a incubação, foram pipetados 300 µL de amostra na microplaca preta de 96 poços, foi pipetado somente tampão fosfato em alguns poços para que fosse descontado seus valores das demais amostras. A leitura deverá ser realizada em comprimento de onda de excitação (340 nm) e de emissão (380 nm). A porcentagem de inibição foi calculada pela Equação 7 (JUSTINO et al., 2018).

$$IG (\%) = 100 - \left( \frac{IF \text{ amostra} - IF \text{ branco}}{IF \text{ controle} - IF \text{ branco}} \right) 100 \quad \text{Equação 7}$$

Sendo: IF amostra a intensidade de fluorescência na presença da fração, IF branco a intensidade de fluorescência na ausência de metilglioxal e da fração, e IF controle a intensidade de fluorescência na ausência da fração.

## 2.6. CITOTOXICIDADE DAS PARTIÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DE *B. forficata* PELO MÉTODO DE HEMÓLISE

O ensaio de hemólise foi realizado com base no estudo de EVANS et al., (2013). Para a avaliação da capacidade hemolítica, as frações e a saponina Quillaja sp (usada como controle positivo Sigma) foram diluídos em etanol nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,67 µg/mL. Por outro lado, foram avaliadas três concentrações das partições, começando por 500, 250 e 125 µg/mL. Inicialmente, foi coletado por pulsão cardíaca 1 mL de sangue de rato Wistar macho, devidamente sedado, por meio de tubo revestido com K2-EDTA (parecer do comitê de ética no. 015/17). Após coleta, o sangue foi centrifugado a 500xg durante 5 minutos para que o sobrenadante (plasma) possa ser descartado. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em tampão fosfato de sódio (PBS) (pH 7,4) e a solução foi então centrifugada a 500g durante 5 min. Logo após a centrifugação, o sobrenadante é descartado e o processo repetido por mais 3 vezes, com a finalidade de lavar as células. Em seguida, o sobrenadante foi removido e substituído por PBS enriquecido com glicose (10mM) para obtenção de solução rica em eritrócitos (SRE).

Em um tubo de 10 mL, foram acrescentados 9800 µL de PBS e 200 µL de SER (diluição de 1:50) para obtenção de solução diluída de eritrócitos (SDE). Para o início do ensaio, foram adicionados 10 µL de amostra (extrato/partição) e 190 µL de SDE em placas de 96 poços com fundo côncavo. As placas foram então incubadas à 37°C durante 1 hora. Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 500xg por 5 minutos para sedimentar os eritrócitos intactos e então, foram transferidos 100 µL do sobrenadante de cada poço para novos poços de uma placa de 96 poços de fundo plano. As absorbâncias foram então medidas em espectrofotômetro a 405 nm. Para o branco, foram utilizados 10 µL de solução de triton (10%). O valor médio de eritrócitos em sangue de rato Wistar macho é de 865,106 células/µL, portanto, a concentração final de eritrócitos foi de aproximadamente  $18.10^5$  células por poço (LIMA et al., 2014).

## 2.7. HPLC-ESI-MS / MS

Os compostos nas frações que apresentaram as melhores atividades biológicas foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa com ionização por eletro spray (HPLC-ESI-MS / MS, Agilent Q-

TOF, modelo 6520). Foi usado uma solução Metanol-H<sub>2</sub>O (4:1) como sistema de solvente e as amostras foram infundidas na fonte ESI do equipamento a uma taxa de fluxo de 200 µl / h. Utilizou-se gás nitrogênio como gás de secagem gás a uma taxa de fluxo de 8 L/minutos e como gás nebulizador a 58 psi. A temperatura do nebulizador foi ajustada para 200°C e potencial de 4,5 kV foi aplicado ao capilar. A energia de impacto do elétron foi ajustada para 5-30 eV. Os parâmetros do HPLC foram: coluna Agilent Zorbax modelo 50 x 2,1 mm, partículas de 1,8 µm e diâmetro de poro de 110 Å, fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v v-1) (A) e metanol (B). O sistema solvente de gradiente (B) foi: 2% (0 min); 98% (0-15 min); 100% (15-17 min); 2% (17-18 min); 2% (18-22 min), com um fluxo de 0,35 mL/minutos e detectado a UV de 280 e 360 nm. Os dados foram adquiridos nos modos negativo e positivo, com ajuste para um intervalo de 20-1000 m/z.

## 2.8 ANALISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism versão 6.0. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média e a análise da variância foi realizada pelo teste One-Way ANOVA com teste Dunnett para comparações múltiplas entre os controles e as médias das amostras, One-Way e two-Way ANOVA com teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias das amostras e dos controles. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. EXTRAÇÃO, PARTICIONAMENTO E DILUIÇÃO DOS EXTRATOS

Conforme descrito nos métodos, foram executados os passos para obtenção de cada fração particionada e ao fim foi dado a seguinte denominação para fração extraída pelos solventes por polaridade crescente hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (ACOET), n-Butanol (ButOH), e a parte residual de H<sub>2</sub>O e seu rendimento é demonstrado na Tabela 1.



Tabela 1: Rendimento do particionamento do extrato etanólico de *B. forficata*

Fração	Massa final das extrações (g)	Rendimento (%)
Hexano	0,14	2,98
Diclorometano	0,63	13,08
Acetato de Etila	0,68	14,14
N-Butanol	1,17	24,34
Água residual	0,03	0,62

### 3.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

#### 3.2.1. DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES

O método demonstrou que a maior concentração de flavonoides está na fração ACOET (23,92 mgQE/g), seguida da fração ButOH (20,60 mgQE/g). Com exceção da fração HEX (8,23 mgQE/g) as demais frações tiveram valores significativamente semelhantes, DCM: 19,325, H<sub>2</sub>O: 19,918 todos expressos em mgQE/g, como mostra a Figura 1.

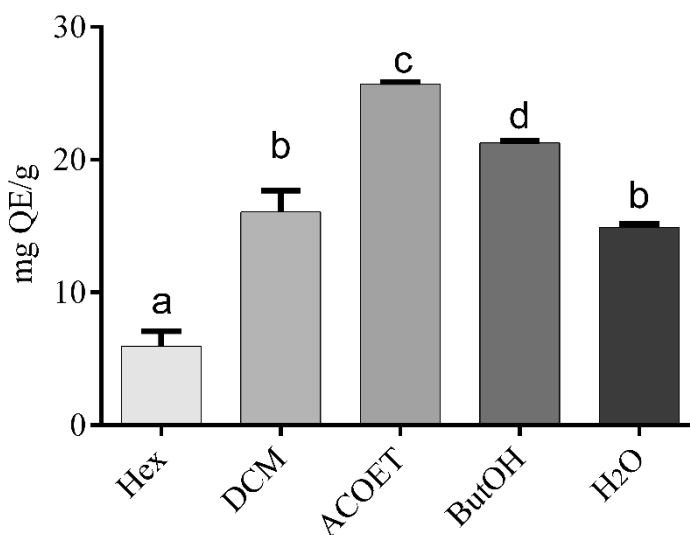


Figura 1: gráfico de determinação de flavonoides em cada partição de *B. forficata*. Frações: Hex: hexano; DCM: diclorometano; ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água residual. Análise estatística one-way ANOVA indicando que não houve diferença significativa entre as frações DCM e H<sub>2</sub>O, além de uma diferença entre elas e as frações Hex, ACOET e ButOH em relação as demais frações. Letras iguais indicam diferença não significativa.

### 3.2.2. DETERMINAÇÃO DE TANINOS CONDENSADOS (PROANTOCIANIDINAS)

Pelo método utilizado, as frações com as maiores concentrações de taninos condensados foram as frações ACOET (112,29 mgCE/g) e a fração ButOH (91,55 mgCE/g). As frações com as menores concentrações de taninos condensados foram HEX (14,60 mgCE/g) e DCM (35,11 mgCE/g). A fração H<sub>2</sub>O obteve 79,87 mgCE/g nesse método, como demonstra a Figura 2.

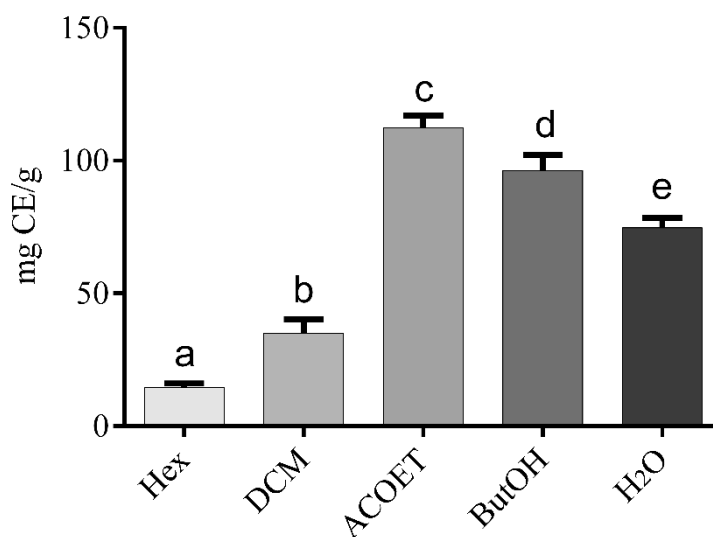


Figura 2: gráfico de determinação de taninos condensados totais em cada partição de *B. forficata*. Frações: Hex: hexano; DCM: diclorometano; ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água residual. Análise estatística one-way ANOVA indicando que houve diferença significativa entre as frações analisadas. Letras iguais indicam diferença não significativa.

### 3.2.3. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

A determinação dos fenóis totais realizados pelo método de Folin-Ciocalteu demonstrou que a fração ButOH (235,29 mgGAE/g) possui a maior concentração de compostos fenólicos, seguido da fração ACOET (196,03 mgGAE/g). As frações com as menores concentrações de fenóis são HEX (59,39 mgGAE/g) e DCM (88,90 mgGAE/g). A fração H<sub>2</sub>O obteve 161,03 mgGAE/g nesse método como demonstra a Figura 3.

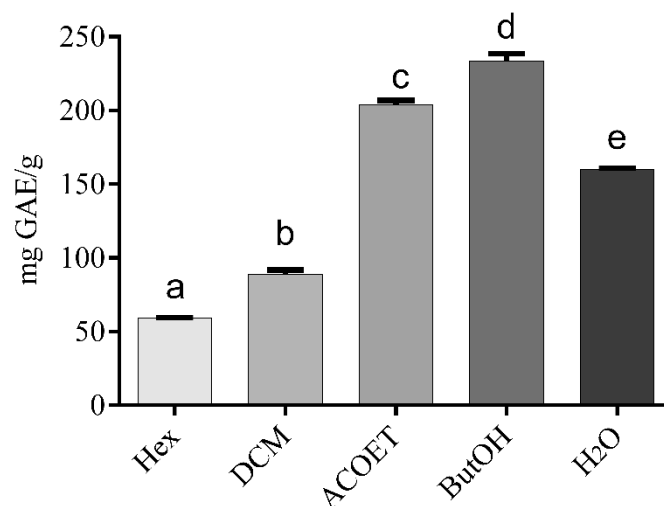


Figura 3: gráfico de determinação de fenóis totais em cada partição de *B. forficata*. Frações: Hex: hexano; DCM: diclorometano; ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água residual. Análise estatística one-way ANOVA indicando que houve diferença significativa entre as frações. Letras iguais indicam diferença não significativa.

### 3.2.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Todos os resultados compilados da prospecção fitoquímica segue na Tabela 2.

Tabela 2: Prospecção Fitoquímica das frações de *B. forficata*

Solvente	mgGAE/g	mgCE/g	mgQE/g
Hex	59,39 <sup>a</sup>	14,60 <sup>a</sup>	8,23 <sup>a</sup>
DCM	88,90 <sup>b</sup>	35,11 <sup>b</sup>	19,325 <sup>b</sup>
Acoet	196,03 <sup>c</sup>	112,29 <sup>c</sup>	23,92 <sup>c</sup>
ButOH	235,29 <sup>d</sup>	91,55 <sup>d</sup>	20,60 <sup>d</sup>
H <sub>2</sub> O	161,03 <sup>e</sup>	79,87 <sup>e</sup>	19,92 <sup>d</sup>

### 3.3. ENSAIOS ANTIOXIDANTES

#### 3.3.1. CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC)

Assim que a determinação fitoquímica foi realizada, a capacidade antioxidante das frações foi avaliada. O primeiro teste realizado foi o método de capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), onde tivemos altos valores para quase todas as fra-

ções com similaridade significativa como demonstra a Figura 4. Neste método somente a fração aquosa demonstrou valor significativamente menor que o controle ácido ascórbico (814,19  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ ). Para as demais frações tivemos os seguintes resultados, Hex: 1247,59, DCM: 1376,04, Acoet: 1294,09 e ButOH: 1233,86, todos expressos em  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ . O controle positivo Ácido Ascórbico teve o valor de 1477,43  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ .

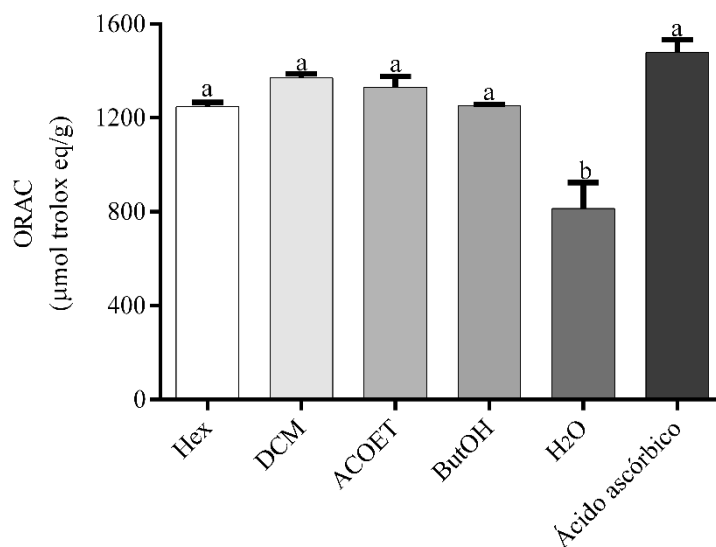


Figura 4: gráfico da atividade antioxidante no método de ORAC, em cada partição de *B. forficata*. Frações: Hex: hexano; DCM: diclorometano; ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água residual. Análise estatística one-way ANOVA indicando que não houve diferença significativa entre as frações Hex, DCM, ACOET, ButOH e o controle positivo ácido ascórbico. Letras iguais indicam dife-

### 3.3.2. POTENCIAL ANTIOXIDANTE REDUTOR FÉRRICO (FRAP)

Para o método de FRAP tivemos resultados mais contrastantes entre si, onde três frações obtiveram alta capacidade antioxidante, foram elas ButOH (1483,40  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ ), ACOET ( 1469,41  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ ) e H<sub>2</sub>O: (1202,86  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ ), e duas frações apresentaram baixos valores antioxidante, HEX: (538,63  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ ) e DCM (376,78  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ ) como demonstra a Figura 5. O controle positivo Ácido Ascórbico obteve o valor de 1677,52  $\mu\text{mol Trolox eq/L}$ .

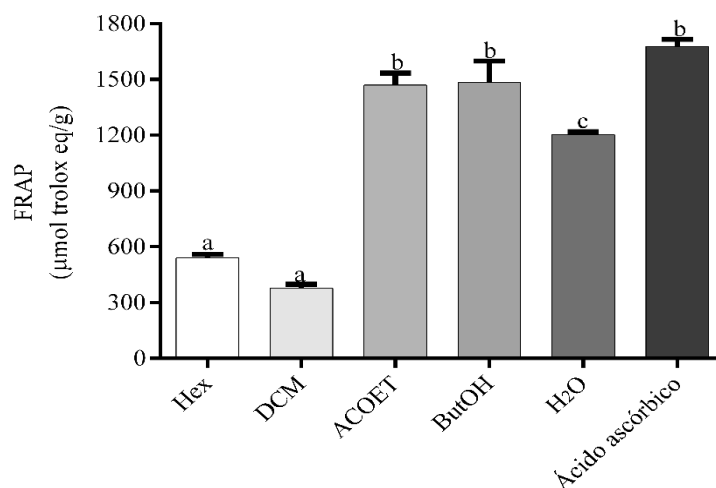


Figura 5: gráfico da atividade antioxidante no método de FRAP, em cada partição de *B. forficata*. Frações: Hex: hexano; DCM: diclorometano; ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água residual. Análise estatística one-way ANOVA indicando que não houve diferença significativa entre as frações ACOET e ButOH em relação ao controle positivo ácido ascórbico. Letras iguais indicam diferença não significativa.

### 3.3.3. MÉTODO DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Para a realização do método DPPH as frações foram diluídas serialmente em sete novas concentrações, a partir da primeira concentração de 10 mg/mL, para realizar o ensaio do IC<sub>50</sub> de cada uma.

Para este método obtivemos os seguintes resultados de IC<sub>50</sub>: HEX: 142,5 ± 20,8, DCM: 43,4 ± 5,6, ACOET: 8,5 ± 1,2, ButOH: 6,3 ± 1,1, H<sub>2</sub>O: 17,5 ± 2,0, todos expressos em μg/ml, como demonstra a Figura 6. Para o controle positivo Ácido Ascórbico foi obtido um valor de IC<sub>50</sub> de 7,6 ± 0,6 μg/ml.

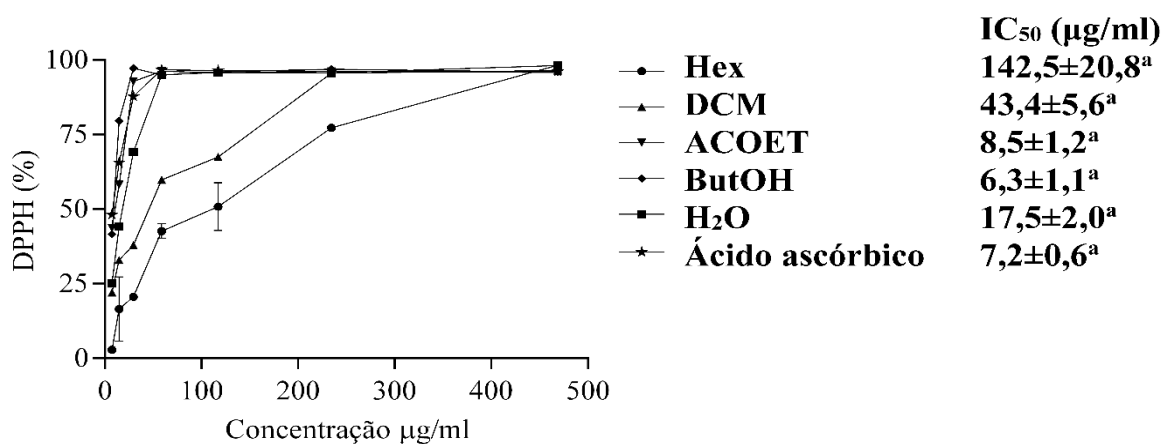


Figura 6: gráfico da atividade antioxidante no método de DPPH, em cada partição de *B. forficata*. Frações: Hex: hexano; DCM: diclorometano; ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água residual. Análise estatística da curva não linear (Hiperbola) indicando que não houve diferença significativa entre as frações com o controle positivo ácido ascórbico. Valores expressos como média ± erro.

### 3.4. DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

Para a determinação enzimática as frações foram diluídas serialmente em sete concentrações a partir da primeira concentração de 10 mg/mL para poder ser realizado a análise de IC<sub>50</sub> de cada fração.

#### 3.4.1. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -AMILASE

Na inibição da  $\alpha$ -amilase foram obtidos os seguintes IC<sub>50</sub>'s: HEX: 3,1±1,1, DCM: esta fração não foi capaz de promover a inibição, ACOET: 0,4±0,1, ButOH: 0,13±0,02, H<sub>2</sub>O: 0,4±0,1 todos expressos em µg/ml como demonstra a Figura 7. Para o controle positivo Acarbose foi obtido o seguinte IC<sub>50</sub>: 0,02±0,002 µg/ml.

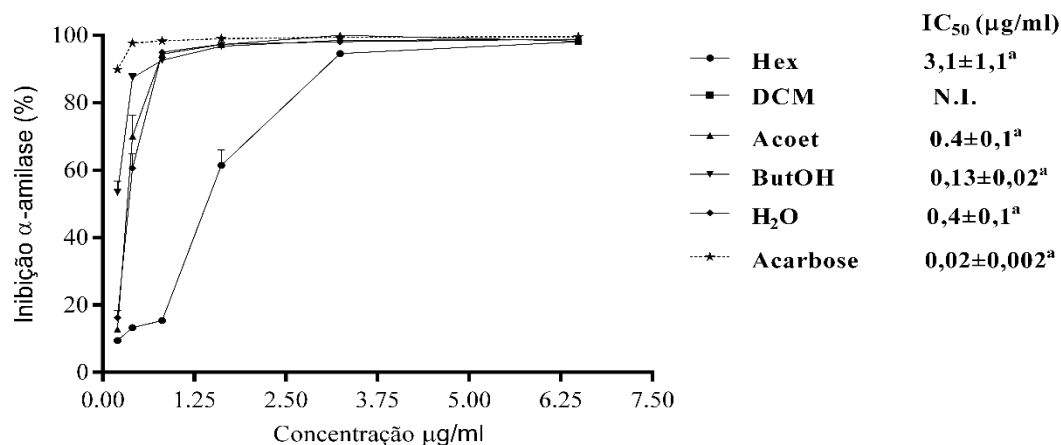


Figura 7: gráfico da atividade inibitória sobre a enzima  $\alpha$ -amilase, em cada partição de *B. forficata*. Frações: Hex: hexano; DCM: diclorometano; ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água residual. Análise estatística da curva não linear (Hiperbola) indicando que não houve diferença significativa entre as frações com o controle positivo acarbose. Valores expressos como média ± erro. Letras iguais indicam diferença não significativa.

#### 3.4.2. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -GLICOSIDASE

Na inibição da  $\alpha$ -glicosidase foram obtidos os seguintes IC<sub>50</sub>'s: ACOET: 8,2±3,3, ButOH: 17,1±6,1 todos expressos em µg/ml como demonstra a Figura 8. As

frações Hex, DCM e H<sub>2</sub>O não demonstraram atividade neste ensaio. Para o controle positivo Acarbose foi obtido o seguinte IC<sub>50</sub>: 7,1±1,4 µg/ml.

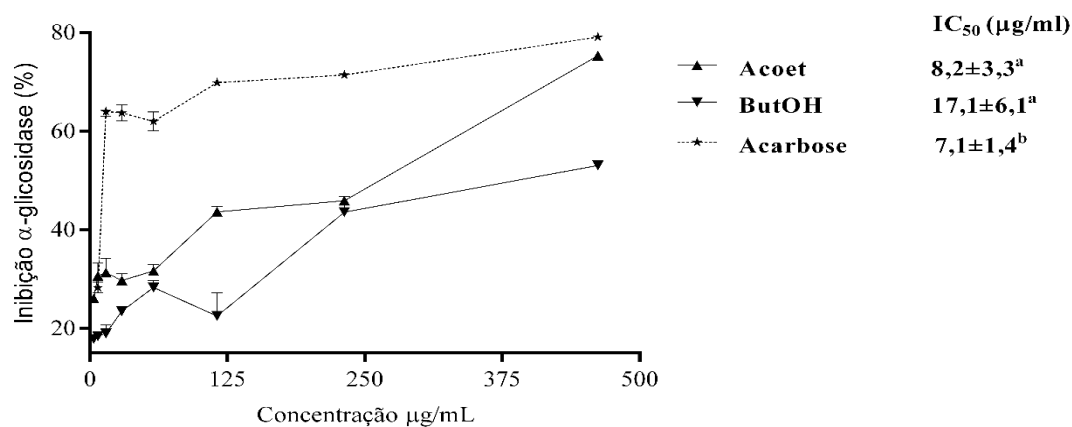


Figura 8: gráfico da inibitória sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase, em cada partição de *B. forficata*. Frações: ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol. Análise estatística da curva não linear (Hiperbola) indicando que não houve diferença significativa entre as frações que tiveram atividade com o controle positivo acarbose. Valores expressos como média  $\pm$  erro. Letras iguais indicam diferença não significativa.

### 3.4.3. TIPOS DE INIBIÇÃO

Para esclarecer o tipo de inibição exercido pelas partições sobre as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, as plotagens dos dados foram feitas utilizando Lineweaver-Burk para as partições que apresentaram melhores valores de inibição das mesmas. Com ambas foram utilizadas as partições ACOET e ButOH, em três concentrações cada uma. Para a  $\alpha$ -amilase, a partição de ACOET houve um decréscimo no valor de V<sub>máx</sub>, enquanto o valor de K<sub>m</sub> se manteve constante. Esse resultado indica que os compostos presentes nessa partição exibem predominantemente um modo de inibição não-competitivo. Para a partição de ButOH houve um decréscimo tanto no V<sub>máx</sub> quanto no K<sub>m</sub>. Esse resultado indica que os compostos presentes nessa partição exibem predominantemente um modo de inibição incompetitivo. Para a  $\alpha$ -glicosidase, a partição de ACOET houve um decréscimo na V<sub>máx</sub>, enquanto o valor de K<sub>m</sub> se manteve constante. Esse resultado indica que os compostos presentes nessa partição exibem predominantemente um modo de inibição não-competitivo. Para a partição de ButOH houve decréscimo na V<sub>máx</sub> e o valor de K<sub>m</sub> aumentou. Esse resultado indica que os compostos presentes nessa partição exibem predominantemente um modo de inibição mista. Esses resultados estão expressos na Figura 9.

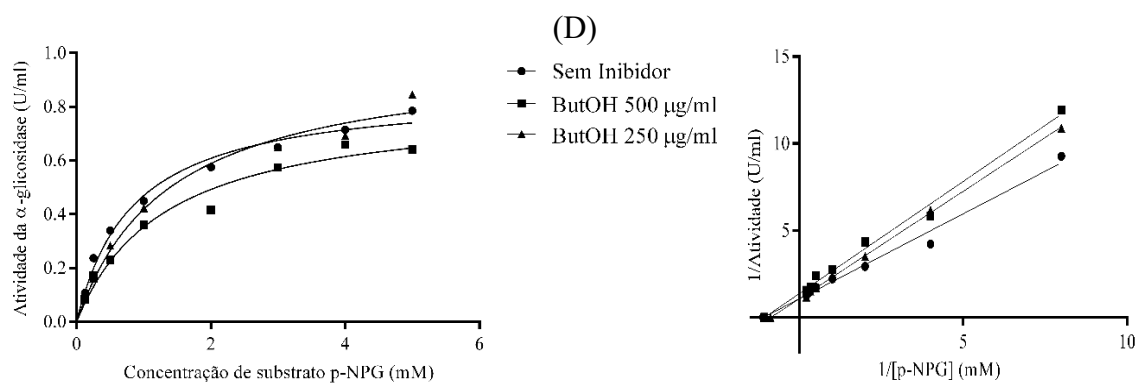
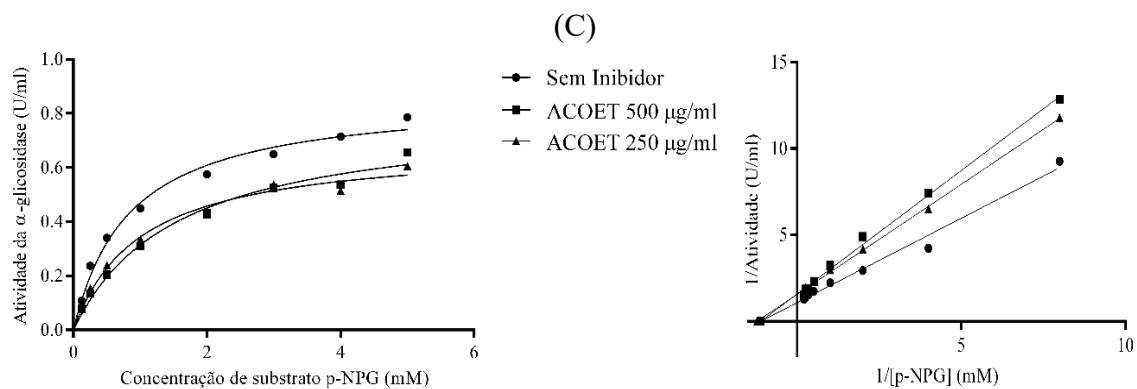
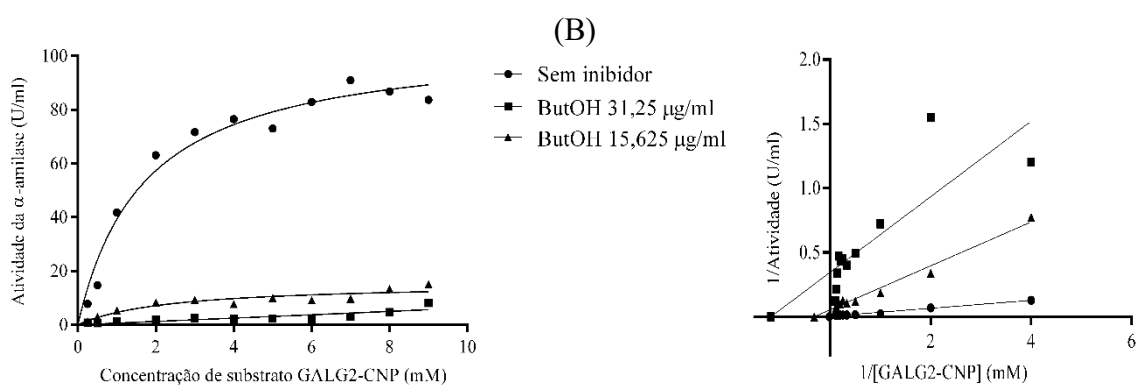
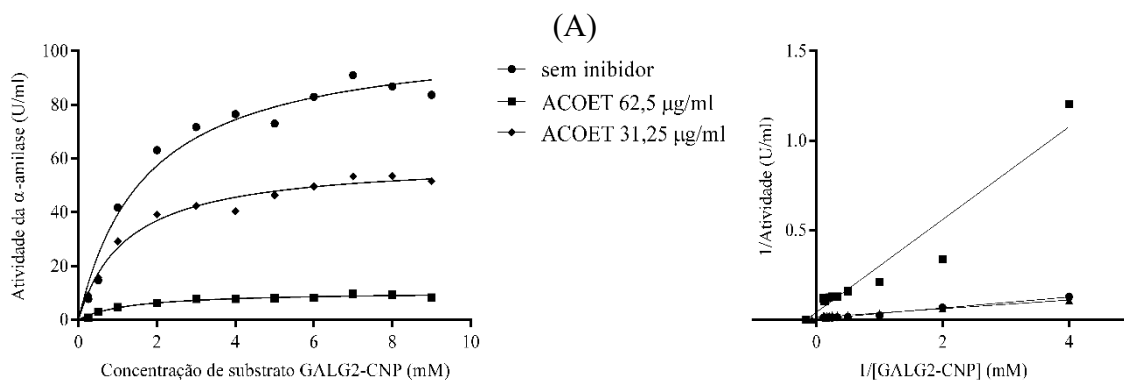




Figura 9: (A) Curva cinética da atividade inibitória sobre a enzima  $\alpha$ -amilase pela fração ACOET nas concentrações 62,5 e 31,25  $\mu\text{g/ml}$  e seu gráfico recíproco ( $1/[\text{Atividade}]$  por  $1/[\text{Substrato}]$ ), indicado o tipo de inibição não-competitivo. (B) Curva cinética da atividade inibitória sobre a enzima  $\alpha$ -amilase pela fração ButOH nas concentrações 31,25 e 15,625  $\mu\text{g/ml}$  e seu gráfico recíproco, indicando o tipo de inibição incompetitivo. (C) Curva cinética da atividade inibitória sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase pela fração ACOET nas concentrações 500 e 250  $\mu\text{g/ml}$  e seu gráfico recíproco, indicando a inibição não-competitiva. (D) Curva cinética da atividade inibitória sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase pela fração ACOET nas concentrações 500 e 250  $\mu\text{g/ml}$  e seu gráfico recíproco, indicando o tipo de inibição mista.

### 3.4.4. INIBIÇÃO DA ENZIMA LIPASE PANCREÁTICA

Na inibição da lipase pancreática foram obtidos os seguintes  $\text{IC}_{50}$ 's: HEX:  $352,9 \pm 62,3$ , DCM:  $296,7 \pm 66,4$ , ACOET:  $185,2 \pm 37,8$ , ButOH:  $26,7 \pm 7,8$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ :  $18,6 \pm 1$ . Para o controle positivo Orlistat foi obtido o seguinte  $\text{IC}_{50}$ :  $2,4 \pm 0,50$ , como demonstrado pela Figura 10.

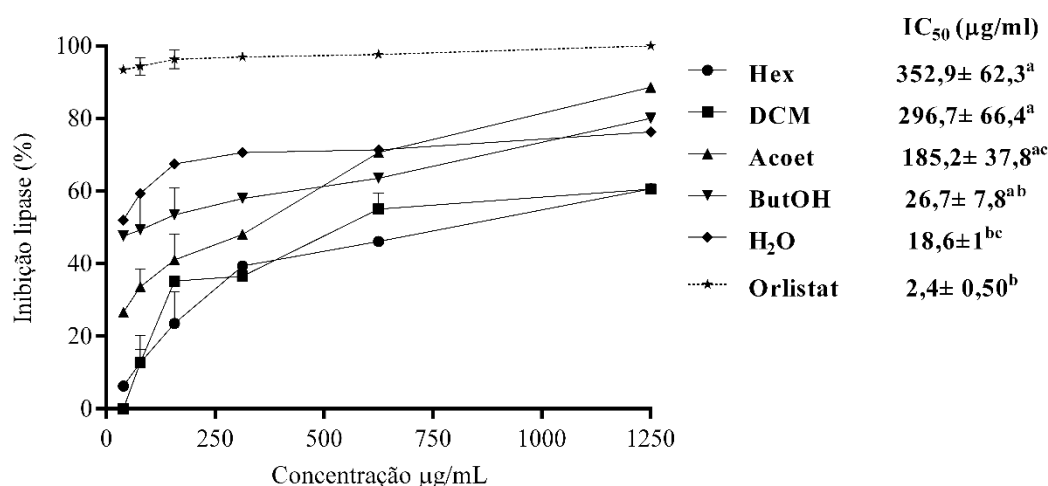


Figura 10: gráfico da inibitória sobre a enzima lipase, em cada partição de *B. forficata*. Frações: Hex: hexano; DCM: diclorometano; ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol;  $\text{H}_2\text{O}$ : água residual. Análise estatística da curva não linear (Hiperbola) indicando a diferença significativa entre as frações e o controle positivo Orlistat. Valores expressos como média  $\pm$  erro. Letras iguais indicam diferença não

### 3.5. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (CAPACIDADE ANTIGLICANTE)

Nos métodos a seguir de antiglicação as frações foram diluídas serialmente em sete concentrações a partir da primeira concentração de 10  $\text{mg/mL}$ .

### 3.5.1. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO BSA (ALBUMINA SÉRICA BOVINA) /FRUTOSE

No método de BSA/Frutose foi obtido os seguintes resultados: HEX:  $29,1 \pm 6,3$ , DCM:  $20,8 \pm 3,5$ , ACOET:  $8,6 \pm 2,5$ , ButOH:  $16,7 \pm 5,7$ , H<sub>2</sub>O:  $14,38 \pm 3,8$ . Para o controle positivo quercetina obteve a concentração de IC<sub>50</sub> de  $8,5 \pm 1,2$ . Todos os valores expressos em  $\mu\text{g/ml}$ .

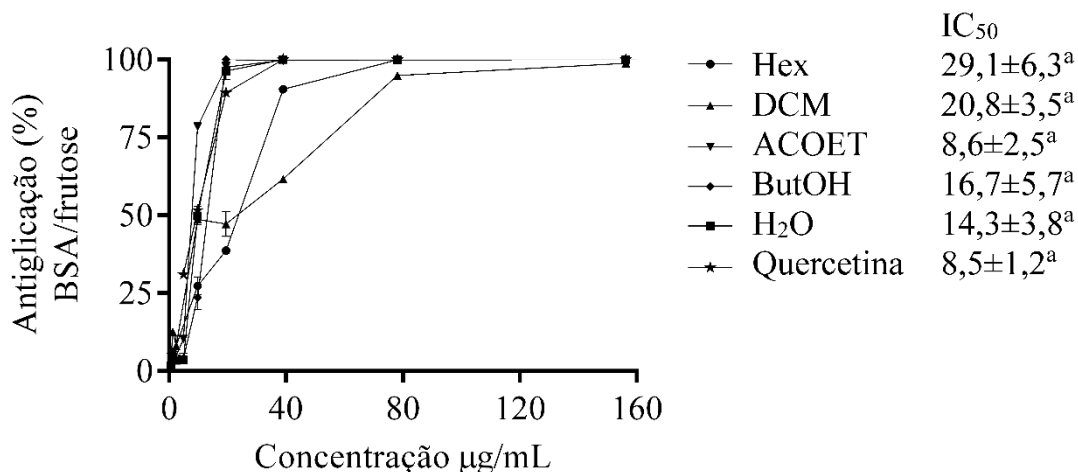


Figura 11: Antiglicação pelo método de BSA/Frutose das frações de *B. forficata*. Frações: Hex: hexano; DCM: diclorometano; ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água residual. Análise estatística da curva não linear (Hiperbola) indicando que não houve diferença significativa entre as frações e o controle positivo quercetina. Valores expressos como média  $\pm$  erro. Letras iguais indicam diferença não

### 3.5.2. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO BSA/METILGLIOXAL

Para o método de BSA/Metilglioxal os resultados foram: HEX:  $452,57 \pm 171,5$ , DCM:  $191,86 \pm 12,77$ , ACOET:  $271,8 \pm 69,01$ , ButOH:  $1155 \pm 396,5$ , H<sub>2</sub>O: não foi capaz de promover a inibição de formação de AGEs. Para a quercetina como controle positivo nesse método obteve o valor de IC<sub>50</sub> de  $38,13 \pm 5,640$ . Todos os valores expressos em  $\mu\text{g/ml}$ .

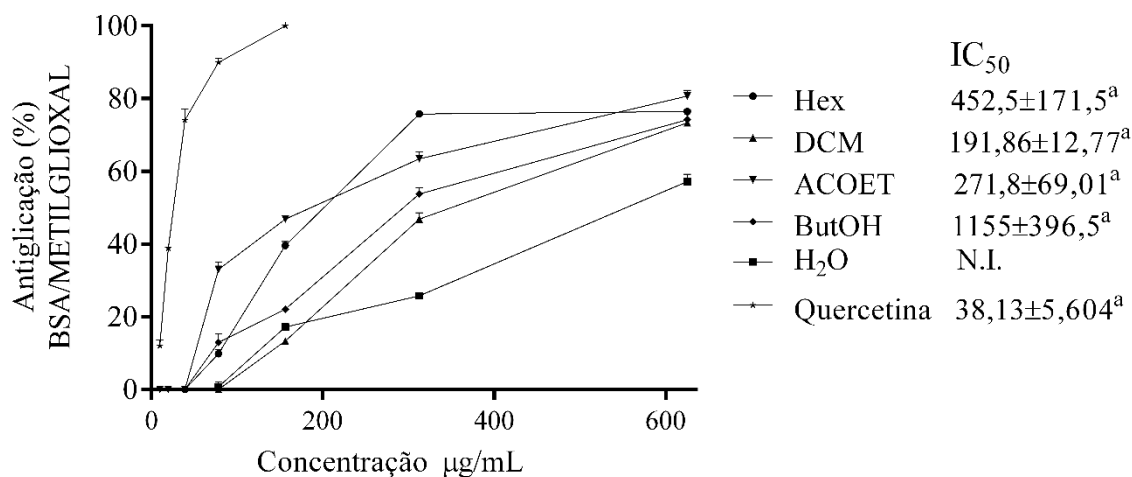


Figura 12: Antiglicação pelo método de BSA/Metilgloxal das frações de *B. forficata*. Frações: Hex: hexano; DCM: diclorometano; ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água residual. Análise estatística da curva não linear (Hiperbola) indicando que não houve diferença significativa entre as frações e o controle positivo quercetina. Valores expressos como média ± erro. Letras iguais indicam diferença não significativa.

### 3.5.3. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO ARGININA/ METILGLOXAL

Já no método Arginina/Metilgloxal obteve-se os seguintes resultados: HEX: 389,3±99,43, DCM: 927,0±468,3, ACOET: 305,9±68,06, ButOH: 373,7±88,8, H<sub>2</sub>O: esta fração não foi capaz de promover atividade antiglicante. A quercetina como controle positivo obteve o valor de IC<sub>50</sub> de 18,77±1,205. Todos os valores expressos em µg/ml.

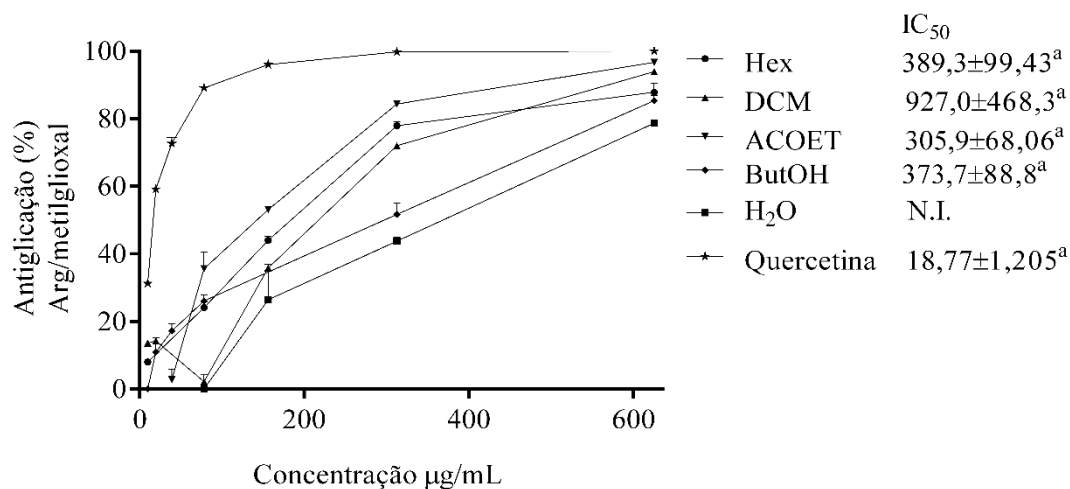


Figura 13: Antiglicação pelo método de Arginina/Metilglicoxal das frações de *B. forficata*. Frações: Hex: hexano; DCM: diclorometano; ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água residual. Análise estatística da curva não linear (Hiperbola) indicando que não houve diferença significativa entre as frações e o controle positivo quercetina. Valores expressos como média ± erro. Letras iguais indicam diferença não significativa.

### 3.6. CITOTOXICIDADE DAS PARTIÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DE *B. forficata* PELO MÉTODO DE HEMÓLISE

O método de hemólise utilizado obteve como resultados os valores observados na Tabela 3 e na Figura 14:

Tabela 3: Valores da porcentagem de hemólise de cada fração de *B. forficata*. Nota: \*\* Hemólise na [ ] de

Amostra	** 500 µg/mL (%)	** 250 µg/mL (%)	** 125 µg/mL (%)
Hex	9,99	7,02	8,44
DCM	16,01	8,66	8,34
Acoet	13,84	7,06	4,82
ButOH	3,82	2,7	2,46
H <sub>2</sub> O	2,13	2,28	2,81
Saponina	----	----	95

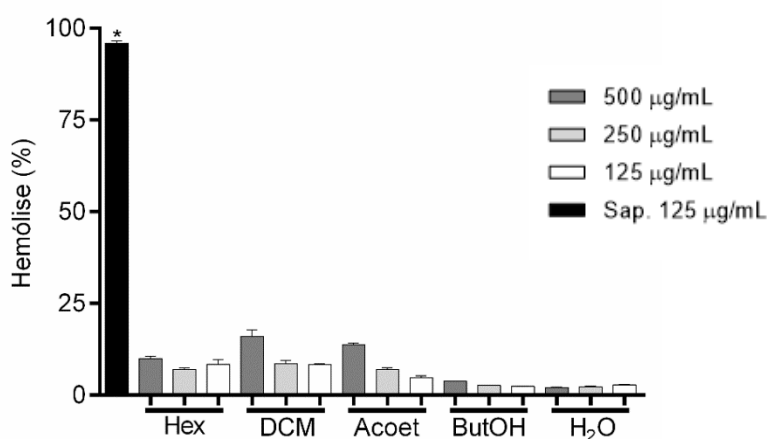


Figura 14: Capacidade hemolítica das frações de *B. forficata* em comparação ao controle positivo Saponina. Frações: Hex: hexano; DCM: diclorometano; ACOET: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água residual. Análise estatística two-way ANOVA

### 3.7. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA - ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

Com base nas análises das frações de *B. forficata*, foram feitas análises espectrométricas para as duas melhores partições de *B. forficata*, ACOET e ButOH, os resultados são apresentados nas tabelas 2 e 3. Foram identificadas 25 moléculas na partição Acoet, são elas: ácido quínico, ácido protocatecuico 3-hexosídeo, ácido protocatecuico, (epi) catequina hexosídeo, Apigenina, Kaempferol 3-O-(4-O-p-coumail)-glicosídeo, procianidina C1, ácido gálico, miricitina-3-O-(2-O-galoil)-glicosídeo, procianidina B2, Isorhamnetina-3-O-glicosídeo, galoil-quercetina hexosídeo, miricitina-3-O- $\alpha$ -arabino piranosídeo, quercetina-O-hexosídeo, ácido elágico pentosídeo, quercetina-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopiranosídeo, quercetina, gliciridina, liquiritina, kaempferol-3-rhamnosídeo, (+)-catequina, aurantio-obtusina, luteolina-7-O-rutinosídeo, miricitina-3-O- $\beta$ -D-galacto piranosídeo. Por outro lado, foram identificadas 15 moléculas na partição ButOH, são elas: galoil-hexosídeo, ácido gálico, ácido quínico, ácido protocatecuico 3-hexosídeo, kaempferol-7-O-glicosídeo, kaempferol-7-O-glicosídeo, kaempferol-3,7-dirhamnosídeo (kaempferitrina), (+)- catequina, (epi) catequina hexosídeo, isorhamnetina-3-O-glicosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo-7-O-rhamnosídeo, miricitina-3-O-hexosídeo, luteolina di-O-glicosídeo, miricitina-3-O- $\alpha$ -arabinopentosídeo, isoquercetina e liquiritina.

Tabela 4: Compostos identificados na partição de acetato de etila (ACOET) presentes no extrato etanólico bruto de *B. forficata* por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo)

Compostos identificados	Tempo de retenção (min)	Massa molecular exata	Massa calculada para [M-H] <sup>-</sup>	m/z de [M-H] <sup>-</sup>	Erro (ppm)	m/z para os fragmentos de [M-H] <sup>-</sup>	Referencia
Ácido gálico	0,927	170,02	169,0131	169,014	5,32	167,153,130, 125, 108	(DEL BUB-BA et al., 2012)
Ácido quínico	0,977	192,06	191,0172	191,017	2,61	171, 154, 136, 126.	(GOUVEIA; CASTILHO,

						106	2010)
Kaempferol 3-O-(4-O-p- coumaroil) - glicosídeo	1,413	594,14	593,13 07	593,1 30	1,18	447, 279, 257, 232, 182	(IBRAHIM et al., 2015)
Ácido pro- tocatecuico	2,034	154,03	153,01 75	153,0 17	1,96	124 ,109, 148, 116, 120, 105	(VALL- VERDÚ- QUERALT et al., 2010)
Ácido pro- tocatecuico 3-hexosídeo	2,135	316,08	315,10 76	315,1 07	1,26	307, 267, 209, 169, 183	(CHEN; IN- BARAJ; CHEN, 2012)
Luteolina-7- O- rutinosídeo	2,620	594,16	593,13 04	593,1 30	0,67	501, 435, 385, 285, 182	(CHEN; IN- BARAJ; CHEN, 2012)
(+)- Catequina	5,136	290,08	289,07 26	289,0 70	6,22	282, 244, 227, 217, 161	(JUSTINO et al., 2018)
Apigenina	5,404	270,05	269,06 61	269,0 65	2,22	219, 203, 191, 172, 149	(FALCÃO et al., 2010)
Ácido p- coumarico	5,673	164,05	163,03 87	163,0 38	1,22	119, 150	(DEL BUB- BA et al., 2012)
(Epi)catechi na hexosí- deo	5,823	452,13	451,12 25	451,1 22	0,44	374, 325, 245, 221, 167	(DEL BUB- BA et al., 2012)
Miricetina- 3-O-(2-O- galoil) glicosídeo	6,025	632,10	631,09 33	631,0 93	0,95	559, 479, 416, 316, 253	(NEGRI et al., 2013)

Procianidina B2	6,176	578,14	577,13 42	577,1 34	0,34	519, 400, 245, 222, 125	(ZHANG, 2010)
Procianidina C1	6,343	866,21	865,19 84	865,1 97	1,15	721, 695, 407, 289, 217	(JUSTINO et al., 2018)
Miricetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo	6,478	480,09	479,08 36	479,0 83	0,62	460, 361, 340, 271, 221	(SALDANA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
Miricetina-3-O-α-arabopiranosídeo	6,562	450,08	449,07 28	449,0 72	0,22	316, 271, 212, 151, 107	(SALDANA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
Galoil-quercetina hexosídeo	6,612	616,11	615,09 99	615,1 00	0,16	556, 463, 368, 316, 260	(DA SILVA et al., 2014)
Ácido elálgico pentosídeo	7,098	434,05	433,07 74	433,0 77	0,69	300, 151	(DEL BUBBA et al., 2012)
Quercetina-O-hexosídeo	7,316	464,10	463,08 87	463,0 88	0,21	364, 316, 271, 243, 151	(YE et al., 2012)
Quercetina-3-O-α-L-rhamnopiranosídeo	7,400	448,10	447,09 36	447,0 93	0,67	445, 351, 271, 151	(SANTOS; FORTUNATO; SPOTORNO, 2018)
Liquiritina	7,668	418,13	417,08 17	417,0 81	0,23	355, 255, 186, 108	(SIMIRGIOTIS et al.,

							2015)
Isorhamnetina-3-O-glicosídeo	7,685	478,11	477,1063	477,106	0,41	432, 380, 300, 201, 156	(IBRAHIM et al., 2015)
Kaempferol-3-rhamnosídeo	8,087	432,10	431,0991	431,098	2,31	393, 373, 285, 227, 177	(SANTOS; FORTUNATO; SPOTORNO, 2018)
Quercetina	8,205	302,04	301,0340	301,034	0,33	279, 199, 151, 107	(SUN et al., 2007)
Aurantio-obtusina	9,328	330,07	329,0674	329,067	0,30	304, 299, 239, 199, 125	(GOUVEIA; CASTILHO, 2010)
Gliricidina	9,680	300,06	299,0194	299,018	2,67	282, 216, 200, 154, 117	(YE et al., 2012)

Nota: compostos identificados entre 20, 25 e 30 eV

Tabela 5: Compostos identificados na partição de n-Butanol (ButOH) presentes no extrato etanólico bruto de *B. forficata* por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo)

Compostos identificados	Tempo de retenção (min)	Massa molecular exata	Massa calculada para [M-H] <sup>-</sup>	m/z de [M-H] <sup>-</sup>	Erro (ppm)	m/z para os fragmentos de [M-H] <sup>-</sup>	Referencia
Galoil hexosídeo	1,077	332,07	331,0655	331,0653	0,60	271, 227, 181, 169, 125	(DA SILVA et al., 2014)
Ácido gálico	1,161	170,02	169,0142	169,0143	0,59	147, 139,	(DEL BUBBA et al.,



						113, 106, 125	2012)
Ácido quínico	1,429	192,06	191,05 00	191,05 04	2,09	186, 172, 148, 106	(GOUVEIA; CASTILHO, 2010)
Ácido proto- catecuico 3- hexosídeo	1,613	316,08	315,06 67	315,06 69	0,63	229, 169, 153, 125, 108	(CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012)
Kaempferol-7- O-glicosídeo	2,821	448,10	447,11 71	447,11 73	0,67	319, 285, 250, 227, 208	(IBRAHIM et al., 2015)
Kaempferol - 3,7 – dirham- nosídeo (ka- empferitrina)	4,665	578,16	577,11 84	577,11 88	0,69	554, 534, 489, 431, 243	(SANTOS; FORTU- NATO; SPOTOR- NO, 2018)
(+)-Catequina	5,185	290,08	289,06 76	289,06 89	4,49	270, 248, 205, 179, 153	(YE et al., 2012)
(Epi) catequi- na hexosídeo	5,772	452,13	451,20 16	451,20 10	1,32	289, 241, 201, 143, 107	(DEL BU- BBA et al., 2012)
Isorhamneti- na-3-O- glicosídeo	6,124	478,11	477,10 31	477,10 31	1,25	383, 344, 243, 217, 169	(IBRAHIM et al., 2015)
Quercetina-3- O-rutinosídeo-	6,259	756,21	755,20 21	755,20 10	1,45	300, 201, 125	(FERRE- RES et al.,

7-O-rhamnosídeo							2012)
Miricetina-3-O-hexosídeo	6,393	480,09	479,08 21	479,08 22	0,20	397, 316, 243, 178, 150	(FERRE- RES et al., 2012)
Luteolina di-O-glicosídeo	6,443	610,14	609,15 52	609,14 61	1,47	449, 391, 300, 137	(IBRAHIM et al., 2015)
Miricetina-3-O- $\alpha$ -arabinopentósídeo	6,527	450,08	449,07 12	449,07 14	0,44	405, 316, 271, 186	(SOBEH et al., 2016)
Isoquercetina	6,661	464,10	463,08 73	463,08 75	0,43	316, 271, 151	(IBRAHIM et al., 2015)
Liquiritina	7,918	418,13	417,08 18	417,08 18	0	400, 255, 220, 139	(SIMIRGI- OTIS et al., 2015)

Nota: compostos identificados entre 20, 25 e 30 eV

#### 4. DISCUSSÃO

O estudo de plantas medicinais é de extrema importância tanto no âmbito social, quanto no econômico, uma vez que elas auxiliam na qualidade de vida de diversas comunidades de baixa renda, devido sua alta disponibilidade, poucos efeitos colaterais, baixa citotoxicidade e baixo custo, uma vez que muitos indivíduos não possuem condições financeiras para obter fármacos importantes para seu tratamento, fazendo-se então uso das plantas medicinais como tratamento complementar para suas enfermidades (BESSA et al., 2013).

Adicionalmente, a prospecção fitoquímica é de grande relevância, principalmente quando não existem estudos químicos das espécies interesse e relevância popular (BESSA et al., 2013). Para tal o trabalho aborda a prospecção de algumas classes de

compostos polifenólicos, flavonoides e taninos condensados, para melhor caracterização do conteúdo da *B. forficata*.

Já é de conhecimento científico a atividade dos flavonoides como antioxidantes, auxiliando na neutralização de radicais livres gerados pelo organismo, além disso anti-inflamatórias e possuem outras atividades, como: ação antibacteriana, antifúngica, anti-protozoária, na reparação de tecidos, regulação enzimática, estimulação das células fagocíticas e ação antitumoral (MUSCHIETTI; MARTINO, 2007; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). Compostos fenólicos possuem atividade antioxidante já bem descrita pela literatura, principalmente em endocrinopatias, como o próprio *Diabetes Mellitus* (ROCHA et al., 2011). A grande quantidade desses prováveis compostos que sua identificação foi sugerida nas frações, principalmente nas mais polares, podem dar indício da atividade antioxidante pela qual *B. forficata* já é conhecida popularmente no auxílio do tratamento do DMT2, além de possíveis novas aplicações, considerando que a literatura já indica os compostos dessas classes em diversas outras atividades, como por exemplo a atividade anti-inflamatória (DE SOUSA et al., 2004; SIMÕES; ALMEIDA, 2015).

Diversos compostos naturais são capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio, entre alguns desses compostos estão os flavonoides, que podem ser descritos por seu sinergismo com outros compostos antioxidantes como a vitamina C (SIMÕES; ALMEIDA, 2015). Alguns flavonoides possuem a capacidade de se ligarem a íons metálicos, que muitas vezes podem ser os catalizadores na produção de radicais, e essa capacidade é o resultado de um conjunto de propriedades desses compostos, tais como a atividade quelante de ferro e estimulação de enzimas com atividade antioxidante como a catalase e a superóxido-dismutase (SIMÕES; ALMEIDA, 2015). Dito isso, podemos atribuir a alta capacidade antioxidante das frações a esse conjunto de atividades que esses flavonoides em abundância proporcionam. Estudos já demonstram que o indivíduo diabético sofre ainda mais com o estresse oxidativo, uma vez que esses radicais livres podem elevar a diminuição da produção ou o aumento da destruição dessas enzimas catalase e superóxido-dismutase e a variação dos níveis destas enzimas pode tornar o tecido mais suscetível ao estresse oxidativo (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016).

Quando se trata de controlar o *Diabetes Mellitus* do tipo 2, várias abordagens farmacologias são utilizadas, como a estimulação da liberação da insulina, o aumento no número de transportadores de glicose, a inibição da gliconeogênese e a redução da ab-

sorção de glicose no intestino. Tal regulação pode ocorrer com agentes que inibem a absorção da glicose, inibindo a  $\alpha$ -glicosidase e a  $\alpha$ -amilase diminuindo assim a disponibilidade de glicose no organismo (THILAGAM et al., 2013). Existem tais inibidores comerciais como a arcabose, Miglitol e a Voglibose, porém o número de estudos utilizando plantas com potencial de inibir essas enzimas tem aumentado, como é o caso de *B. forficata*, que demonstrou capacidade de inibir tais enzimas devido a sua grande quantidade de polifenóis que, por sua vez, possuem grande capacidade de inibição das enzimas  $\alpha$ -glicosidase e a  $\alpha$ -amilase (DE SOUSA et al., 2004). Outra abordagem benéfica para o diabético é o controle da hiperglicemia pós-prandial, que pode ser feita reduzindo a quantidade de carboidratos absorvidos pelo intestino delgado. Alguns polifenóis possuem a capacidade de inibir a enzima lipase pancreática, que gera consequentemente a absorção reduzida de ácidos graxos, pois ela tem a capacidade de metabolizar os triacilgliceróis da dieta em ácidos graxos menores, que poderão ser utilizados para a produção de corpos cetônicos, por isso sua inibição é algo buscado nas pesquisas para o controle da hiperlipidemia (BELLAMAKONDI; GODAVARTHI; IBRAHIM, 2014; BIRARI; BHUTANI, 2007). Como já descrito em FRANCO et al., (2018), o extrato bruto da *B. forficata* possui propriedades de inibição das enzimas  $\alpha$ -glicosidase, a  $\alpha$ -amilase e lipase pancreática, as frações de *B. forficata* também demonstraram atividade inibitória sobre as enzimas destacando os efeitos das frações acetato de etila e n-butanol, que promoveram uma inibição superior ao extrato bruto, sugerindo o potencial fitoterápico das folhas da planta em auxiliar no tratamento da hiperlipidemia pós-prandial, e auxiliando na melhora da ação da insulina (ALMEIDA et al., 2009).

Os AGEs constituem uma grande variedade de substâncias formadas a partir de interações amino carbonilo, de natureza não-enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (MONNIER, 2003). Os mecanismos alternativos de formação de AGEs incluem a chamada via do estresse carbonílico, na qual a oxidação de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos. A glicólise e a autooxidação da glicose, por exemplo, produzem metilglioxal e glioxal, que interagem com aminoácidos para formar AGEs. Estes compostos dicarbonílicos chegam a ser 20 mil vezes mais reativos do que a glicose e são os principais intermediários da formação de AGEs (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008). Esses fatos são o que levam a busca de compostos com atividade anti-

glicante e de fonte barata com alta disponibilidade. FRANCO et al., (2018) já havia demonstrado alta taxa de antiglicação proveniente do extrato etanólico de *B. forficata*, suas frações também obtiveram bons valores, destacando as taxas antiglicantes das frações acetato de etila e n-butanol nos três métodos propostos, que apesar de não serem superiores ao inibidor comercial, consegue reproduzir dados importantes para o destaque fitoterápico das folhas.

Todas as frações de *B. forficata* apresentaram baixa taxa hemolítica, aproximadamente 16% de hemólise para a concentração de 500 µg/mL para a fração diclorometano, indicando a baixa citotoxicidade da planta. Diferente do controle positivo, saponina, que obteve quase 95% de hemólise, pois o grupo dos compostos saponósidos possuem a capacidade de alterar a configuração da membrana dos glóbulos vermelhos, promovendo assim a hemólise (CASTEJON, 2011).

Entre as frações de *B. forficata*, aquelas que se destacaram mais nos métodos propostos foram a fração acetato de etila e a fração n-butanol. Ao fazer-se as análises cromatográficas foi observado a presença de determinadas moléculas, como alguns derivados de quercetina, a luteolina-7-O-rutinosídeo, luteolina di-O-glicosídeo, o kaempferol-3,7-dirhamnosídeo, conhecido como kaempferitrina e é um importante marcador fitoquímico da *B. forficata*, que é estudado por diversos efeitos, como seu potente efeito insulinoimético, além de propriedades imunológicas e como anticonvulsivante (DE SOUSA et al., 2004; GONZÁLEZ-TRUJANO et al., 2017; HÄMÄLÄINEN et al., 2007; JORGE et al., 2004). Estudos anteriores demonstraram que a Luteolina e seus derivados são excelentes inibidores da enzima  $\alpha$ -amilase, superando até o inibidor comercial acarbose, além de terem uma boa inibição para  $\alpha$ -glicosidase (KIM; KWON; SON, 2000).

Os modos de inibição apresentados pelas partições ACOET e ButOH, são tipo de inibição predominantes em enzimas que possuem mais de um substrato. O inibidor não-competitivo é aquele que se liga tanto no complexo ES (Enzima + Substrato), quanto somente na enzima, já o inibidor incompetitivo liga-se em um sítio distinto do sítio ativo do substrato no complexo ES. E o inibidor misto também se liga a um sítio ativo distinto do usado pelo substrato no complexo ES, porém também tem a capacidade de se ligar somente à enzima, característica de inibidores competitivos (NELSON et al., 2014). Estudando esses modos de inibição podemos compreender melhor a forma como

os compostos da *B. forficata* agem sobre essas enzimas, podendo gerar novas perspectivas de como se utilizar os compostos para neutralizar tais catalizadores.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados que foram obtidos demonstram o efeito fitoterápico das folhas de *B. forficata*, de todas as partições avaliadas, as partições de acetato de etila e n-butanol foram as que apresentaram melhores atividades na maioria dos métodos propostos. Das demais partições algumas delas obtiveram bons resultados em alguns testes isolados como por exemplo o bom efeito da partição H<sub>2</sub>O nos testes antioxidantes, na inibição da  $\alpha$ -amilase e da lipase pancreática, isso demonstra que pode haver moléculas nessa partição que são as responsáveis por essa atividade, que não são flavonoides em sua grande maioria. Observando as altas taxas antioxidantes, os baixos valores de IC<sub>50</sub> antiglicantes e IC<sub>50</sub> de inibição das enzimas, além da sua baixa citotoxicidade, pode-se ressaltar o potencial fitoterápico de *B. forficata*. Demais estudos são necessários para avaliar melhor o efeito cada molécula presente nas partições, definindo melhor seus mecanismos de ação e se possuem efeitos isolados ou em conjuntos, além de testes *in vivo*.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, S.; KAWAMURA, K.; TAKEMOTO, K. Oxidative damage of nuclear DNA in liver of rats exposed to psychological stress. **Cancer Research**, v. 53, n. 18, p. 4153–4155, 15 set. 1993.

ALMEIDA, J. C. DE et al. Role of dietary lipids in diabetic nephropathy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 634–645, jul. 2009.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. **Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 24, n. 5, p. 547–553, set. 2016.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. The role of advanced glycation end-products (AGEs) in the development of vascular diabetic complications. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940–950, ago. 2008.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405–412, abr. 1991.

BELLAMAKONDI, P. K.; GODAVARTHI, A.; IBRAHIM, M. Anti-hyperglycemic activity of *Caralluma umbellata* Haw. **BioImpacts : BI**, v. 4, n. 3, p. 113–116, 2014.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 15 jul. 1996.

BERG, J. M. et al. **Biochemistry**. 5th. ed. [s.l.] W H Freeman, 2015.

BESSA, N. G. F. DE et al. Preliminary phytochemical screening of native Cerrado plants of medicinal popular use by the rural community of the Vale Verde settlement - Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 692–707, 2013.

BIRARI, R. B.; BHUTANI, K. K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 19–20, p. 879–889, out. 2007.

BRAZIL (ED.). **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. 1a. ed ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.

CASTEJON, F. V. **Taninos e saponinas**, 2011.

CHEN, H.-J.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B.-H. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 260–285, 2012.

DA SILVA, N. A. et al. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5072–5084, 4 jun. 2014.

DE SOUSA, E. et al. 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. 829–832, maio 2004.

DE SOUZA, B. V. C. et al. *Bauhinia forficata* in the treatment of diabetes mellitus: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 28, n. 2, p. 129–138, fev. 2018.

DEL BUBBA, M. et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of polyphenolic composition of four cultivars of *Fragaria vesca* L. berries and their comparative evaluation. **Journal of mass spectrometry: JMS**, v. 47, n. 9, p. 1207–1220, set. 2012.

EVANS, B. C. et al. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 73, p. e50166, 9 mar. 2013.

FALCÃO, S. I. et al. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 2, p. 887–897, jan. 2010.



FERRERES, F. et al. Bauhinia forficata Link authenticity using flavonoids profile: relation with their biological properties. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 894–904, 15 set. 2012.

FORZZA, R. C.; JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO (EDS.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro : Andrea Jakobsson Estúdio, 2010.

FRANCO, R. R. et al. 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, 6 abr. 2018.

GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E. et al. Justicia spicigera Schltdl. and kaempferitrin as potential anticonvulsant natural products. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 240–248, 1 ago. 2017.

GOUVEIA, S. C.; CASTILHO, P. C. Characterization of phenolic compounds in Helichrysum melaleucum by high-performance liquid chromatography with on-line ultraviolet and mass spectrometry detection. **Rapid communications in mass spectrometry: RCM**, v. 24, n. 13, p. 1851–1868, 15 jul. 2010.

HÄMÄLÄINEN, M. et al. **Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF- $\kappa$ B Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF- $\kappa$ B Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2007/045673/abs/>>. Acesso em: 20 nov. 2018.

IBRAHIM, R. M. et al. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from Securigera securidaca flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 134–141, 1 mar. 2015.

JORGE, A. P. et al. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on <sup>14</sup>C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, n. 2, p. 89–96, 15 out. 2004.

JUSTINO, A. B. et al. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. v. 100, p. 83–92, abr. 2018.

KIM, J.-S.; KWON, C.-S.; SON, K. H. Inhibition of Alpha-glucosidase and Amylase by Luteolin, a Flavonoid. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 11, p. 2458–2461, 2000.

LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 7 abr. 2014.

MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Intervention Against the Maillard Reaction in Diabetes and Aging. v. 419, n. 1, p. 1–15, 1 nov. 2003.

MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V. Atividades biológicas dos flavonóides naturais | Request PDF. **ResearchGate**, 2007.

NEGRI, G. et al. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 851–860, dez. 2013.

NELSON, D. L. et al. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2014.

OMS. **Diabetes programme**. Disponível em: <<http://www.who.int/diabetes/en/>>. Acesso em: 20 maio. 2018.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, Advanced Glycation End Products, and Diabetes Complications: What Is New and What Works. **Clinical Diabetes**, v. 21, n. 4, p. 186–187, 1 out. 2003.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. . **Farmacognosia e Farmacobiologia**. 1. ed. [s.l.] São Paulo: Editorial premier, 1997.

- ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215–1221, dez. 2011.
- SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. using FIA-ESI-IT-MS(n) and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 7, p. 8402–8416, 16 jul. 2013.
- SALGUEIRO, A. C. F. et al. **Effects of Bauhinia forficata Tea on Oxidative Stress and Liver Damage in Diabetic Mice**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/8902954/>>. Acesso em: 18 nov. 2018.
- 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, 5 abr. 2018.
- SILVA, C. T. DA; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38–42, 2014.
- SIMIRGIOTIS, M. J. et al. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic *Nolana* Species by HPLC-PDA-ESI-MS. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 6, p. 11490–11507, 22 jun. 2015.
- SIMÕES, R. C.; ALMEIDA, S. S. M. DA S. DE. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Bauhinia forficata* (FABACEAE). **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 5, n. 1, p. 27–31, 31 mar. 2015.
- SOBEH, M. et al. Identification of phenolic secondary metabolites from *Schotia brachypetala* Sond. (Fabaceae) and demonstration of their antioxidant activities in *Caenorhabditis elegans*. **PeerJ**, v. 4, p. e2404, 2016.
- SUN, J. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 3, p. 679–693, 30 mar. 2007.

THILAGAM, E. et al.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Activity of *Senna surrattensis*. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 6, n. 1, p. 24–30, 1 fev. 2013.

VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry: RCM**, v. 24, n. 20, p. 2986–2992, 30 out. 2010.

WANG, C. et al. n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 5–17, jul. 2006.

YE, M. et al. Characterization of flavonoids in *Millettia nitida* var. *hirsutissima* by HPLC/DAD/ESI-MS n. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 1, p. 35–42, fev. 2012.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083–4089, ago. 2001.

ZAREI, M. A.; POURSHARIFI, M. Searching for Alpha-Glucosidase Inhibitory Activity in Hexane Extracts by some Plants from Kurdistan Province. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 3, n. 3, p. 291–296, 1 set. 2015.

ZHANG, K. Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 3, n. 1, p. 33–40, 8 jan. 2010.

ZOU, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2268–2276, 23 mar. 2011.

