

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade antioxidante e antiobesidade dos extrato bruto e da fração acetato de etila da folha da pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) em camundongos C57BL/6 induzidos a obesidade por dieta hiperlipídica

NATÁLIA LORRAYNE TAVERNELLI

Uberlândia/MG
Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade antioxidante e antiobesidade dos extrato bruto e da fração acetato de etila da folha da pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) em camundongos C57BL/6 induzidos a obesidade por dieta hiperlipídica

NATÁLIA LORRAYNE TAVERNELLI

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Françoise Vasconcelos Botelho

Uberlândia/MG
Dezembro - 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade antioxidante e antiobesidade dos extrato bruto e da fração acetato de etila da folha da pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) em camundongos C57BL/6 induzidos a obesidade por dieta hiperlipídica

NATÁLIA LORRAYNE TAVERNELLI

Banca examinadora:

Françoise Vasconcelos Botelho - Doutora em Bioquímica (UFMG)

André Luis Lopes Saraiva – Doutor em Farmacologia (USP)

Rodrigo Rodrigues Franco – Mestre em Genética e Bioquímica (IBTEC- UFU)

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em 17/12/2019

Coordenador do Curso Edgar Silveira Campos

Uberlândia –MG

Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA CURSO
BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade antioxidante e antiobesidade dos extrato bruto e da fração acetato de etila da folha da pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) em camundongos C57BL/6 induzidos a obesidade por dieta hiperlipídica

NATÁLIA LORRAYNE TAVERNELLI

Aprovado pela Banca Examinadora em: __/__/__ Nota:

Françoise Vasconcelos Botelho
Presidente da Banca

Uberlândia, de de

Dedico este trabalho aos meus pais, especialmente à minha mãe, pois o seu apoio, carinho e cuidado foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Maria Eliana, por ter estado ao meu lado e respeitado as minhas decisões mesmo quando não as compreendia. Por ter me inspirado a lutar pelos meus sonhos e não desanimar mesmo nos tempos mais difíceis.

Agradeço à professora e doutora Françoise por ter permitido que eu iniciasse este projeto, pelos ensinamentos passados.

Agradeço e dedico este trabalho à Letícia Lonardoní por ter sido o meu maior suporte durante todo o curso. De tudo o que eu fiz e consegui durante a graduação, a sua amizade é o que mais me orgulha. Obrigada por sempre estar ao lado e por confiar no meu potencial mesmo quando eu já não acreditava mais. No final, acho que foi realmente o destino que nos encontrou e eu serei eternamente grata.

Agradeço a Ariany, Maristela, Pedro André e Vitor Silva pela amizade e apoio. Pela paciência e compreensão. Obrigada por todo o apoio que vocês dão na minha vida profissional e pessoal. Por confiarem em mim e verem o meu melhor lado, vocês me inspiram todos os dias a ser alguém melhor, a ser uma pessoa a qual vocês realmente poderão se orgulhar.

Agradeço ao time de pesquisadores do LABIBI: Adrielli, Alisson, André, Camila, Douglas, Einy, Heitor, Joed, Letícia, Mariane, Poliane, Renata, Rodrigo e Victor. Por sempre se mostrarem dispostos a me auxiliar e tirar minhas dúvidas. Por causa de vocês, meus dias no laboratório são mais divertidos.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós
ignoramos alguma coisa.”

(FREIRE, 2002, p. 69)

RESUMO

A obesidade é uma epidemia mundial que afeta pessoas de todas as idades. O estresse oxidativo é resultante do desbalanço entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A obesidade pode levar ao aumento das EROs e, conseqüentemente, ao contribuir para o desenvolvimento do estresse oxidativo e, por isso, é um fator de risco para diversas doenças como a diabetes tipo 2. A necessidade de controle da obesidade leva a procura de fármacos como o orlistat (inibidor de lipases) e plantas medicinais que possam reverter a obesidade. As plantas são amplamente utilizadas pela população para o tratamento de diversas enfermidades. A pata-de-vaca, *Bauhinia forficata*, é uma planta comum no Cerrado brasileiro e está na lista de plantas medicinais de interesse do SUS. Estudos prévios revelaram rica quantidade de compostos fenólicos na fração acetato de etila. Para este trabalho, foram feitas avaliações durante 24 horas e pelo período de 8 semanas, sendo que os animais do estudo agudo foram alimentados com dieta padrão balanceada e os animais do estudo crônico foram alimentados com dieta hiperlipídica, sendo somente um grupo alimentado com dieta padrão. Os animais foram tratados com solução de DMSO 2,5%, extrato bruto 30 mg/kg e 300mg/kg, e da fração acetato de etila 30mg/kg e 300mg/kg. Foram avaliados o consumo, ganho de peso, perfil lipídico do plasma, fezes e fígado, atividade antioxidante, atividade da enzima glutathionase, peroxidação lipídica e proteína carbonilada dos animais tratado com extrato bruto e da fração acetato de etila nas concentrações 30 mg/kg e 300mg/kg. Nas testes agudos, não foram observadas mudanças no consumo dos animais, mas os grupos tratados com orlistat e o da fração de acetato de etila reduziram os níveis de triglicérides plasmáticos em relação ao grupo veículo da dieta hiperlipídica. O consumo alimentar dos animais do estudo crônico não obteve diferenças, contudo, observamos que os animais que consumiram dieta hiperlipídica obtiveram maior ganho de peso. Os animais do estudo crônico não tiveram diferenças nas defesas antioxidantes e os níveis de glutathionase oxidadas foram mais altos que a glutathionase reduzida mesmo nos animais do grupo padrão. Os animais tratados cronicamente com extrato bruto 300mg/kg e da fração acetato de etila 30mg/kg e 300mg/kg tiveram os níveis de proteína carbonilada aumentados em relação ao grupo tratado somente com o veículo e que consumiu dieta hiperlipídica. Os resultados não foram conclusivos e é necessário analisar o restante dos animais previstos no projeto.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, obesidade, produtos naturais, pata-de-vaca

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Obesidade e estresse oxidativo	12
1.2 Tratamento da obesidade	13
1.3 Uso de plantas e produtos naturais	14
1.4 Uso de plantas e produtos naturais	15
2. METODOLOGIA	16
2.1 Preparação do extrato etanólico	16
2.2 Fracionamento do extrato etanólico e obtenção da fração de acetato de etila	16
2.3 Delineamento experimental	16
2.4 Avaliação do consumo alimentar, ingestão hídrica e peso corporal	18
2.5 Amostra de Sangue e Tecidos	18
2.6 Dosagem de colesterol, colesterol da fração HDL e triglicérides plasmáticos	19
2.7 Extração dos lipídeos hepáticos e fecais	19
2.9 Homogeneizado de fígado	19
2.9 Dosagem de proteína total do fígado	20
2.10 Quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	20
2.11 Atividade antioxidante total	20
2.12 Quantificação de proteína carboniladas	21
2.13 Atividade de eq-GSH e GSSG	21
2.9 Análise Estatística	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Avaliação do efeito agudo do tratamento com extrato bruto e da fração acetato de etila da <i>Bauhinia forficata</i>	23
5.1.1 Efeito da <i>Bauhinia forficata</i> sobre o consumo alimentar	23
5.1.2 Efeito agudo nos níveis de lipídios plasmáticos nos camundongos tratados com extrato bruto e da fração acetato de etila de <i>Bauhinia forficata</i>	23
5.1.3 Efeito agudo nos níveis de lipídios fecais e hepáticos nos camundongos tratados com extrato bruto e da fração acetato de etila de <i>Bauhinia forficata</i>	24
5.2 Avaliação do efeito crônico do tratamento com extrato bruto e da fração acetato de etila da <i>Bauhinia forficata</i>	25
5.2.1 Efeito crônico do tratamento com extrato bruto e da fração acetato de etila da <i>Bauhinia forficata</i> sobre o consumo alimentar e ganho de peso	25
5.2.2 Efeito crônico do tratamento com extrato bruto e da fração acetato de etila da <i>Bauhinia</i>	

<i>forficata</i> sobre os níveis lipídicos plasmáticos.	27
5.2.3 Efeito agudo nos níveis de lipídios fecais e hepáticos nos camundongos tratados com extrato bruto e da fração acetato de etila de <i>Bauhinia forficata</i>	28
5.2.4 Avaliação do potencial antioxidante dos extrato bruto e da fração acetato de etila	29
5.2.5 Avaliação da peroxidação lipídica hepática nos camundongos tratados com extrato bruto e da fração acetato de etila de <i>Bauhinia forficata</i>	30
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO	34
8. REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e estresse oxidativo

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é uma epidemia mundial e com crescente prevalência, sendo consequência da síndrome metabólica e caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal que pode causar riscos à saúde resultante do aumento no tamanho (hipertrofia) e no número de adipócitos (hiperplasia) (OMS, 2018). Em 2016, cerca de 39% dos adultos no mundo estavam acima do peso e 13% eram obesos. A estimativa é, que até 2025, cerca de 2,5 bilhões de adultos estejam sobrepeso e 700 milhões sejam obesos (Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica - ABESO, 2018).

O acúmulo excessivo de gordura que caracteriza a obesidade é um fator de risco para diversas doenças como a diabetes tipo 2, uma vez que obesos tendem a serem resistentes à insulina (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006); doenças cardiovasculares e até mesmo o câncer, sendo associada com o câncer de próstata letal e câncer de mama (EBOT et al., 2017; ALLOTT & HURSTING, 2015).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas pelos organismos como um resultado normal do metabolismo celular e são divididas em dois grupos: radicais livres, quando as moléculas possuem um ou mais elétrons não emparelhados; e não-radicais, quando dois radicais livres compartilham seus elétrons não emparelhados (BIRBEN et al., 2012). O radical hidroxila é o mais reativo entre as EROs e pode causar danos à proteínas, lipídios, carboidratos e ao DNA.

As três EROs com maior significância fisiológica são o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O ânion superóxido é formado pela adição de um elétron na molécula de oxigênio, processo que pode ser mediado pelo sistema de transporte de elétrons da mitocôndria. O superóxido pode ser convertido em peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Por consequência, na presença de metais de transição como o Fe^{2+} e Cu^{2+} , o H_2O_2 é convertido em $OH\cdot$ (BIRBEN et al., 2012).

As defesas antioxidantes podem ser divididas entre enzimáticas e não enzimáticas e ambas equipam o corpo humano para contrabalancear os efeitos das EROs (BIRBEN et al., 2012). Os compostos fenólicos se enquadram na categoria dos antioxidantes não enzimáticos. Atualmente, diversos estudos realizados com frutos e plantas demonstraram alta capacidade antioxidante desses produtos naturais e que esta capacidade antioxidante pode estar relacionada à elevada concentração de compostos fenólicos.

O estresse oxidativo é definido pelo distúrbio no balanço entre a produção de espécies reativas de oxigênios e as defesas antioxidantes (BETTERIDGE, 2000).

De maneira semelhante à obesidade, o estresse oxidativo também está relacionado a diversas doenças (RANI et al., 2016) como asma, câncer, doença de Parkinson, Alzheimer (LYRAS et al., 2002) e nas doenças cardiovasculares. Ainda, o estresse oxidativo aumenta o risco de desenvolvimento da resistência à insulina quando associado à obesidade que, por sua vez, também contribui para a geração de espécies reativas de oxigênio (BARAZZONI et al., 2018).

1.2 Obesidade x Tratamento x Efeitos Colaterais

Devido aos problemas gerados pela obesidade, têm-se estudado tratamentos para redução do peso e também para reduzir os efeitos deletérios no metabolismo.

O ideal é que a obesidade seja prevenida através de campanhas de educação. No entanto, este é um objetivo a longo prazo. A cirurgia bariátrica é o tratamento que demonstra maior perda de peso, contudo, é reservada para casos de obesidade mórbida. Sendo assim, faz-se necessário o uso de fármacos como medida terapêutica (RODGERS; TSCHOP; WILDING, 2012).

A Sibutramina (um inibidor de recaptura de noradrenalina e serotonina) começou a ser utilizada clinicamente no final dos anos 90 e induz a perda de peso por diminuir o consumo de comida e aumentar o gasto de energia. Entretanto, foram identificados alguns efeitos colaterais, sendo o mais sério deles, os problemas cardiovasculares gerados. Tais efeitos adversos, inclusive, levaram à proibição do medicamento na Europa em 2010. A sibutramina ainda é liberada para uso no Brasil (JAMES et al., 2010).

A efedrina, que é um agonista adrenérgico não seletivo, é utilizada como termogênico e também tem efeitos comprovados na redução do peso. Como efeito colateral, em alguns pacientes foram observadas palpitações (BRAY& TARTAGLIA, 2000).

O fármaco Orlistat foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA), nos Estados Unidos, para o tratamento da obesidade em 1998. O medicamento inibe lipases pancreáticas impedindo a absorção de gordura pelo sistema gastrointestinal em aproximadamente 30% (BORGSTROM, 1988). Os efeitos adversos do Orlistat são limitados, mas incluem diarreia, flatulência, dor abdominal e dispepsia (BRAY; GREENWAY, 2007).

Os efeitos colaterais gerados por tais medicamentos leva à busca por terapias alternativas e utilização de extratos naturais para o combate à obesidade (DANESCHVAR; ARONSON; SMETANA, 2016).

1.3 Uso de plantas e produtos naturais

Os produtos naturais têm sido utilizados desde a antiguidade, sendo que, as plantas constituíam até o século passado a maior fonte terapêutica existente. As plantas medicinais são atualmente utilizadas no tratamento de várias doenças, sendo muitas vezes consideradas terapias alternativas (CHOI, 2018). O Brasil possui vasta gama de espécies vegetais nativas que são consideradas medicinais. No entanto, apenas 10% das plantas existentes foram estudadas para comprovar suas propriedades e eficácia terapêuticas (CECHINEL-FILHO, 2015).

Algumas espécies de plantas já foram estudadas devido ao potencial antiobesidade e aos mecanismos envolvidos. Em um estudo conduzido pela Universidade de São Paulo em parceria com a Universidade de Laval, no Canadá, foi demonstrado que o extrato rico em compostos fenólicos, especialmente abundante em taninos, de jaboticaba Sabará (*Plinia jaboticaba*) preveniu o ganho de peso corporal além de impedir o crescimento do tecido adiposo branco em camundongos obesos por indução de dieta hipercalórica (MOURA et al., 2018).

Ainda, estudo com camundongos obesos induzidos por dieta hipercalórica e tratados com extrato de *Citrus reticulata* mostrou que o extrato preveniu a obesidade e acumulação lipídica por induzir uma mudança fenotípica no tecido adiposo branco, o transformando em tecido adiposo bege (propriedades semelhantes ao tecido adiposo marrom) (CHOU; HO; PAN, 2018).

A lipase pancreática também é um grande alvo para o desenvolvimento de estratégias antiobesidade. A inibição desta enzima implica na redução da absorção de lipídios através da hidrólise de triglicérides pelo sistema gastrointestinal (WINKLER; DARCY; HUNZIKER, 1990). Medicamentos como o orlistat combatem a obesidade através deste mecanismo de ação. No entanto, compostos naturais como os compostos fenólicos também têm potencial de inibição da lipase pancreática, sendo esse um importante parâmetro para se determinar a eficácia de um produto natural contra a obesidade (ALIAS et al., 2017).

1.4 Pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*)

A espécie *Bauhinia forficata*, popularmente conhecida como pata-de-vaca, possui diversas propriedades medicinais, tais como atividade hipoglicêmica, diurética, antidiarreica, tônica e antidiabética (PEPATO et al., 2002). Segundo estudo publicado por Salgueiro *et al* (2016), o chá de *B. forficata* normalizou os níveis de espécies reativas de oxigênio e oxidação lipídica no fígado e da atividade da enzima antioxidante, catalase, em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ).

Ainda, a infusão das folhas da *B. forficata* é utilizada popularmente para o tratamento de diversas enfermidades, que aliada às atividades medicinais comprovadas por diversos estudos levou à inclusão da *Bauhinia forficata* na Lista de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) (Saúde, 2009).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi elucidar a atuação do extrato bruto e da fração acetato de etila das folhas da pata-de-vaca na prevenção da obesidade e combate ao estresse oxidativo gerado em consequência à obesidade induzida em camundongos C57BL/6 através de dieta hiperlipídica.

2. METODOLOGIA

2.1 Preparação do extrato etanólico

Para o processo de extração, foi utilizado 1,0 Kg das folhas da *B. forficata* aplicando-se o método de maceração estática, isto é, sem agitação, na qual o material ficou imerso em 5,0L de etanol 99,8% como solvente (proporção de 1:5 m.v⁻¹) durante seis dias em média. Após esse período, filtrou-se a solução com os extrativos e o solvente foi removido em rotaevaporador sob pressão reduzida a 40° C. O material vegetal foi remacerado por mais duas vezes, utilizando-se o solvente recuperado na rotaevaporação. O extrato bruto gerado foi congelado e liofilizado para a remoção da água e posteriormente, armazenado em freezer à 20°C.

2.2 Fracionamento do extrato etanólico e obtenção da fração de acetato de etila

Para a partição líquido-líquido, aproximadamente 30g do extrato bruto foi solubilizado em 200,0mL de solução metanol: água (9:1). Com o auxílio de um funil de separação, realizou-se o fracionamento com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano,

acetato de etila, n-butanol e água. Para esse processo, foram realizadas quatro extrações com 200,0 mL de cada solvente. Os solventes das frações foram totalmente removidos por rotaevaporação sob pressão reduzida a 40° C; as frações foram, então, congeladas e liofilizadas para a remoção da água remanescente e, em seguida, armazenadas a -20° C.

2.3 Delineamento experimental

Os animais foram cedidos pela Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU) após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) com protocolo de registro CEUA/UFU 093/18. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura e umidade controladas no biotério, localizado no bloco 4U do *campus* Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia e divididos em 6 grupos com 6 animais cada para a avaliação aguda (24 horas) e 7 grupos com 8 animais cada para avaliação do efeito crônico do extrato bruto e da fração acetato de etila de *Bauhinia forficata*. A administração dos tratamentos foi através do método de gavagem.

2.3.1 Avaliação do efeito agudo da *Bauhinia forficata*

Para avaliação do efeito agudo supressor do consumo de alimento os camundongos C57BL/6 de 5 semanas de idade foram pesados e divididos em 6 grupos experimentais (n=6 animais). Os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas, por um período de 1,5h, para se ambientarem. Os animais foram tratados com solução veículo de DMSO (Dimetilsulfóxido) 2,5% (grupo controle, DMSO 2,5% utilizado na diluição do extrato bruto e da fração acetato de etila), *Orlistat* (30mg/kg de peso) e os extrato bruto e de acetato de etila da *Bauhinia forficata* (30mg/kg e 300mg/kg de peso do animal). Após 30 minutos da administração de cada tratamento, todos os grupos tiveram livre acesso à ração padrão cedida pelo biotério, previamente pesada. A ração administrada foi pesada 2, 4 e 22 horas para avaliação do consumo.

2.3.2 Avaliação do efeito crônico da *Bauhinia forficata*

Para avaliação do efeito crônico da *Bauhinia forficata* sobre o desenvolvimento da obesidade os camundongos C57BL/6 de 5 semanas de idade foram pesados e divididos em 7 grupos experimentais de 4 animais cada grupo.

Os camundongos do grupo 1 foram alimentados com dieta padrão e os demais grupos foram alimentados com dieta hiperlipídica (Tabela 1):

- Grupo 2: Dieta hiperlipídica + Veículo (DMSO 2,5%)
- Grupo 3: Dieta hiperlipídica + Orlistat (30mg/kg de peso do animal)
- Grupo 4: Dieta hiperlipídica + 30mg do extrato bruto da *B. forficata*/kg de peso
- Grupo 5: Dieta hiperlipídica + 300mg do extrato bruto da *B. forficata*/kg de peso
- Grupo 6: Dieta hiperlipídica + 30mg do extrato acetato de etila da *B. forficata*/kg de peso
- Grupo 7: Dieta hiperlipídica + 300mg do extrato acetato de etila da *B. forficata*/kg de peso

Os animais foram mantidos em um período claro/escuro de 12 horas, temperatura 22°C e de umidade 55%, com livre acesso à água, ração durante 53 dias.

Tabela 1: Composição em 100 g das dietas ofertadas em relação aos macronutrientes.

	Dieta padrão Nuvilab®	Dieta Hiperlipídica
Carboidratos (g)	44,8	42,2
Proteínas (g)	24,8	20,3
Lipídeos (g)	3,4	37,5
Valor energético (kcal)	309	587,5

2.4 Avaliação do consumo alimentar, ingestão hídrica e peso corporal

Os animais foram pesados no início do experimento (dia 0) e a cada 7 dias até o final do período experimental. O consumo alimentar foi avaliado semanalmente sendo a quantidade de ração pesada no início de cada semana experimental e, ao final, pesadas as sobras da grade e do chão da gaiola fazendo a subtração do valor colocado e do que sobrou ao final da semana. Dividimos o valor obtido pelo número de animais da gaiola e, desta forma, obtivemos o consumo médio diário por animal por dia. Para o cálculo do consumo calórico, o consumo semanal (em gramas) foi multiplicado pela densidade calórica da dieta.

2.5 Amostra de sangue e tecidos

Ao término do experimento, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de quetamina e xilazina (70mg/kg e 12mg/kg, respectivamente) e foram

eutanasiados por exsanguinação pela artéria braquial. As amostras de sangue usadas para as dosagens bioquímicas foram retiradas após jejum de 12 horas. O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C para separação do plasma. O plasma obtido foi armazenado à -20°C para quantificação de triglicérides, colesterol total e colesterol da fração HDL. Antes da retirada do fígado, os animais foram perfundidos com 10 mL de solução fosfato-salina (PBS). O fígado foi retirado, pesado e particionado. As amostras de fígado destinadas à quantificação de lipídios totais, triglicérides e colesterol total foram armazenadas à -20°C e as amostras para os ensaios de estresse oxidativo foram armazenadas à -80°C.

2.6 Dosagem de colesterol, colesterol da fração HDL e triglicérides plasmáticos

Utilizou-se kits comerciais para a dosagem de triglicérides e colesterol total. Foi realizada a diluição do plasma. Assim, 480 µL de água (H₂O) foram acrescentados a 20 µL de amostra. Para montar a curva padrão, 40 µL da solução padrão disponível no kit foram adicionados à 960 µL de água mili-Q. Desta solução, realizou-se uma diluição seriada a fim de obter as seguintes concentrações, respectivamente: 8 mg/dL, 4 mg/dL, 2 mg/dL e 1 mg/dL. Em uma microplaca de 96 poços, foram colocados 100 µL das soluções padrão, das amostras diluídas e do branco, em duplicata. Foi adicionado aos poços 100 µL do reagente de trabalho. A placa foi incubada por 15 minutos à 37°C e, posteriormente, foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 500 nm.

A dosagem do colesterol da fração HDL foi realizada seguindo os procedimentos contidos no kit. Foram misturados 20 µL de plasma das amostras e 20 µL do reagente precipitante. A solução foi homogeneizada por 20 segundos e ficou em repouso por 10 minutos sendo, em seguida, centrifugada por 4 minutos a 12.000 rpm à 4°C. Em uma microplaca de 96 poços, foi colocado 10 µL de amostra em cada poço. 200 µL de reagente de cor foi adicionado também em cada poço e a placa foi incubada por 15 minutos à 37°C.

Realizou-se a leitura no espectrofotômetro à 500 nm.

2.7 Extração dos lipídeos hepáticos e fecais

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos de acordo com o método descrito por Folch et al. em 1957, no qual 100 mg de amostra foi homogeneizada com 1900 µL de solução de clorofórmio e metanol (2:1). Ao homogeneizado foi acrescentado 400 µL de metanol e, então, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi vertido a um

tubo de ensaio previamente pesado e a ele foram adicionados 800 μ L de clorofórmio e 640 μ L de solução NaCl a 0,73%. A nova solução foi homogeneizada e centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. Duas fases foram formadas, sendo a fase superior descartada. A parede do tubo de ensaio foi lavada com 600 μ L de solução Folch por três vezes. Os extratos lipídicos foram colocados em estufa a 37°C durante 24 horas. Após este período, o tubo de ensaio foi pesado e o conteúdo lipídico do tubo de ensaio foi ressuspensionado com 500 μ L de isopropanol para as dosagens de colesterol e triglicerídeos que foram realizadas com o auxílio de kit enzimáticos.

2.8 Homogeneizado de fígado

Para as próximas análises, as amostras de fígado foram homogeneizadas. Com o auxílio de um homogeneizador de tecidos, 100 mg de amostra foram homogeneizadas em 900 μ L de tampão fosfato pH 7,4 50mM EDTA 5mM. A solução foi centrifugada a 10000 g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -20°C.

2.9 Dosagem de proteína total do fígado

A quantificação de proteína total das amostras foi realizada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para obtenção da curva padrão, uma solução de BSA (2 mg/mL) foi diluída nas seguintes concentrações: 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,35 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,7 mg/mL, 1,0mg/mL e 1,4mg/mL. O homogeneizado foi diluído em água, sendo o fator de diluição igual a 30. Em uma placa de 96 poços, foram colocados 5 μ L de amostra e adicionados 250 μ L do reagente de Bradford. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos. Realizou-se a leitura no espectrofotômetro à 595nm.

2.10 Quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foram misturados 100 μ L do homogeneizado de fígado a 400 μ L de água (H₂O) e 500 μ L de ácido tricloroacético 20% (TCA). Desta solução, 400 μ L foram retirados e adicionado a um tubo com ácido clorídrico 0,5 M (HCl) e hidroxitolueno butilado 50 mM (BHT). Outros 400 μ L foram colocados em tubo com ácido tiobarbitúrico 0,75% (TBA) diluído em HCl 0,5 M e BHT 50mM. Os tubos foram fervidos em banho maria por 30 minutos e centrifugados a 10000g por 6 minutos a 4°C. O sobrenadante foi lido no espectrofotômetro a 532 nm e 600 nm.

2.11 Atividade antioxidante total

A análise da atividade antioxidante total foi feita através do método de redução do ferro (FRAP). Para obtenção da curva padrão, uma solução de Trolox (2000 μ M) foi diluída em

água nas seguintes concentrações: 200 μM , 150 μM , 100 μM , 80 μM , 60 μM , 40 μM , 20 μM e 10 μM em um volume final de 35 μL para cada uma das concentrações. 10 μL de amostra foram adicionados a 25 μL de água. A amostra foi colocada em uma placa de 96 poços e foram acrescentados 250 μL de solução reagente de FRAP (tampão acetato de sódio 0,3 M, TPTZ 10 mM e cloreto férrico 20 mM). A placa foi incubada por 6 minutos a 37°C e lida no espectrofotômetro 593 nm.

2.12 Quantificação de proteína carboniladas

Preparamos uma solução com 250 μL de amostra, 250 μL de água e 500 μL de TCA 20%. Desta solução, transferimos 450 μL para dois tubos eppendorf que foram centrifugados por 6 minutos a 10000 g, a 4°C. O sobrenadante foi separado para quantificação de eq-GSH e GSSG. O pellet formado no tubo destinado ao teste foi ressuscitado com 500 μL de solução de dinitrophenilidrazina 10 mM (DNPH) solubilizado em HCl 2 M. O pellet formado no tubo destinado ao branco foi ressuscitado em HCl 2 M. À solução adicionou-se 500 μL de TCA 20% gelado e a nova solução foi centrifugada a 10000 g por 6 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e lavou-se o precipitado com 1 mL de solução etanol:acetato de etila (1:1) por três vezes, centrifugando a solução a cada lavagem. Após a última lavagem, o pellet foi dissolvido em 1 mL de cloreto de guanidina 6 M. A solução foi incubada por 15 minutos à 37°C e centrifugada, posteriormente. Transferiu-se 300 μL em duplicata para um placa de 96 poços e realizou-se a leitura entre 340 nm e 410 nm. O comprimento de onda com maior absorbância foi selecionado para análises posteriores.

Para determinação da concentração de proteínas totais, 200 μL do sobrenadante contido no tubo destinado ao branco foi adicionado a 800 μL de cloreto de guanidina. Centrifugou-se a solução por 6 minutos a 10000 g. Transferiu-se 300 μL do sobrenadante para a uma microplaca e realizou-se a leitura a 280 nm.

2.13 Atividade de eq-GSH e GSSG

Para determinação da concentração de eq-GSH e GSSG utilizamos o sobrenadante obtido na primeira etapa do método descrito acima. 100 μL do sobrenadante de cada amostra foram transferido para um tubo destinado à medição de GSH e outros 100 μL do sobrenadante foram transferido para um tubo destinado à medição de GSSG. Acrescentamos 300 μL de

tampão fosfato 0,5 M pH 7,0 e 20 μ L de etanol ao tubo “GSH” e 300 μ L de tampão fosfato 0,5 M pH 7,0 e 20 μ L de 2-vinylpyridine 0,5 M em etanol ao tubo “GSSG”. Os tubos foram agitados vigorosamente por mais de um minuto e mantidas no escuro em temperatura ambiente por 1 hora. Para quantificação da concentração de GSH, adicionamos 30 μ L de amostra à solução com 615 μ L de água, 200 μ L de tampão fosfato 0,5M EDTA 5mM pH 7,0, 30 μ L de TCA 2,38% fosfato 0,357M etanol 4,76%, 25 μ L de NADPH 4 mM, 50 μ L de DNTB 2 mM e 50 μ L de glutatona redutase (GR) 1U/mL.

Para quantificação da concentração de GSSG, adicionamos 25 μ L de amostra à solução com 600 μ L de água, 200 μ L de tampão fosfato 0,5M EDTA 5mM pH 7,0, 75 μ L de TCA 2,38% fosfato 0,357 M etanol 4,76%, 25 μ L de NADPH 4 mM, 50 μ L de DNTB 2 mM e 25 μ L de glutatona redutase (GR) 13 U/mL.

2.9 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism considerando nível de significância de 5%. Para avaliação das condições experimentais será utilizado o teste ANOVA one way com o post hoc de Tukey. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão ou erro padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito agudo do tratamento com extrato bruto e da fração acetato de etila da *Bauhinia forficata*

5.1.1 Efeito da *Bauhinia forficata* sobre o consumo alimentar

Para a avaliação do consumo alimentar agudo, durante 24 horas, não observamos alterações no consumo alimentar final (**Figura 2B**). Entretanto, os animais tratados com fração acetato de etila 300mg/kg, consumiram mais da ração padrão comparados ao animais do grupo tratado com DMSO 2,5% (veículo) (**Figura 1 A**).

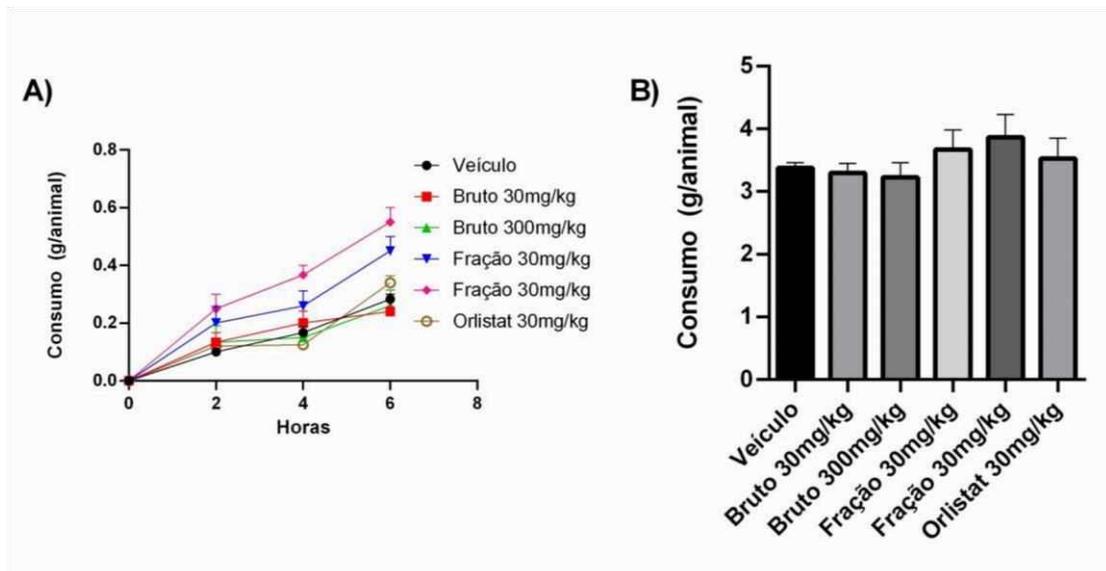
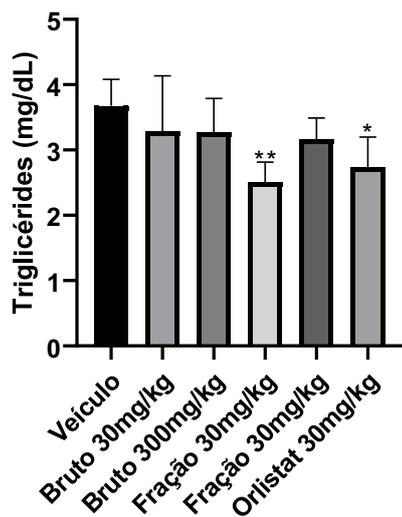


Figura 2: Avaliação do consumo alimentar, A) ao longo do tempo, B) final. Todos os valores expressos como média \pm o desvio padrão. $P < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

5.1.2 Efeito agudo nos níveis de lipídios plasmáticos nos camundongos tratados com extrato bruto e da fração acetato de etila de *Bauhinia forficata*

A concentração de triglicérides no plasma dos animais tratados com o da fração acetato de etila 30 mg/kg e orlistat 30mg/kg reduziu em relação ao grupo tratado com DMSO 2,5%, considerando valor de $p < 0,05$ (**Figura 3A**). Contudo, foi observado um aumento no colesterol total dos animais tratados com fração 300mg/kg quando comparado ao animais do grupo veículo (figura 2 B)

A)



B)

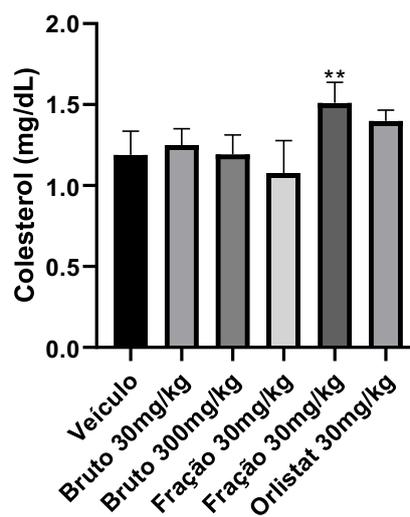


Figura 3: Níveis de triglicérides (A) e colesterol total (B) em mg/dL de plasma. Todos os valores expressos como média \pm o desvio padrão. *, **: $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

5.1.3 Efeito agudo nos níveis de lipídios fecais e hepáticos nos camundongos tratados com extrato bruto e da fração acetato de etila de *Bauhinia forficata*

Não observamos alterações na concentração de lipídios, triglicérides e colesterol total do fígados e das fezes do animais. No entanto, houve uma redução no colesterol analisado dos animais tratados com orlistat (30mg/kg) em relação ao grupo veículo (**Figura 4**).

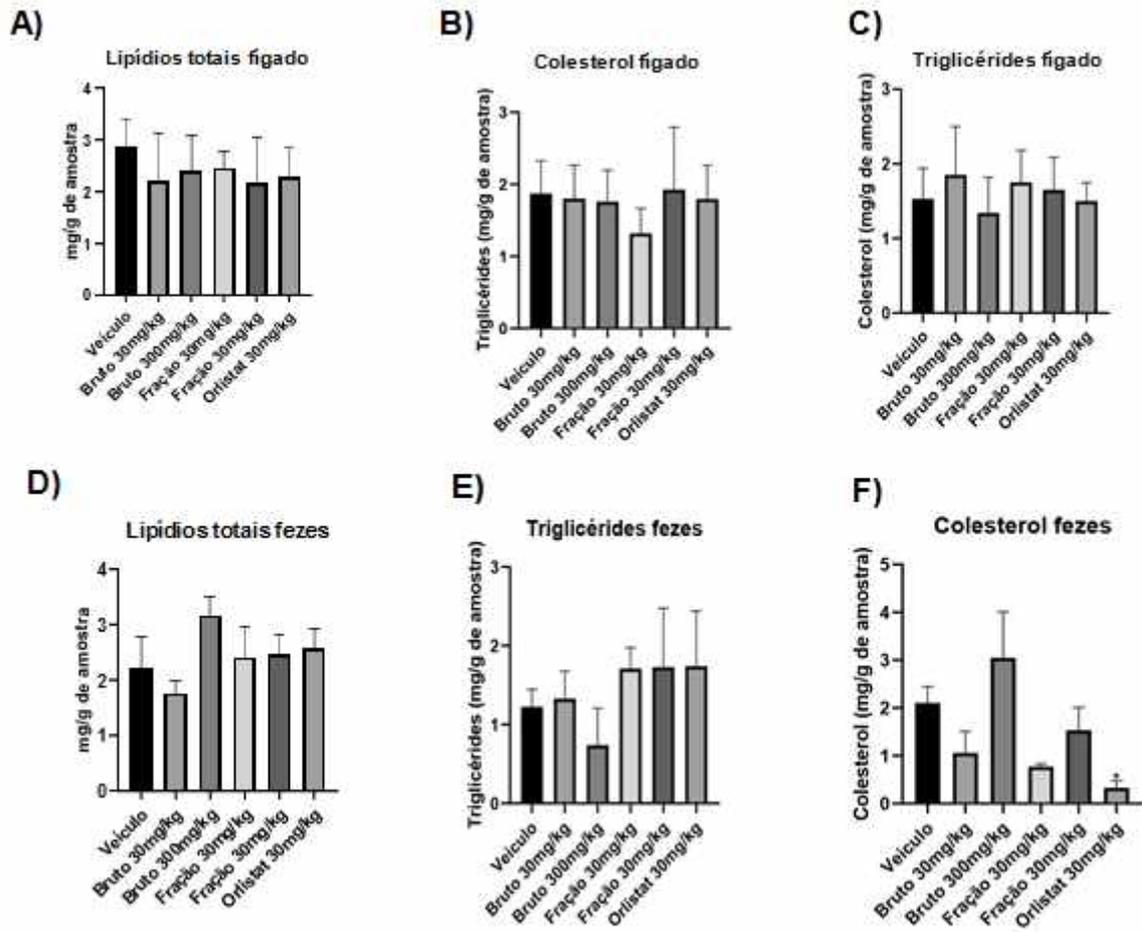


Figura 4: Níveis de triglicérides e colesterol total em mg/g de amostra. Todos os valores expressos como média \pm o desvio padrão. *: $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

5.2 Avaliação do efeito crônico do tratamento com extrato bruto e da fração acetato de etila da *Bauhinia forficata*

5.2.1 Efeito crônico do tratamento com extrato bruto e da fração acetato de etila da *Bauhinia forficata* sobre o consumo alimentar e ganho de peso

Os animais alimentados com dieta padrão, apresentaram um consumo alimentar em gramas superior aos animais alimentados com dieta hiperlipídica (**Figuras 5A**), porém, em relação às calorias, não observamos diferenças entre os grupos (**Figura 5B**). Quanto ao ganho observamos maior ganho dos animais da dieta hiperlipídica veículo em relação aos animais da dieta padrão. Os tratamentos não resultaram em diferenças (**Figura 5C**). Quanto ao peso relativo do fígado camundongos, o mesmo foi maior nos camundongos alimentados com a

dieta padrão (**Figura 6A**) em relação aos animais alimentados com dieta hiperlipídica não havendo diferenças entre os tratamentos. Enquanto que, no tecido adiposo, o peso relativo aumentou nos animais alimentados com dieta hiperlipídica em relação ao peso relativo do tecido adiposo dos animais alimentados com a dieta padrão (**Figura 6B**).

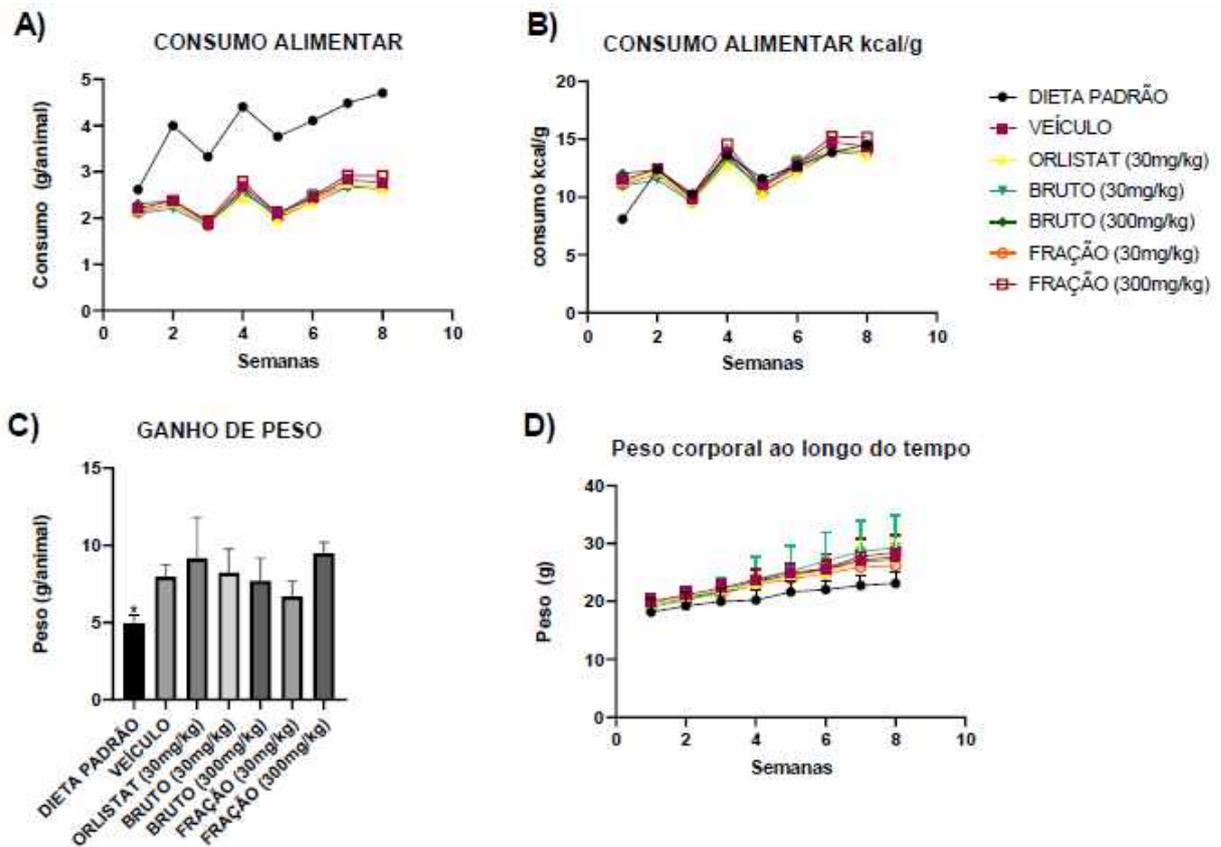


Figura 5: consumo alimentar (a), peso corporal ao longo do tempo (b) e ganho de peso corporal (c) dos animais alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica com o tratamento dos extrato bruto e da fração acetato de etila (30mg/kg e 300mg/kg) e orlistat (30mg/kg). Dados apresentados como média e desvio padrão. *: $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

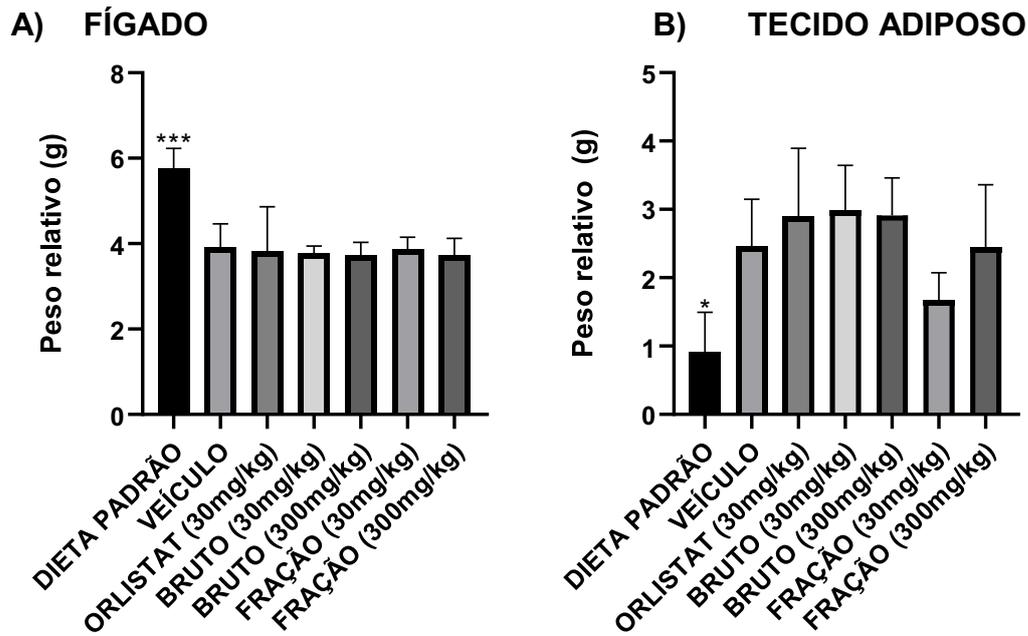


Figura 6: Peso relativo do fígado (A) e tecido adiposo epididimal (B) dos animais alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica com o tratamento dos extrato bruto e da fração acetato de etila (30mg/kg e 300mg/kg) e orlistat (30mg/kg). Dados apresentados como média e desvio padrão. *, ***: $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

5.2.2 Efeito crônico do tratamento com extrato bruto e da fração acetato de etila da *Bauhinia forficata* sobre os níveis lipídicos plasmáticos.

A concentração de triglicérides e do colesterol HDL no plasma não sofreu alterações entre os grupos (**Figuras 7A e 7C**). Entretanto, houve aumento do colesterol total do plasma nos camundongos alimentados com a dieta hiperlipídica em relação ao animais da dieta padrão (**Figura 7 B**).

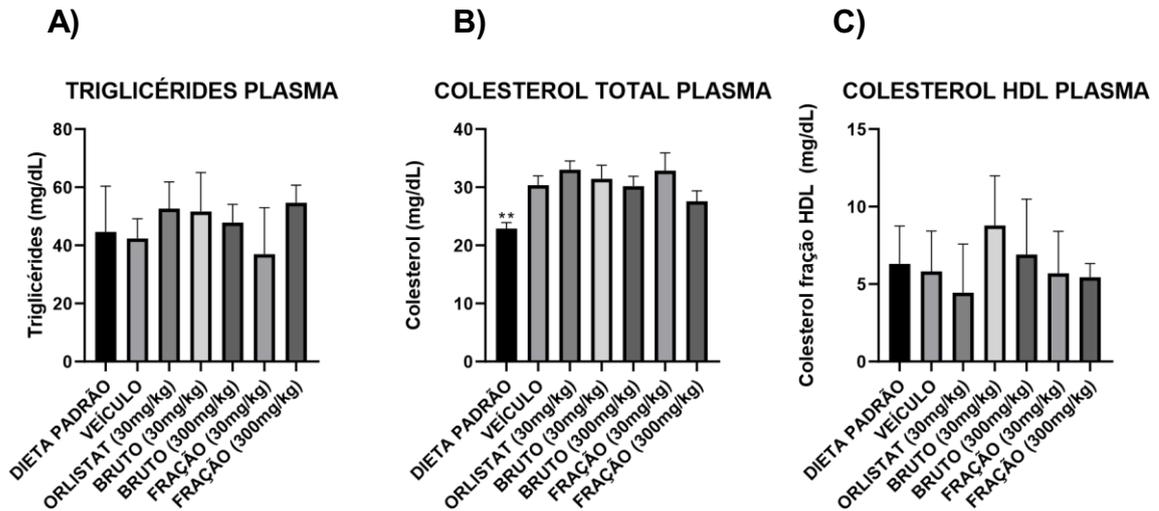


Figura 7: Concentração de triglicérides (A), colesterol total (B) e colesterol da fração HDL (C) em mg/dL de plasma dos animais alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica com o tratamento dos extrato bruto e da fração acetato de etila (30mg/kg e 300mg/kg) e orlistat (30mg/kg). Dados apresentados como média e desvio padrão. **: $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

5.2.3 Efeito agudo nos níveis de lipídios fecais e hepáticos nos camundongos

tratados com extrato bruto e da fração acetato de etila de *Bauhinia forficata*

O tratamento com os extrato bruto (30 mg/kg) e da fração acetato de etila (300 mg/kg) reduziram a concentração de lipídios no fígado comparados ao grupo veículo (**Figura 8A**). Contudo, não houve diferença na concentração de lipídios nas fezes (**Figura 8D**). A fração 30mg/kg reduziu o colesterol nas fezes dos animais tratados em relação ao grupo veículo. Não houve diferença nas concentrações de triglicérides fecais e hepáticos e colesterol hepático.

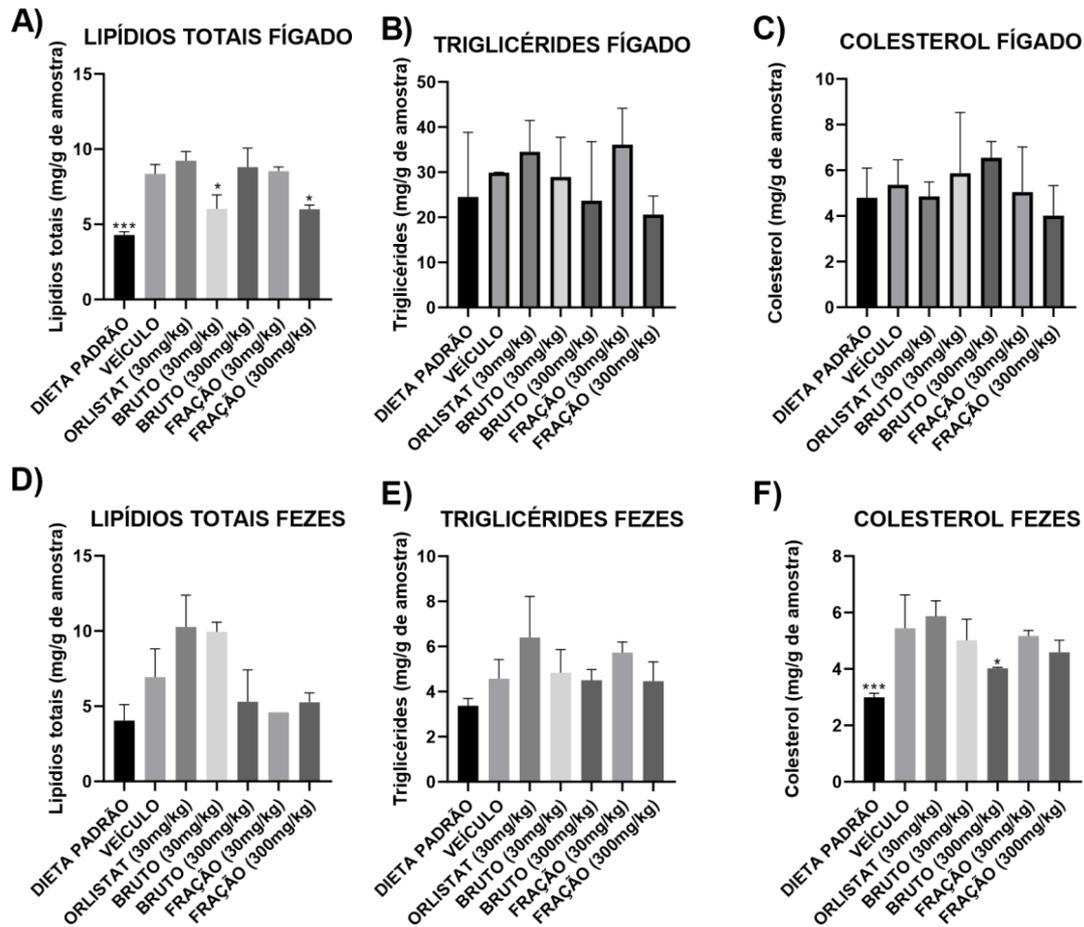


Figura 8: Concentração de triglicérides, colesterol total fecais (A, B e C) e hepáticos (D, E, e F) em mg/g de amostra dos animais alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica com o tratamento dos extrato bruto e da fração acetato de etila (30mg/kg e 300mg/kg) e orlistat (30mg/kg). Dados apresentados como média e desvio padrão. *, ***: $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

5.2.4 Avaliação do potencial antioxidante dos extrato bruto e da fração acetato de etila

Quanto ao potencial antioxidante total não observamos diferenças entre os grupos. A concentração de gsh no fígado teve um aumento no grupo tratado com extrato bruto 30mg/kg em relação ao grupo veículo. Contudo, não foi possível observar diferenças na concentração da enzima glutatona em sua forma oxidada (gssg) entre os grupos (**Figura 9**).

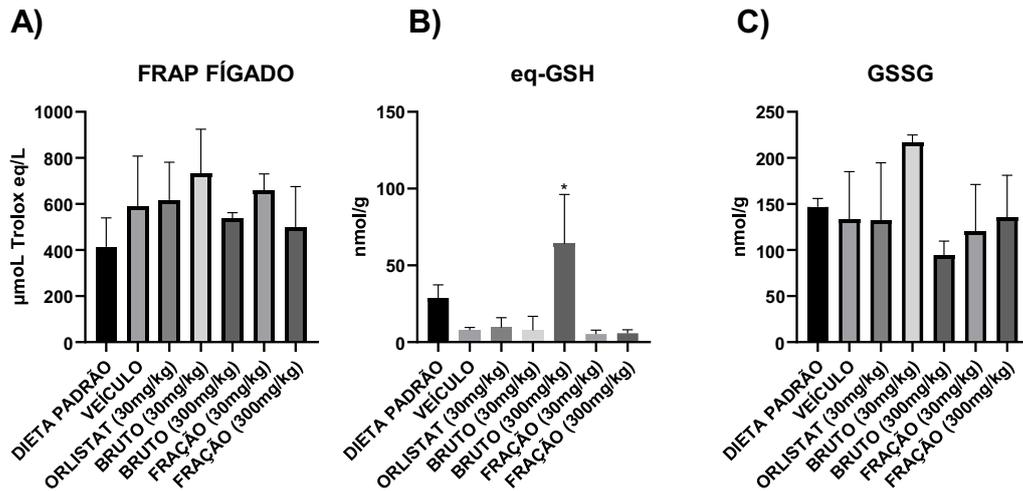


Figura 9: Atividade antioxidante através do método de redução do Fe^{+3} e concentração da enzima glutatona na forma reduzida e oxidada no fígado dos animais alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica com o tratamento dos extrato bruto e da fração acetato de etila (30mg/kg e 300mg/kg) e orlistat (30mg/kg). Dados apresentados como média e desvio padrão. *: $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

5.2.5 Avaliação da peroxidação lipídica hepática nos camundongos tratados com extrato bruto e da fração acetato de etila de *Bauhinia forficata*

A peroxidação lipídica do fígado foi avaliada pelo método TBARS. Constatamos que, em relação ao grupo veículo, somente houve diferença no grupo tratado com fração acetato de etila 30mg/kg, o qual apresentou uma redução nos níveis de peroxidação lipídica (**Figura 10A**). Quanto ao dano proteico no fígado, os níveis de proteína carbonilada aumentaram nos grupos tratados com extrato bruto 300mg/kg e fração acetato de etila 30mg/kg e 300mg/kg.

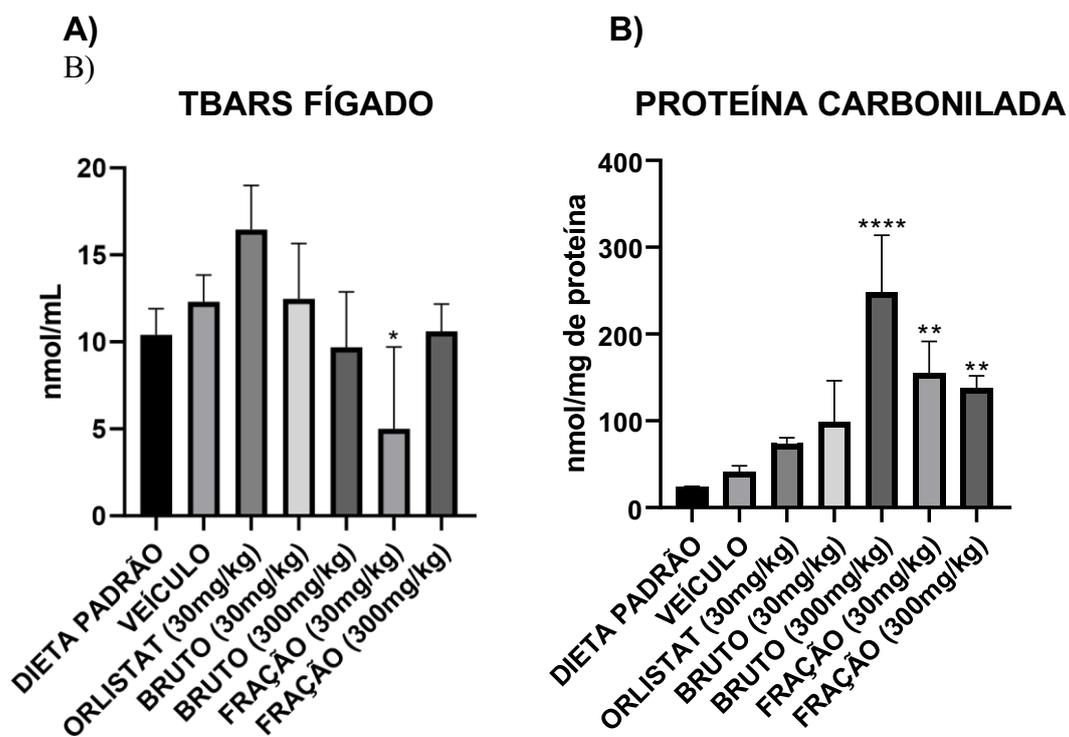


Figura 10: peroxidação lipídica e dano proteico nas amostras de fígado dos animais alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica com o tratamento do extrato bruto e da fração acetato de etila (30mg/kg e 300mg/kg) e orlistat (30mg/kg). Dados apresentados como média e desvio padrão. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,005$, ****: $p < 0,0001$ em relação ao grupo veículo.

6. DISCUSSÃO

O controle e tratamento da obesidade é muito importante para se evitar o desenvolvimento de doenças associadas, tal como a diabetes melitus tipo 2. O ideal para combate da obesidade seria reeducação alimentar acompanhada de exercícios físicos regulares. Entretanto, a busca por resultados a curto prazo e ou dificuldades geradas pela própria condição obesa (em relação aos exercícios físicos), leva à necessidade de desenvolvimento de fármacos e a procura por produtos naturais, derivados de plantas ou animais como uma alternativa para a prevenção e/ou tratamento da obesidade (RODGERS; TSCHOP; WILDING, 2012).

Tanto os fármacos quanto os produtos naturais podem ter diferentes mecanismos de ação. A sibutramina, por exemplo, atua no sistema nervoso central e auxilia no tratamento da obesidade ao inibir o consumo alimentar (JAMES et al., 2010). Neste trabalho, observamos que os extratos brutos e fração acetato de etila da pata-de-vaca não mudaram o consumo alimentar dos animais tratados na avaliação aguda (**Figura 2A**) e na avaliação crônica (**Figura 4A**).

O orlistat é um forte inibidor da lipase gastrointestinal. A lipase gastrointestinal degrada os triacilgliceróis ingeridos gerando moléculas de ácidos graxos e monoglicérides que, posteriormente, serão armazenados no tecido adiposo (TA); o acúmulo de gordura causa a hipertrofia e hiperplasia das células do TA, caracterizando o sobrepeso e a obesidade. Quando a lipase intestinal é inibida, a absorção de lipídios da dieta fica comprometida, portanto, pode ocorrer uma reversão da obesidade. É comum, nesse caso, a ocorrência de esteatorréia, popularmente conhecida como gordura nas fezes.

Nos resultados apresentados por esse trabalho, a análise dos parâmetros lipídicos da avaliação aguda do efeito da *Bauhinia forficata* indicaram que o orlistat e a fração de acetato de etila reduziram os níveis de triglicérides plasmáticos em relação ao grupo veículo da dieta hiperlipídica (**Figura 3**). Contudo, não houve redução da concentração de lipídios totais, triglicérides e colesterol total no fígado e nas fezes (**Figura 4**).

Esperava-se que o orlistat atuasse como um grupo controle positivo na redução da obesidade e como um parâmetro para um possível mecanismo de ação dos extratos da patade-vaca. No entanto, tais resultados não foram observados no experimento agudo e nem no crônico.

Para os estudos crônicos, os animais foram tratados entre 1h a 1h30m antes do ciclo escuro começar, também não houve mudança no perfil lipídico dos animais tratados com orlistat e nem no tratamento com extrato bruto e fração acetato de etila. Entretanto, o n amostral da avaliação crônica apresentada neste trabalho é de apenas metade do que o projeto original propôs, com o n igual a 8 animais por grupo. Sendo assim, apesar de haver um tendência à elevação da concentração de lipídios totais na fezes dos animais tratados com orlistat e extrato bruto 30mg/kg da pata-de-vaca (**Figura 8**) é necessária a análise completa do n amostral.

Sampaio et al. (2018) constatou que o extrato alcoólico de *B. forficata* reduziu o peso do tecido adiposo epididimal em ratos Wistar, mas não apresentou resultados significativos quanto à redução da massa corporal dos animais. No presente trabalho, camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ganharam mais massa corporal do que os camundongos alimentados com dieta padrão. O tratamento não foi eficaz na prevenção do ganho de peso desses animais, assim como não observamos redução do peso relativo do tecido adiposo.

A análise antioxidante total pela método de redução do Fe^{3+} é baseada em Benzie; Strain (1996). Para esta análise, antioxidantes constituídos na amostra reduzem o Fe^{3+} em Fe^{2+} (figura 10). O Fe^{2+} é então quelado ao 2,4,6-tri(2piridil)-striaizina (TPTZ), no qual forma-se o complexo Fe^{2+} -TPTZ. Este complexo tem coloração azulada e pode ser lido no espectrofotômetro sendo que a capacidade antioxidante é determinada com uma solução de Trolox. Não observamos aumento do potencial antioxidante total no fígado dos animais tratados com os diferentes extratos brutos e frações da *B. forficata*.

A obesidade e a dieta hiperlipídica são influenciam na geração de EROs e, consequentemente, no estresse oxidativo. O desbalanço entre a atividade oxidante do organismo e a liberação de EROs seja pelo aumento na liberação de oxigênio pelo miocárdio, no resultado da inflamação gerada por adipocitocinas no tecido adiposo ou pela mudança no metabolismo do oxigênio causada pela dieta rica em lipídios acarreta na peroxidação lipídica e no aumento na concentração da glutathiona na forma oxidada (OLUSI, 2002). Observamos que a concentração de glutathiona reduzida aumentou nos animais tratados com o extrato bruto 300mg/kg de peso e peroxidação lipídica foi reduzida apenas no grupo da fração acetato de etila 30mg/kg. Observamos também, maiores níveis de proteína carbonilada no extrato bruto 300mg/kg e frações acetato de etila 30 e 300mg/kg. Tais dados requerem maiores análises, uma vez que a diferença entre os grupos tratados foram pontuais e não entendeu-se às demais avaliações.

7. CONCLUSÃO

Os extratos bruto e da fração acetato de etila da *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca), na avaliações aguda e crônica, não alteraram o perfil lipídico dos animais induzidos à obesidade nem a atividade antioxidante, sendo observado um dano proteico (maiores níveis de proteína carbonilada) nos animais tratados com extrato bruto 300mg/kg e fração acetato de etila 30mg/kg e 300mg/kg. No entanto, o número de animais utilizados para as análises é baixo, sendo necessária a avaliação com um número maior de animais para conclusões mais assertivas.

8. REFERÊNCIAS

ALIAS, Norsyuhada et al. Anti-obesity Potential of Selected Tropical Plants via Pancreatic Lipase Inhibition. **Advances In Obesity, Weight Management & Control**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.122-131, 6 abr. 2017. MedCrave Group, LLC. <http://dx.doi.org/10.15406/aowmc.2017.06.00163>.

ALLOTT, Emma H; HURSTING, Stephen D. Obesity and cancer: mechanistic insights from transdisciplinary studies. **Endocrine-related Cancer**, [s.l.], v. 22, n. 6, p.365-386, 15 set. 2015. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/erc-15-0400>.

ARANHA, Jéssica Bomtorin; VIEIRA, Thais Maria Ferreira de Souza. Aplicação de extratos de acerola (*Malpighia emarginata*) em emulsões lipídicas. 2018.Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-22082018-104038/>

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA (Org.). Mapa da Obesidade. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade>>. Acesso em: 14 set. 2018.

BARAZZONI, Rocco et al. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. **Eating And Weight Disorders - Studies On Anorexia, Bulimia And Obesity**, [s.l.],10 v. 23, n. 2, p.149-157, 3 fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s40519-018-0481-6>.

BENZIE, Iris F.f.; STRAIN, J.j.. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 239, n. 1, p.70-76, jul. 1996. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

BETTERIDGE, D. John. What is oxidative stress? **Metabolism**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.3-8, fev. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0026-0495\(00\)80077-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0026-0495(00)80077-3).

BIRBEN, Esra et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.9-19, jan. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/wox.0b013e3182439613>.

BORGSTRÖM, Bengt. Mode of action of tetrahydrolipstatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Lipids And Lipid Metabolism**, [s.l.], v. 962, n. 3, p.308-316, out. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760\(88\)90260-3](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760(88)90260-3).

BRAY, G. A.; GREENWAY, F. L.. Pharmacological Treatment of the Overweight Patient. **Pharmacological Reviews**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.151-184, 22 mar. 2007. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/pr.59.2.2>.

BRAY, George A.; TARTAGLIA, Louis A.. Medicinal strategies in the treatment of obesity. **Nature**, [s.l.], v. 404, n. 6778, p.672-677, abr. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/35007544>.

CECHINEL FILHO, V. Medicamentos de origem vegetal: atualidades, desafios e perspectivas. Itajaí: UNIVALI, 2015. 192p.

CHOI, Ra-yeong et al. Heshouwu (*Polygonum multiflorum* Thunb.) ethanol extract suppresses pre-adipocytes differentiation in 3T3-L1 cells and adiposity in obese mice.

Biomedicine & Pharmacotherapy, [s.l.], v. 106, p.355-362, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.140>.

CHOU, Ya-chun; HO, Chi-tang; PAN, Min-hsiung. Immature *Citrus reticulata* Extract Promotes Browning of Beige Adipocytes in High-Fat Diet-Induced C57BL/6 Mice. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 66, n. 37, p.9697-9703, 27 ago. 2018.

American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02719>.

DANESCHVAR, Homayoun L.; ARONSON, Mark D.; SMETANA, Gerald W.. FDA Approved Anti-Obesity Drugs in the United States. **The American Journal Of Medicine**,

[s.l.], v. 129, n. 8, p.879-879, ago. 2016. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2016.02.009>.

DRENT, M. L.;VAN DER VEEN, E. A. Lipase Inhibition: a Lipase Inhibition: novel concept in the treatment of obesity. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.** [S.I.], v.17. p.241-44.11, 1993.

EBOT, Ericka M. et al. Gene expression profiling of prostate tissue identifies chromatin regulation as a potential link between obesity and lethal prostate cancer. **Cancer**, [s.l.], v. 123, n. 21, p.4130-4138, 12 jul. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.30831>.

FOLCH, Jordi et al. A Simple Method For The Isolation And Purification Of Total Lipides From Animal Tissues. **The Journal Of Biological Chemistry**, [s.i], v. 226, n. 1, p.497-509, 1 maio 1957. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/226/1/497.long>>. Acesso em: 17 set. 2018.

JAMES, W. Philip T. et al. Effect of Sibutramine on Cardiovascular Outcomes in Overweight and Obese Subjects. *New England Journal Of Medicine*, [s.l.], v. 363, n. 10, p.905-917, 2 set. 2010. **New England Journal of Medicine (NEJM/MMS)**.
<http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1003114>.

KAHN, Steven E.; HULL, Rebecca L.; UTZSCHNEIDER, Kristina M.. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, [s.l.], v. 444, n. 7121, p.840-846, dez. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05482>.

LYRAS, Leonidas et al. An Assessment of Oxidative Damage to Proteins, Lipids, and DNA in Brain from Patients with Alzheimer's Disease. *Journal Of Neurochemistry*, [s.l.], v. 68, n. 5, p.2061-2069, 18 nov. 2002. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.14714159.1997.68052061.x>.

MOURA, Márcio Hércules Caldas et al. Phenolic-rich jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) extracts prevent high-fat-sucrose diet-induced obesity in C57BL/6 mice. **Food Research International**, [s.l.], v. 107, p.48-60, maio 2018. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.071>.

OLIVEIRA, Clayton Z. et al. Anticoagulant and antifibrinolytic properties of the aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 98, n. 1-2, p.213-216, abr. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.12.028>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Facts about obesity, 2018. Disponível em:<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 08 set. 2018.

OLUSI, So. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. **International Journal Of Obesity**, [s.l.], v. 26, n. 9, p.1159-1164, 21 ago. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ijo.0802066>.

PEPATO, M.t et al. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocindiabetic rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 81, n. 2, p.191-197, jul. 2002.

Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00075-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00075-2).

SAMPAIO, Carolina Ferreira et al. Alcohol extract of *Bauhinia forficata* link reduces lipid peroxidation in the testis and epididymis of adult Wistar rats. **Microscopy Research And Technique**, [s.l.], v. 82, n. 4, p.345-351, 21 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.23175>.

