

**Universidade de Brasília - UnB**  
**Faculdade de Ciências da Saúde**

**Estudo químico biomonitorado de extratos das  
folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.  
para a identificação de agonista do Receptor  
Ativado por Proliferadores Peroxissomais - gama  
(PPAR $\gamma$ )**

**Brasília**  
**Dezembro/2014**

**Universidade de Brasília - UnB**  
**Faculdade de Ciências da Saúde**

**Estudo químico biomonitorado de extratos das  
folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.  
para a identificação de agonista do Receptor  
Ativado por Proliferadores Peroxissomais - gama  
(PPAR $\gamma$ )**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências  
da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à  
obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde

Orientador: Francisco de Assis Rocha Neves

**Brasília**  
**Dezembro/2014**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**“Estudo químico biomonitorado de extratos das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC. para a identificação de agonista do Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais - gama (PPAR $\gamma$ )”**

**CÍNTIA ALVES DE MATOS SILVA**

Tese aprovada pelos membros da banca examinadora constituída pelos professores:

---

Prof. Dr Francisco de Assis Rocha Neves (Orientador)

---

Profa Dra Dâmaris Silveira (Orientadora)

---

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

---

Profa Dra Maria de Fátima Borin

---

Profa Dra Yris Maria Fonseca

---

Profa Dra Paloma Michelle de Sales

**Brasília, 18 de dezembro de 2014**

“Sonho é a simulação daquilo que, se  
você quiser, pode virar realidade”

Autor desconhecido

Dedico esse trabalho aos meus pais, Antônio e Madalena, que em nenhum momento mediram esforço para me ajudar a concluí-lo

Sou imensamente grata por nascido nessa família.

Amo vocês eternamente!

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Francisco Neves e à minha co-orientadora Dâmaris Silveira, que me deram o norte para a realização desse trabalho. Aos colaboradores Maria de Fátima Borin, Luiz Simeoni que me ajudaram com dicas, com orientações.

Aos alunos de iniciação científica, Andressa Melo, Fabio Porto, Renata Amadeu, Jacqueline Figueiredo e Nayara Arruda, que se dedicaram com bastante empenho para obtenção de bons resultados.

À minha família, pai, mãe, irmãos, sogro e sogra que durante todo o período desse trabalho não mediram esforços para me ajudar, sem essa equipe seria impossível.

Ao meu esposo, Wendel Ribeiro, que durante o doutorado foi meu cúmplice, crescemos juntos e nos tornamos uma família com dois filhos lindos, saudáveis, Beatriz e Nicolás, verdadeiras dádivas de Deus.

Ao meu amigo e professor Luiz Simeoni que durante o tempo de doutorado pude ter a honra de auxiliar em suas aulas de Química Farmacêutica, onde aprendi muito, me diverti muito e cresci muito. Obrigada amigo, por ter ouvido meus choros e lamentações, vou guardar essa amizade no meu coração pra sempre.

Aos meus colegas de laboratório, tantos, mas, em especial, à Mariela, Flora, Rilva, Cristina, Angélica e Marie e Pedro que não permitiram que eu desistisse em nenhum momento nessa caminhada, foram verdadeiros amigos, nunca esquecerei!

À CAPES pelo financiamento, ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e ao Instituto de Química/UnB pelo apoio e utilização dos equipamentos

E a Deus, por ter me permitido conhecer tantas pessoas importantes e por viver tantas coisas em tão pouco tempo. Foram dias intensos, mas, que valeram à pena!

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
Resumo	1
Abstract	2
<b>CAPÍTULO 1: Introdução</b>	<b>3</b>
1.1 Revisão da literatura	6
1.2 O Gênero <i>Bauhinia</i>	21
1.3 <i>Bauhinia variegata</i>	23
1.4 <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>	34
1.5 Diabetes melito tipo II e PPAR $\gamma$	36
<b>CAPÍTULO 2: Objetivos</b>	<b>45</b>
2.1 - Objetivo Geral	46
2.2 - Objetivos Específicos	46
<b>CAPÍTULO 3: Material e Métodos</b>	<b>47</b>
3.1 - Descrição botânica	48
3.2 - Obtenção do material botânico	50
3.3 - Obtenção dos Extratos Brutos	50
3.3.1 - Obtenção do extrato etanólico bruto (BvEE)	50
3.3.2 - Obtenção do extrato aquoso bruto (BvEA)	50
3.4 - Fracionamento dos Extratos Brutos	51
3.4.1 - Fracionamento do extrato etanólico bruto (BvEE)	51
3.4.2 - Fracionamento do extrato aquoso bruto (BvEA)	52
3.5 - Análises cromatográficas	53
3.5.1 – Cromatografia líquida em coluna de sephadex LH-20	53

3.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)	53
3.5.3 - Cromatografia líquida em coluna de Sílica Gel (CC)	54
3.5.4 - Cromatografia em camada delgada (CCD)	54
3.6 – Reveladores	54
3.7 - Análises Espectrométricas	56
3.7.1 - Espectrometria de Infravermelho (IV)	56
3.7.2 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	56
3.8- Ensaios Biológicos	57
3.8.1 - Atividade agonista dos extratos, frações e substâncias isoladas de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC. ao receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama (PPAR $\gamma$ )	57
3.8.2 - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC pelo método de redução do complexo de fosfomolibdênio.	60
3.8.3 – Quantificação de polifenóis nos extratos aquosos de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> coletadas entre julho de 2008 a abril de 2009	62
3.8.4 – Quantificação de flavonoides nos extratos aquosos de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> coletadas entre julho de 2008 a abril de 2009.	63
3.8.5 - Avaliação do efeito de inibição de germinação do extrato de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC. em <i>Lactuca sativa</i>	64
<b>CAPÍTULO 4 – Resultados</b>	66
4.1 – Rendimentos dos extratos brutos obtidos de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC	67

4.2 – Análise da atividade agonista dos extratos aquosos brutos e frações obtidas de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>Variegata</i> DC. Ao receptor de PPAR $\gamma$	67
4.2.1 - Avaliação sazonal agonista do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>	67
4.2.1.1 - Testes em células U937 dos extratos aquosos de folhas coletadas entre o período de julho a dezembro de 2008.	67
4.2.1.2 - Testes em células mesangiais dos extratos aquosos de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> coletadas entre o período de janeiro a abril de 2009.	70
4.2.2 – Quantificação de polifenóis e flavonoides nos extratos aquosos de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC.	80
4.2.2.1 – Quantificação de polifenóis totais nos extratos aquosos das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu	80
4.2.2.2 – Quantificação de flavonoides nos extratos aquosos de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> pelo método de formação de complexos por cloreto de alumínio	82
4.2.3 – Análise, por CLAE-DAD, dos extratos aquosos de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> coletadas entre julho de 2008 a abril de 2009.	85
4.2.4 – Fracionamento do extrato aquoso e avaliação da atividade agonista das frações obtidas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC ao receptor de PPAR $\gamma$ em células mesangiais	89
4.2.4.1 – Avaliação da atividade agonista da fração aquosa obtida do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> ao receptor de PPAR $\gamma$ em células mesangiais.	92
4.2.4.2 – Avaliação da atividade agonista da fração clorofórmica obtida do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> ao receptor de	93

PPAR $\gamma$  em células mesangiais.

4.2.4.3 – Identificação e avaliação da atividade agonista da emulsão proveniente da fração aquosa obtida do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> ao receptor de PPAR $\gamma$ em células mesangiais.	94
4.2.4.4 – Avaliação da atividade agonista da fração acetato de etila obtida do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> ao receptor de PPAR $\gamma$ em células mesangiais.	99
4.2.4.5 – Fracionamento de da fração acetato de etila do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> em coluna de sephadex.	102
4.2.4.6 – Avaliação da atividade agonista das frações obtidas em coluna de Sephadex LH-20 fração acetato de etila do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> ao receptor de PPAR $\gamma$ em células mesangiais.	104
4.2.4.7– Identificação das substâncias presentes em Bv02	106
4.3 – Identificação e avaliação da atividade agonista do extrato etanólico de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> ao receptor PPAR $\gamma$ .	111
4.3.1. Estudo farmacognóstico preliminar do extrato etanólico de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>	111
4.3.2 - Avaliação da atividade agonista em PPAR $\gamma$ do extrato etanólico de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>	112

4.3.3 – Identificação das substâncias presente nas frações do no extrato etanólico (BvEE) das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> .	114
4.3.3.1 - Análise fitoquímica da fração hexânica (BvFH)	114
4.3.3.1.1 – Mistura de ácidos graxos de cadeia longa (Bv03)	115
4.3.3.1.2 – Mistura de álcoois de cadeia longa (Bv04)	116
4.3.3.2 - Análise fitoquímica da fração diclorometanólica (FD)	117
4.3.3.2.1 – Mistura de éster e álcoois de cadeia longa (Bv05)	118
4.3.3.2.2 – Mistura de ésteres de cadeia longa (Bv06)	119
4.3.4 - Avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> pelo método de redução do complexo de fosfomolibdênio.	122
4.3.5 - Quantificação de polifenóis e flavonoides no extrato etanólico e frações de folhas <i>B. variegata</i> var. <i>variegata</i> DC	123
4.4 - avaliação da atividade agonista de compostos presentes em <i>Bauhinia variegata</i> ao receptor PPAR $\gamma$ .	123
4.5 – Avaliação do efeito alelopático (inibição de germinação) do extrato de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC. em <i>Lactuca sativa</i> .	126
<b>CAPÍTULO 5: Conclusão</b>	133
<b>CAPÍTULO 6: Referências Bibliográficas</b>	136

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁG.
<b>Figura 01</b> – Rota Biossintética geral para flavonoides	08
<b>Figura 02</b> – Principais compostos isolados de <i>Bauhinia variegata</i> .	27
<b>Figura 03</b> - Organização estrutural dos domínios funcionais dos PPARs.	37
<b>Figura 04</b> - Estrutura cristalográfica do heterodímero PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$ em DNA e um fragmento de simetria cristalográfica relacionado ao complexo	38
<b>Figura 05</b> - Exemplo de transativação dependente do ligante.	39
<b>Figura 06</b> - Extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> aumenta a atividade transcricional mediada por PPAR $\gamma$ .	44
<b>Figura 07</b> - <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC	49
<b>Figura 08</b> - Partição líquido-líquido do extrato etanólico (BvEE) das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC.	51
<b>Figura 09</b> – Fracionamento do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var <i>variegata</i> DC.	52
<b>Figura 10</b> - Atividade agonista do extrato aquoso das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> coletadas em julho de 2008 ensaiada por co-transfecção em células U937.	71
<b>Figura 11</b> - Atividade agonista do extrato aquoso da folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> coletadas em julho de 2008 ensaiada por co-transfecção em células mesangiais	71
<b>Figura 12</b> - Atividade agonista dos extratos aquosos de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> (julho de 2008 a abril de 2009) na concentração de 100 $\mu$ g/mL	72
<b>Figura 13</b> - Atividade agonista dos extratos aquosos de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> (julho de 2008-abril de 2009) na concentração de 300 $\mu$ g/mL	73
<b>Figura 14</b> - Atividade agonista dos extratos aquosos de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> (julho de 2008-abril de 2009) na concentração de 700 $\mu$ g/mL	74
<b>Figura 15</b> - Atividade agonista dos extratos aquosos de <i>Bauhinia</i>	75

*variegata* var. *variegata* (julho de 2008-abril de 2009) na concentração de 900 µg/mL.

- Figura 16** - Correlação entre a taxa de ativação na concentração de 900µg/mL e o índice pluviométrico no período entre julho de 2008 a abril de 2009 79
- Figura 17** - Curva-padrão de ácido gálico submetida à reação com o reagente de Folin-Ciocalteu. 81
- Figura 18** - Curva-padrão de quercetina submetida à reação com cloreto de alumínio. 83
- Figura 19** - Cromatograma do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* referente ao pico no tR= 27,0 min em comparação ao padrão analítico rotina 87
- Figura 20** - Fracionamento do extrato aquoso de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* e biomonitoramento das frações com atividade agonista ao receptor de PPAR $\gamma$ . 89
- Figura 21** – Atividade agonista da fração solúvel em MeOH:H<sub>2</sub>O 2:3 do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* na concentração de 100, 300, 700 e 900µg/mL 90
- Figura 22** - Partição líquido-líquido fração solúvel em MeOH:H<sub>2</sub>O 2:3 do extrato aquoso de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* e biomonitoramento das frações com atividade agonista ao receptor de PPAR $\gamma$  91
- Figura 23** – Partição líquido-líquido fração solúvel em MeOH:H<sub>2</sub>O 2:3 do extrato aquoso de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* e biomonitoramento das frações com atividade agonista ao receptor de PPAR $\gamma$  92
- Figura 24** - Atividade agonista da fração clorofórmica do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* na concentração de 100, 300, 700 e 900µg/mL. 93

<b>Figura 25</b> - Espectro na região Infravermelho (KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) de Bv01	94
<b>Figura 26</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de Bv01 (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ).	95
<b>FIGURA 27</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de Bv01 – Expansão da região $\delta 4,5\text{-}\delta 7,0$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ).	96
<b>Figura 28</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de Bv01 (75 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ).	97
<b>Figura 29</b> - Cromatograma de Bv01 em CLAE - DAD da mistura açúcares	98
<b>Figura 30</b> - Atividade agonista de Bv01 (sólido branco obtido da fração aquosa do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> ) na concentração de 100, 300, 700 a 900 $\mu\text{g/mL}$	99
<b>Figura 31</b> - Partição fração acetato de etila do extrato aquoso de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> e biomonitoramento das frações com atividade agonista ao receptor de PPAR $\gamma$ .	100
<b>Figura 32</b> - Atividade agonista da fração acetato de etila do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> na concentração de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$	101
<b>Figura 33</b> - Atividade agonista do sobrenadante da fração acetato de etila do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> na concentração de 100, 300, 700 a 900 $\mu\text{g/mL}$ .	101
<b>Figura 34</b> - Atividade agonista do sobrenadante da fração acetato de etila do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ .	102
<b>Figura 35</b> - Cromatografia em Camada Delgada das frações obtidas da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC.	103
<b>Figura 36</b> – Atividade agonista das frações obtidas da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$	104
<b>Figura 37</b> - Atividade agonista das frações obtidas da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$	105

<b>Figura 38</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da fração Bv02 (300MHz, MeOD).	107
<b>Figura 39</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da fração Bv02. Expansão da região $\delta$ 4,1- $\delta$ 5,3 (300MHz, MeOD).	108
<b>Figura 40</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da fração Bv02 – expansão da região $\delta$ 3,3- $\delta$ 4,0 (300 MHz, MeOD).	108
<b>Figura 41</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da fração Bv02 – Expansão da região $\delta$ 145 - $\delta$ 210 (75MHz, MeOD).	109
<b>Figura 42</b> – Atividade agonista ao receptor PPAR $\gamma$ do extrato etanólico de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> nas concentração de 100 a 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$	113
<b>Figura 43</b> – Atividade agonista ao receptor PPAR $\gamma$ do extrato etanólico das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> nas concentração de 700 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .	114
<b>Figura 44</b> – Espectro na região do Infravermelho de Bv03 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ )	115
<b>Figura 45</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de Bv03 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	116
<b>Figura 46</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de Bv04 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	117
<b>Figura 47</b> - Espectro na região do Infravermelho de Bv05 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ ).	118
<b>Figura 48</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de Bv05 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	119
<b>Figura 49</b> - Espectro na região do Infravermelho de Bv06 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ ).	120
<b>Figura 50</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de Bv06 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	121
<b>Figura 51</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de Bv06 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).	121
<b>Figura 52</b> - Atividade agonista ao receptor PPAR $\gamma$ de compostos presentes em <i>Bauhinia variegata</i> nas concentrações de $10^{-4}$ e $10^{-5}\text{M}$ .	126
<b>Figura 53</b> - Percentual de sementes germinadas expostas a diferentes concentrações de frações do extrato etanólico de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> em relação aos grupos controle	127

## LISTA DE TABELAS

TABELAS	PÁG.
<b>Tabela 01.</b> Principais flavonoides isolados de plantas	09
<b>Tabela 02.</b> Expressão das isoformas dos Receptores Ativado por Proliferadores Peroxissomais (PPAR) nos tecidos e suas principais funções.	43
<b>Tabela 03.</b> Rendimentos dos extratos brutos das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC	67
<b>Tabela 04.</b> Atividade agonista ao PPAR $\gamma$ dos extratos aquosos de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC. coletada no período de julho a dezembro de 2008	69
<b>Tabela 05.</b> Taxas de ativação dos extratos aquosos de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> (julho de 2008 a abril de 2009).	76
<b>Tabela 06.</b> Comparação entre a taxa de ativação nas concentrações de 700 e 900 $\mu$ g/mL e os dados meteorológicos do período de julho de 2008 a abril de 2009.	77
<b>Tabela 07.</b> Correlação entre taxa de ativação no receptor de PPAR $\gamma$ apresentada pelos extratos das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC. coletadas no período entre julho de 2008 e abril de 2009 e dados meteorológicos no mesmo período.	79
<b>Tabela 08.</b> Valores das densidades ópticas obtidas para as diferentes concentrações de ácido gálico submetidas à reação com o reagente de Folin-Ciocalteu.	81
<b>Tabela 09.</b> Quantificação de polifenóis nos extratos aquosos das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> coletadas entre julho/2008 a abril/2009.	82
<b>Tabela 10.</b> Valores das densidades ópticas obtidas para as diferentes concentrações de quercetina submetidas à reação com o cloreto de alumínio	83
<b>Tabela 11.</b> Quantificação de flavonoides nos extratos aquosos das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> coletadas entre julho/2008 a abril/2009.	84

<b>Tabela 12.</b> Correlação entre quantidade de polifenóis e flavonoides, taxa de ativação em PPAR $\gamma$ das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC coletadas entre julho de 2008 e abril de 2009 e as condições meteorológica nesse mesmo período	85
<b>Tabela 13.</b> Avaliação da relação entre composição química de extratos aquosos de folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC. e a atividade agonista em PPAR $\gamma$ (análise por CLAE-DAD em comparação com padrões selecionados)	88
<b>Tabela 14.</b> Comparação entre os sinais encontrados no espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de Bv01 e sinais encontrados na literatura para sacarose, $\beta$ -D-galactose e $\beta$ -D-frutose	97
<b>Tabela 15.</b> Rendimentos das frações obtidas em coluna de Sephadex LH-20 da fração acetato de etila do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> .	103
<b>Tabela 16.</b> Deslocamentos químicos ( $\delta$ , 75 MHz, MeOH) dos carbonos de Bv02 em comparação com os dados da literatura ( $\delta$ , 75 MHz, MeOH)	110
<b>Tabela 17.</b> Estudo farmacognóstico preliminar do extrato etanólico bruto e frações das folhas <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC	112
<b>Tabela 18.</b> A atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC em comparação com quercetina, BHT e ácido ascórbico.	122
<b>Tabela 19.</b> Quantidade de polifenóis e flavonoides nos extratos e frações das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i> DC.	123

## LISTA DE ABREVIATURAS

BvEA	Extrato aquoso bruto das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>
BvEE	Extrato etanólico bruto das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>
BvFD	Fração diclorometanólica do extrato aquoso
BvFH	Fração hexânica do extrato aquoso
BvFHM	Fração hidrometanólica do extrato aquoso
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de Alta Eficiência com detectores arranjo diodos
CMV	Citomegalovírus
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DMEN	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
FAcEA	Fração acetato de etila do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>
FAEA	Fração aquosa do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>
FCEA	Fração clorofórmica do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>
FHEA	Fração hexânica do extrato aquoso de <i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>
IV	Infravermelho
LBD	Domínio de ligação ao ligante
MeOD	Metanol Deuterado
PPAR	Receptor ativado por proliferadores peroxissomais
PPRE-Luc	Elemento responsivo do PPAR fusionado com gene que codifica Luciferase
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPMI	Meios Roswell Park Memorial Institut
UV	Ultravioleta

## RESUMO

No Brasil plantas medicinais é extensamente utilizado para o tratamento de diversas patologias como, por exemplo, o uso da pata de vaca (gênero *Bauhinia*) para o controle da glicemia de pacientes diabéticos. Os mecanismos farmacológicos envolvidos no tratamento do diabetes tipo II com “pata de vaca” não são bem conhecidos. Estudos prévios de nosso grupo demonstraram que extrato aquoso de folhas de *Bauhinia* contém agonistas dos receptores proliferadores peroxissomais gama (PPAR $\gamma$ ). No presente trabalho, investigamos o efeito da sazonalidade no efeito agonista de PPAR $\gamma$  do extrato de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC (BvEA), assim como realizamos um estudo químico biomonitorado de BvEA para identificação de agonistas do PPAR $\gamma$ . Nossos resultados mostraram que os extratos aquosos de folhas de BvEA coletadas entre julho/2008 a abril/2009 promoveram a ativação no receptor de PPAR $\gamma$  de forma sazonal. Foi observado um aumento significativo da atividade agonista sobre PPAR $\gamma$  quando a coleta foi realizada nos períodos de menor índice pluviométrico e umidade do ar assim como de um maior período de insolação. Também realizamos, nos extratos obtidos, a quantificação do teor de flavonoides e polifenóis totais e a caracterização química, por meio de métodos cromatográficos e espectrométricos, que permitiu a identificação do flavonoide rutina. Porém, apesar de a presença e o teor de flavonoides e outros polifenóis também serem dependentes da variação sazonal, o maior ou menor teor não se associou à taxa de ativação em PPAR $\gamma$  produzida pelos extratos. O fracionamento biomonitorado de BvEA com atividade farmacológica agonista sobre PPAR $\gamma$ , permitiu a identificação da fração Bv02 como sendo a que contém o composto responsável por essa ativação agonista. Bv02 corresponde à fração acetato de etila oriunda do extrato aquoso. Essa amostra tem na sua composição a isoquercitrina como composto majoritário, porém, quando testado em sua forma pura, esse flavonoide não ativou PPAR $\gamma$ , podendo-se concluir que esse composto isoladamente não atua na atividade de PPAR $\gamma$  produzida pelas folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC. A identificação do(s) composto(s) responsável(eis) pela atividade do extrato aquoso das folhas de *B. variegata* var. *variegata*, torna-se necessária, uma vez que trará uma grande contribuição para o desenvolvimento de novas drogas para o tratametno do diabetes tipo 2 assim como para melhorar a compreensão do efeito antidiabético dessa espécie,

## ABSTRACT

In Brazil, the use of medicinal plants is widely spread for the treatment of various pathologies, such as the use of Cow's foot (from *Bauhinia* genus) for glycemic control in diabetic patients. The pharmacological mechanisms involved in the treatment of type 2 diabetes by cow's foot are not well known. Previous studies from our group have shown that the aqueous extract of *Bauhinia* leaves contains agonists of peroxisome proliferator receptor gamma (PPAR $\gamma$ ). In this study, we investigated the effect of seasonality in PPAR $\gamma$  agonist effect of leaf extracts of *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC (BvEA) as well as a bioassay-guided study of the BvEA was carried out for identification of PPAR $\gamma$  agonist. Our results showed that the aqueous extracts of BvEA leaves collected between July/2008 to April/2009 promoted se activation of PPAR $\gamma$ , with seasonal dependence. There was a significant increase in agonist activity on PPAR $\gamma$  when leaves were collected during periods of lower rainfall and humidity as well as longer insolation period. The characterization of these extracts led to identification of flavonoid rutin. Also, total flavonoids and polyphenols content evaluation was done for each extract. However, despite all these compounds show a seasonal variation, the higher or lower content was not associated to the activation rate PPAR $\gamma$  produced by extracts. The fractionation of BvEA bioassay-guided by pharmacological activity on PPAR $\gamma$  allowed the identification of Bv02 fraction which was extracted from the ethyl acetate fraction derived from the aqueous extract, which contains as the compound responsible for that agonist activation. The sample has constituted the isoquercitrin as major compound, however, this flavonoid when tested pure, did not activate the receptor. Therefore may be concluded that isoquercitrin does not act alone in PPAR $\gamma$  activity produced by the *Bauhinia variegata* var. DC *variegata*. The identification of the compound responsible for the activity of the aqueous extract from *B. variegata* var. *variegata* leaves, becomes necessary since that it will bring a great contribution to the development of new drugs for type 2 diabetes treatment and to improve the understanding of the antidiabetic effect of this species

# Capítulo 1: Introdução

## 1 – INTRODUÇÃO

Ao longo de milhares de anos, o uso de plantas para fins medicinais tem sido realizado como escolha mais óbvia na busca de fármacos terapêuticamente eficazes. O reino vegetal constitui um tesouro de fármacos em potencial e traz recursos eficientes para melhorar as condições de vida humana, aumentando suas chances de sobrevivência; e a natureza tem oferecido ao homem uma grande quantidade de plantas com valores medicinais. Esse conhecimento, antes apenas empírico, atualmente é embasado em pesquisas científicas que podem comprovar as propriedades medicinais de várias plantas, atestando inclusive a sua eficácia (1). Com isso a prática da fitoterapia vem recebendo amparo legal significativo nos últimos anos (2, 3).

A medicina popular, principalmente aquela com base em plantas medicinais, tem seu uso acentuado em todas as partes do mundo, mostrando uma importância econômica crescente, especialmente nos países em desenvolvimento onde o serviço de saúde é pouco acessível e limitado (4). De alguma forma, o homem percebeu que o consumo de plantas seja na forma *in natura*, ou como chás, garrafadas, etc., pode trazer benefícios à saúde.

A OMS (Organização Mundial de Saúde) reconhece que, embora a medicina moderna esteja desenvolvida em grande parte do mundo, a população, especialmente a de países em desenvolvimento, depende da medicina tradicional para sua atenção primária, sendo que cerca de 80% utilizam práticas tradicionais nos cuidados básicos à saúde, onde plantas ou preparações destas são utilizadas em 85% dos casos (3, 5).

Em 1991 a OMS solicitou que os Estados-membros intensificassem a cooperação entre praticantes da medicina popular e da assistência sanitária moderna, principalmente no que se refere ao uso de remédios tradicionais com eficácia científica demonstrada. Sugeriu, ainda, que produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas, poderiam conduzir ao descobrimento de novas substâncias terapêuticas, reconhecendo assim, as práticas populares de uso de plantas medicinais e remédios caseiros (5).

Na pesquisa farmacológica e no desenvolvimento de novos fármacos, as plantas medicinais têm grande importância, não somente quando seus

constituintes são usados como agentes terapêuticos, mas também, como matérias-primas para a síntese ou modelos para compostos farmacologicamente ativos. Acredita-se que cerca de 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo que 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (6).

A maior parte das espécies de plantas superiores é capaz de biossintetizar e de acumular metabólitos secundários com atividade biológica em quantidades suficientes para serem extraídos de forma econômica. Compostos de plantas são utilizados nas indústrias farmacêuticas, cosméticas de alimentos e agroquímicas, porém somente 5 a 15% das 250.000 a 500.000 espécies de plantas superiores têm sido objeto de estudo quanto à composição química e à atividade biológica dos seus metabólitos (7).

Portanto, torna-se cada vez mais necessário o conhecimento do uso tradicional das plantas medicinais, para que se tenham pistas importantes de compostos ativos.

O emprego das plantas medicinais sempre esteve relacionado com o misticismo e com a religião. Por exemplo, acreditava-se que a semelhança da planta com os órgãos afetados era uma indicação de que tal planta poderia ser empregada com a finalidade medicinal; era a *Doutrina da Assinatura*, isto é, deus indicava a planta que curaria uma determinada doença por um sinal, baseando-se na semelhança entre as formas, aspectos e cores das plantas e as moléstias que os médicos se propunham a curar. Assim, a hepática, cuja forma se assemelha ao fígado, seria indicada para combater os males daquele órgão; o açafraão, pela sua cor amarela curaria a icterícia (8).

No Brasil, o intenso contato mantido entre os jesuítas e os índios permitiram a identificação, a coleta, manipulação e o emprego das drogas vegetais. Além disso, os jesuítas as testavam, ao mesmo tempo em que desenvolviam fórmulas próprias, mais tarde catalogadas em um manuscrito intitulado *Coleção de receitas*, encontrado nas boticas de cada colégio da Companhia de Jesus. Esse documento representou o Código Farmacêutico Brasileiro até o final do século XVIII (9).

Eles também foram os responsáveis pela Teriaga Brasileira. A Teriaga era um medicamento complexo prescrito para a cura de diversas doenças,

principalmente mordida de cobras. A sua fórmula manteve-se secreta até depois da expulsão dos jesuítas do Brasil em 1759. A sua composição foi divulgada na *Coleção de várias receitas da Companhia de Jesus, da Índia, de Macao e do Brasil*, publicada em Roma em 1766. Então, foi revelado que tal panaceia era composta por vegetais do Brasil (raiz de pamajarioba), de Portugal (raiz de junca, de malvaisco, de ácoro, etc.), da Índia (canela, noz-moscada, ópio, incenso, mirra e almécega) mel, cravo, e ainda óleos e sais (9)

Ehrlich e Wilson (1991) apresentaram três razões para preservar o meio ambiente. A primeira é ética e estética; a segunda é que a humanidade já obteve enormes resultados do uso da biodiversidade como alimentos, remédios e outros produtos industriais; e a terceira, a mais importante é a manutenção do equilíbrio entre os organismos que constituem o meio ambiente (10).

Apesar da grande diversidade de espécies vegetais e animais presentes no planeta, acredita-se que grande parte ainda não foi identificada, nem estudada, pelos pesquisadores, quanto suas propriedades medicinais e toxicológicas. Dessa forma, fica claro que uma das grandes preocupações é com a perda dessa biodiversidade, pois ela pode ser fonte de um desenvolvimento científico e econômico.

Com um valor aproximado de 20% do total de espécies do planeta, o Brasil é um dos países com a maior biodiversidade do mundo, sendo descritas mais de 55 mil espécies vegetais descritas, o que corresponde a 22% do total mundial (11). A flora brasileira é uma rica fonte de fitofármacos que podem auxiliar no tratamento e prevenção de vários males.

### **1.1 Revisão da literatura**

O ambiente físico desempenha um papel considerável no crescimento, desenvolvimento e na produtividade das plantas, promovendo alterações físicas e químicas no metabolismo vegetal (12). As características de plantas e suas relações com fatores ambientais têm sido descritas com o objetivo de promover comparações em nível global (13).

Organismos vegetais exibem variações não genéticas em sua morfologia e fisiologia em resposta à variação ambiental. Esse fenômeno, conhecido como plasticidade fenotípica, é responsável pelos diferentes padrões de crescimento

e desenvolvimento das espécies que vivem em diferentes ecossistemas (12). O padrão de comportamento das espécies vegetativas é dependente de uma interação entre fatores edafoclimáticos e de características peculiares desta vegetação (14).

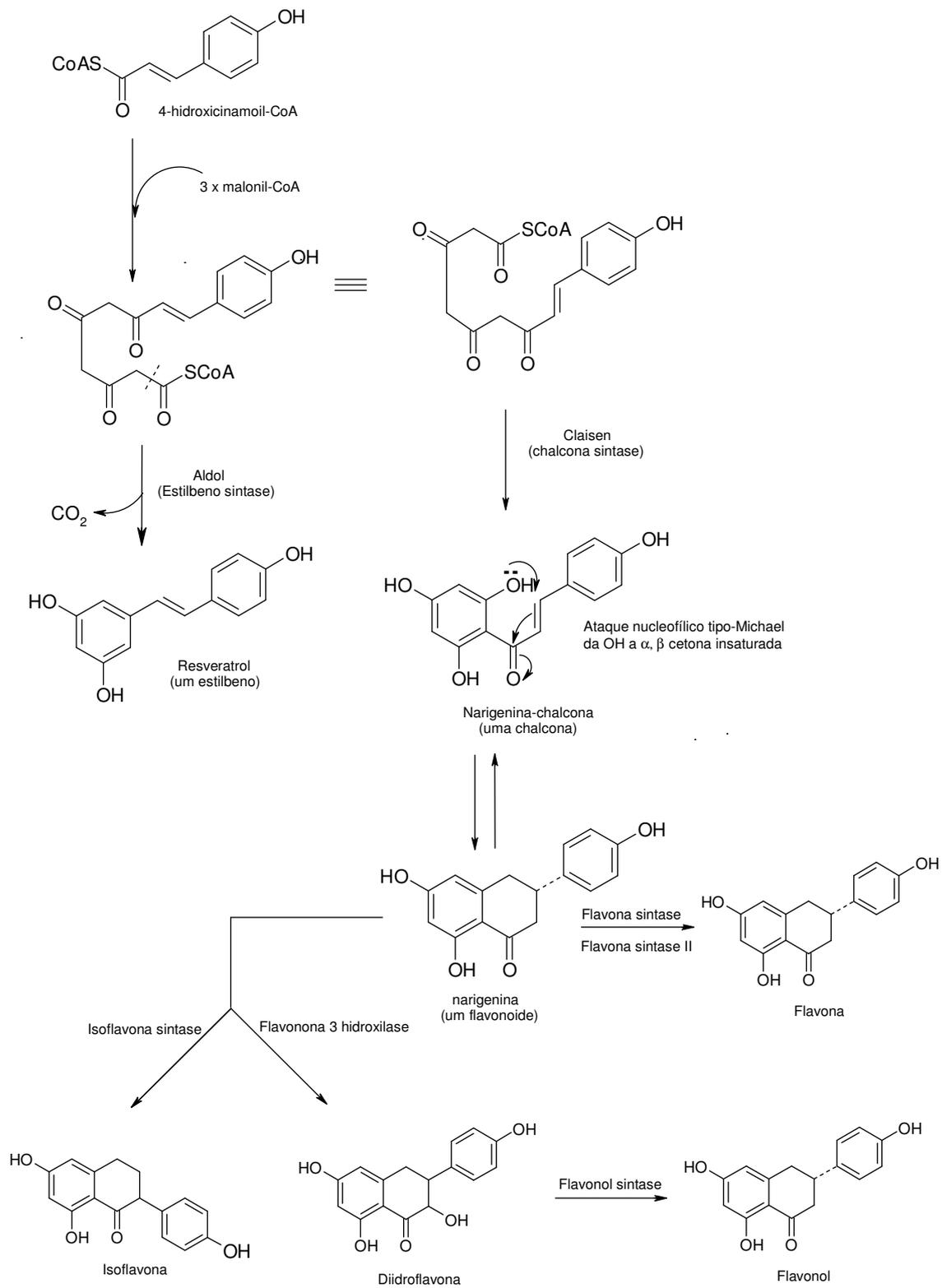
Características foliares são frequentemente citadas como principais indicadores no relacionamento do uso de recursos pelas plantas, biomassa e funcionamento do ecossistema, por serem de fácil quantificação e estarem fortemente relacionadas à fisiologia das plantas (13). E diversos fatores ambientais, como sazonalidade, radiação, temperatura e umidade podem modificar o metabolismo secundário vegetal, interferindo quantitativamente e/ou qualitativamente na produção de compostos. (15, 16), incluindo os teores de vários grupos fenólicos, principalmente flavonoides, quando monitorados em diversas estações do ano (16, 17).

Os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal e são amplamente distribuídos no reino vegetal. Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas tais como, proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microorganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática (18).

A principal rota biossintética dos flavonoides tem como ponto de partida comum a formação da flavona narigenina (**Figura 01**), que por meio de uma série de reações dará origem aos mais diferentes tipos de flavonoides, nas mais diversas classes reunindo cerca de 600 compostos diferentes (19).

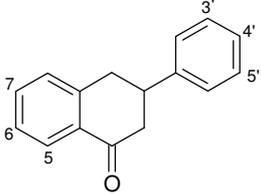
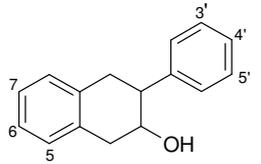
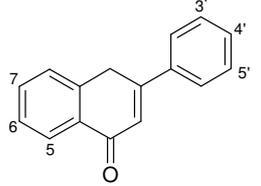
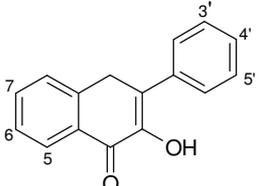
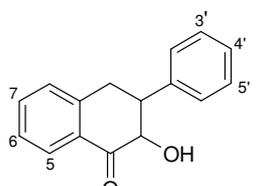
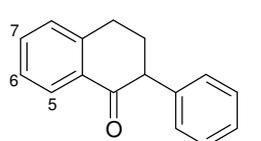
Os aminoácidos, fenilalanina e tirosina, além do malonato, são os compostos precursores dos flavonoides. Todos podem ser gerados a partir das rotas catabólicas dos carboidratos (19).

Atualmente mais de 6000 diferentes flavonoides foram descritos sendo suas maiores classes os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, diidroflavonis e chalconas (18). Os principais compostos isolados de plantas estão escritos a seguir (**Tabela 01**)



**Figura 01 – Rota Biossintética geral para flavonoides (20).**

**Tabela 01.** Principais flavonoides isolados de plantas:

Fórmula estrutural	Flavonoides	Substituições					
		5	6	7	3'	4'	5'
	Eriodictiol	OH	H	OH	H	OH	OH
	Hesperidina	OH	H	OR1	OH	OMe	OH
	Narigenina	OH	H	OH	H	OH	H
Flavanona							
	Catequina	OH	H	OH	OH	OH	H
	galocatequina	OH	H	OH	OH	OH	OH
Flavonol							
	Apigenina	OH	H	OH	H	OH	H
	Crisina	OH	H	OH	H	H	H
	Luteolina	OH	H	OH	OH	OH	H
Flavona							
	Kaempferol	OH	H	OH	H	OH	H
	Miricitrina	OH	H	OH	OH	OH	OH
	quercetina	OH	H	OH	H	OH	OH
flavonol							
	taxifolina	OH	H	OH	H	OH	OH
flavonol							
	Daidazina	H	H	OR2	H	OH	H
	Ginesteína	OH	H	OH	H	OH	H
	Gliciteína	OH	OMe	OH	H	OH	
Isoflavona							

R1 = rutinosídeo, R2 = glicopiranosídeo

Dentre esses está a quercetina. Esse flavonoide foi identificado pela primeira vez como vitamina P e, juntamente com a vitamina C, teve sua ação comprovada na manutenção da resistência e da integridade da parede dos capilares sanguíneos. Em seguida, diversos registros atestaram as propriedades farmacológicas da quercetina que a faz atuar de forma benéfica sobre os sistemas biológicos (21).

A quercetina é o flavonol mais comum na dieta. Está presente em várias frutas e legumes. A cebola, por exemplo, possui uma grande concentração de quercetina, porém vários outros alimentos são fontes, como chás, vinho, maçãs, bagas, etc (22).

Ela está presente nas plantas, em muitas formas glicosídicas diferentes, como a quercetina-3-rutinosídeo, rutina, que é uma das formas mais comuns (22).

A principal atividade biológica desse flavonoide é a antioxidante, porém na literatura podem ser encontrados relatos de atividade anticarcinogênica, anti-inflamatória, anti-agregante e vasodilatadora. Os mecanismos desses efeitos são em grande parte, desconhecidos, porém, existem algumas teorias que afirmam que a atividade antioxidante pode ser por um resultado da quelatação de metal, de eliminação de radicais, por inibição enzimática e/ou a indução da expressão de enzimas de proteção. A atividade anticarcinogênica, pode resultar da inibição enzimática e antioxidante (22).

Quanto ao efeito anticarcinogênico, deve-se salientar que em 1970, a quercetina foi efetivamente considerada cancerígena, por apresentar resultado positivo no teste de mutagenicidade de Ames (23). No entanto uma série de estudo em longo prazo, com animais de diferentes espécies, não comprovou a toxicidade. Ao contrário, a quercetina mostrou inibição à carcinogênese nesses animais (22).

Estudos sugerem que o estresse oxidativo esteja envolvido na patogênese do diabetes melito, doença que exhibe uma elevada prevalência e incidência na população do mundo inteiro. Com o objetivo de investigar a ação do antioxidante quercetina sobre o estresse oxidativo, a ativação do fator de transcrição nuclear mapa B (NF- $\kappa$ B) e expressão do óxido nítrico sintase reduzível (hinos) hepática no modelo experimental de DM tipo I, a quercetina

foi administrada intraperitonealmente em ratos machos com diabetes induzida por estreptozotocina (24).

Os resultados mostraram que quando comparados com o controle, ratos que foram tratados com quercetina apresentaram uma diminuição nos níveis dos marcadores do estresse oxidativo e na atividade hepática das enzimas antioxidante catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD), e ainda atenuou os níveis da ativação do NF- $\kappa$ B, e a expressão do iNOS, mostrando que o tratamento com o antioxidante quercetina parece inibir as vias sinalizadoras de transdução podendo interferir na produção de mediadores nocivos envolvidos nesse modelo experimental de Diabetes melito (24).

Resultados semelhantes foram encontrados em outro estudo. Coskun *et al.* (2005), observaram o efeito da quercetina (15 mg/kg/dia), administrada intraperitonealmente em ratos com diabetes, sobre enzimas antioxidantes, como glutatona-peroxidase (GSHPX), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), em homogeneizados pancreáticos. Além disso, também foram medidos os níveis séricos de óxido nítrico (NO) e os níveis pancreáticos de malondialdeído (MDA), que é um marcador de peroxidação lipídica. Os animais com diabetes induzida apresentaram desequilíbrio nos níveis séricos e enzimáticos testados, porém, o tratamento com a quercetina, além de diminuir significativamente o MDA, aumentou a atividade das enzimas antioxidantes. E no teste imuno-histoquímico foi observado que os ratos diabéticos tinham preservadas a integridade das células  $\beta$ -pancreáticas (25).

Várias estratégias terapêuticas têm demonstrado que o tratamento com a quercetina pode prevenir a formação ou neutralizar as espécies radiculares oriundas do estresse oxidativo, atenuando ou evitando as complicações características do Diabetes melito.

No estado pré-diabético já é possível notar um nível antioxidativo anormal, devido à tolerância prejudicada à glicose, podendo contribuir para o aumento do risco de doenças coronárias em pacientes nesta condição. A diminuição da peroxidação lipídica e o aumento do nível antioxidativo por meio de uma suplementação alimentar pode ser um mecanismo auxiliar na prevenção das complicações diabéticas

Alves *et al.* (2010) citaram que o efeito da quercetina tem sido extensivamente pesquisado em condições de diabetes melito e nas

complicações causadas pelo estresse oxidativo tanto *in vivo* como *in vitro*. Esse flavonoide foi capaz de reverter a concentração da glutathiona oxidada no cérebro e a atividade da peroxidase hepática. Relataram ainda um estudo para verificar se o tratamento subagudo com os antioxidantes combinados quercetina e coenzima Q10, na dosagem de 10 mg/Kg/dia, via intraperitoneal, por quatorze dias, afetava a atividade das enzimas antioxidantes em ratos normais e diabéticos induzidos por estreptozotocina. Para tal estudo, utilizados tecidos retirados do fígado, rim, coração e cérebro, para determinação da atividade da catalase, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase, e as concentrações de glutathiona reduzida e oxidada. No fígado dos ratos diabéticos, foi observada uma diminuição significativa das atividades das enzimas superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, glutathiona reduzida e oxidada, e esses efeitos não foram revertidos quando os antioxidantes foram administrados. Nos rins dos ratos diabéticos, a atividade da glutathiona peroxidase aumentou quando comparada com ratos normais e também neste caso o tratamento com os antioxidantes não retornou a atividade da enzima. No coração dos ratos diabéticos, a atividade da catalase aumentou e ela foi restaurada a níveis normais após o efeito combinado de quercetina e coenzima Q10. A superóxido dismutase cardíaca, por sua vez, teve uma atividade menor em ratos tratados com quercetina e coenzima Q10. No entanto, os resultados sugeriram que a quercetina pode ser eficaz em reverter alguns efeitos do diabetes (21, 26).

A hiperglicemia está diretamente associada à produção de estresse oxidativo, bem como a alterações morfológicas e funcionais provocadas pelo excesso de radicais livres. Na dose de 50 mg/kg, a quercetina pode atuar como um antioxidante e um agente anti-inflamatório em ratos com diabetes induzida, tornando-se um adjuvante promissor no tratamento do diabetes melito (27). Ainda, a quercetina foi capaz influir sobre o metabolismo lipídico, diminuindo o risco de desenvolvimento de doenças vasculares.

Outro estudo mostrou que a administração de antioxidante durante a gravidez, pode ser importante na prevenção de má-formação congênita. E em animais diabéticos tratados com quercetina foi possível observar a diminuição ou a prevenção da opacidade do cristalino, por meio da inibição da formação

de peróxido de hidrogênio e as reações da aldose redutase que resultavam na formação de sorbitol, evitando desta maneira, a formação da catarata (21).

Em outro teste, ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, receberam quercetina (10 mg/kg/dia) intraperitonealmente, tiveram um aumento da liberação de insulina e a regeneração de ilhéus pancreáticos, apresentando mais uma vez os efeitos benéficos anti-diabéticos (28).

Ratos foram divididos em dois grupos: aqueles que tiveram deficiência de insulina induzida por estreptozotocina, e o grupo com resistência à insulina induzida por 12 semanas. Aos dois grupos foi administrada com água potável adicionada de 10% de frutose. A quercetina foi administrada diariamente nas últimas seis semanas do experimento, em suspensão aquosa, por sonda oral. Em seguida, foi registrada a pressão arterial da cauda (PA), curva de concentração-resposta para fenilefrina (PE); KCl foi verificado em anéis da aorta torácica. Também foram determinados níveis de glicose (não-jejum), insulina sérica, índice de resistência à insulina, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e proteína C-reativa (PCR). Os resultados mostraram que a quercetina protegeu contra a vasoconstrição induzida pelo diabetes exacerbado e também foi capaz de reduzir a pressão arterial sanguínea na hipertensão. Adicionalmente, a quercetina inibiu o diabetes associado à infiltração de leucócitos adventícia, picnose endotelial e aumento da deposição de colágeno. Esses efeitos foram acompanhados pela redução do nível séricos de TNF $\alpha$  e PCR. Porém, a quercetina não afetou o nível de glicose em qualquer um dos modelos diabéticos testados, sugerindo que o efeito protetor da quercetina é mediado pelo seu efeito anti-inflamatório e não os seus metabólitos. Ou seja, a quercetina é um potencial candidato a prevenir complicações vasculares diabéticas em condições de deficiência e resistência à insulina, através do seu efeito inibitório sobre vias inflamatórias, especialmente de sinalização de NF- $\kappa$ B (29).

Com o objetivo de avaliar o potencial de quercetina em amortecer a glicemia pós-prandial, vinte e quatro pacientes diabéticos tipo II foram divididos em dois grupos que receberam glicose ou maltose. O nível de glicose no sangue foi medido e após 30 minutos os pacientes foram tratados com quercetina (400mg por via oral) e placebo. Os resultados mostraram que os pacientes que receberam maltose e foram tratados com quercetina tiveram o

nível hiperglicêmico normalizado; porém, os resultados não foram significativos em pacientes tratados com glicose. Com base nos resultados, os autores concluíram que a quercetina suprime eficazmente a hiperglicemia pós-prandial em pacientes com diabetes melito tipo II carregado com maltose, o que pode ser atribuído à inibição da  $\alpha$ -glicosidase (30). Ou seja, a quercetina pode ser usada como potencial complemento para o tratamento da hiperglicemia pós-prandial (31)

A quercetina também melhorou a absorção de glicose e da sensibilidade à insulina em células do músculo esquelético por meio das duas vias de sinalização independentes de Akt (proteína quinase B) e da AMPK (proteína quinase ativada por AMP). Porém quando utilizado o glicosídeo quercitrina (quercetina-3-ramnosila) o resultado não foi significativo (32). A quercetina influencia positivamente o metabolismo da glicose no fígado e músculo esquelético, mostrando que esse flavonoide parece ser um candidato terapêutico promissor para o tratamento do diabetes melito tipo II (33).

Tanto a quercetina, como a quercitrina, foram testadas em lesões de células- $\beta$  induzidas por citocinas em células de insulinoma de rato RINm5F. A viabilidade celular, a secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS), as espécies reativas de oxigênio (ROS intracelular), óxido nítrico e a inflamação ou a expressão de proteína associada à apoptose foram medidos com ou sem o tratamento com quercetina/quercitrina. Os resultados mostraram que quercetina/quercitrina diminuiu a morte celular provocada por citocinas, melhorou o GSIS, além de inibir a ROS, mostrando que esses flavonoides são candidatos a agentes anti-diabéticos, sendo a quercetina com melhor desempenho que a quercitrina (34).

Uma dieta contendo 0,04% ou 0,08% de quercetina foi administrada por 6 semanas a camundongos C57BL/KsJdb/db que tiveram uma indução de diabetes melito tipo 2. Após esse período, foi observada uma redução significativa de glicose no plasma; além disso, a dose mais alta de quercetina aumentou a adiponectina plasmática em comparação aos controles, e diminuiu triglicerídeos e colesterol total, além de promover aumento do colesterol HDL. Foi observado também que tanto a dose mais alta quanto a mais baixa reduziram as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e níveis elevados de

atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) no fígado (35).

Outro estudo mostrou que a quercetina apresentou resultados semelhantes aos apresentados pelas rosiglitazona quando administrados em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (36).

*Fagopyrum tataricum* (trigo) é bastante utilizado para o tratamento de diabetes melito tipo II em Taiwan. Com o objetivo de avaliar o efeito antihiperlipidêmico e de resistência à insulina em hepatócitos FL83B e pela alta de glicose em camundongos, foi administrado o extrato etanólico de trigo. Quercetina e rutina também foram utilizadas nesse tratamento, pois se tratam dos principais compostos encontrados no trigo. Os resultados mostraram que o tratamento com extrato de trigo, a rutina ou rutina+quercetina melhoraram significativamente a absorção de 2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ila)amino]-2-desoxi-*D*-glicose) via Akt promovendo a fosforilação e evitando também a degradação de PPAR $\gamma$  causada pela indução de alta glicose por 48h em hepatócitos FL83B (37).

Outro estudo foi realizado para observar se a quercetina melhora a função renal através de um efeito sobre as expressões de TGF- $\beta$ 1 e CTGF em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Os ratos foram divididos em grupos diabéticos e grupo de terapia com quercetina. Os ratos diabéticos apresentaram aumentos significativos nos níveis de glicose no sangue e aumento de peso dos rins e peso corporal, excreção de albumina em urina, creatinina sérica e ureia. Com a administração de quercetina, todos esses níveis foram melhorados, exceto a glicose no sangue, quando comparados com o controle. Também foram atenuadas as expressões de TGF- $\beta$ 1 e CYGF nos tecidos renais dos ratos com diabetes, mostrando que esse flavonoide pode melhorar a função renal de ratos diabéticos (38) e prevenir efeitos danosos nos rins por diminuir a apoptose celular, sendo efetivo no tratamento da diabetes (39)

Ratos com diabetes induzida por estreptozotocina tiveram uma diminuição na atividade específica de N-acetil- $\beta$ -*D*-glicosaminidase no fígado, quando tratados com quercetina e curcumina. A alta da atividade de  $\beta$ -*D*-glicuronidase que foi observada no cérebro desses animais, foi diminuída com a administração de curcumina ( $0,75 \pm 0,05$  nmol/mg/proteína/min) e quercetina

( $0,74 \pm 0,11$  nmol/mg/proteína/min). Também foi observada uma melhora de 68% (administração de quercetina) e 58% (administração de curcumina) no baço dos ratos em comparação com o controle (40).

Ratos com diabetes que tiveram uma suplementação com quercetina apresentaram um alívio nos danos causados pela diabetes. A quercetina promoveu um efeito neuroprotetor e reduziu a perda glial entérica no duodeno (41).

Ratos machos Sprague Dawley tiveram diabetes induzida por estreptozotocina e posteriormente receberam um tratamento com pioglitazona, raiz de salvia ou quercetina durante oito semanas. O grupo controle apresentou alteração do peso corporal, aumento do peso dos rins, além de alteração na urina, aumento da acumulação de matriz extracelular glomerular, aumento da expressão renal de ubiquitina e NF9k $\beta$ 65. O tratamento com pioglitazona, com a raiz de salvia ou com a quercetina, melhorou significativamente estas alterações patológicas; além disso, reduziu a expressão renal de ubiquitina e Nfok $\beta$ 65 (42).

O diabetes está envolvido em processos neurodegenerativos, e a hiperglicemia induzida por estresse oxidativo contribui para numerosas reações celulares típicas da deterioração do sistema nervoso central. Os efeitos da quercetina na alta de glicose induzida pelo dano oxidativo em um modelo *in vitro* de neurônios dopaminérgicos – células neuronais PC 12 foram avaliados. Os resultados mostraram que a quercetina pode defender as células neuronais PC12 da morte celular induzida pela alta de glicose; além disso, quercetina diminuiu o estresse oxidativo e provocou um aumento da atividade da superóxido dismutase (43). Outro estudo sugeriu que o efeito neuroprotetor da quercetina pode ser mediado pela inibição da hiperglicemia e pela modulação do estresse oxidativo/nitrosativos, das citosinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL $\alpha$ 1 $\beta$ ), bem como danos ao DNA (44).

A administração de quercetina em ratos com diabetes induzido por aloxano foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica no tecido hepático desses animais, mostrando o efeito protetor desse flavonoide (45). A quercetina também foi capaz de diminuir a apoptose em células do fígado de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (46). Esse flavonoide tem efeito

preventivo no dano em células do fígado, sendo eficaz para o tratamento do diabetes (47).

Em ratas prenhas, a quercetina foi capaz de diminuir o peso corporal desses animais, mas não melhorou o desenvolvimento fetal ou placentário (48).

Quercetina e alopurinol também foram capazes de suprimir parcialmente a ativação do NLRP3 inflamassoma renal, por meio dos seus efeitos contra os índices de uratos no sangue e anti-dislipidêmicos, melhorando os efeitos da nefrotoxicidade causada pela diabetes (49).

A hiperglicemia induzida por glicocorticóides é um problema clínico comum entre os usuários de glicocorticóides. Ratos tiveram uma administração oral de quercetina para tentar corrigir a hiperglicemia causada por elevadas doses de metilprednisolona, e os resultados mostraram que a ingestão de 150 mg/kg de quercetina foi capaz de diminuir significativamente a glicose plasmática pós-prandial e a concentração elevada de insulina em relação ao grupo controle, mostrando que esse flavonoide pode exercer proteção contra a hiperglicemia causada por glicocorticóides, principalmente devido ao seu efeito estimulante sobre as células  $\beta$ -pancreáticas (50).

O perfil metabólico e hormonal em um modelo de obesidade induzida por MSG (glutamato monossódico) foi relatado. Ratos que receberam MSG e depois quercetina tiveram uma diminuição no ganho de peso vivo, e normalização de taxas de triacilglicerol, colesterol total e frações, redução de HDL e lípidos, além da normalização dos níveis de insulina, leptina, glicose e creatinina. O perfil glicêmico foi normalizado e os efeitos tóxicos relacionados ao MSG reduzidos, resultado associado às atividades antioxidantes da quercetina (51).

Alguns estudos mostraram que outros flavonoides, além da quercetina, também apresentam, além de atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória e atividade antidiabética.

Assim também é com os derivados de quercetina, como por exemplo, a rutina. A rutina, também conhecida como quercetina 3-rutinosídeo ou vitamina P, é um flavonoide pertencente à subclasse dos flavonóis que tem sido intensamente pesquisada e os resultados estão interessando constantemente às indústrias farmacêuticas (52).

Becho *et al.*(2009) relataram que a rutina, além de ser um composto amplamente encontrado nos alimentos, também é o composto principal da árvore japonesa pagoda (*Sophora japonica* L. Fabaceae), do trigo serraceno (*Faopyrum esculentum* Moech, *F. tataricum* (L.) Polygonaceae) e do fruto do faveiro (*Dimophandra mollis* Benth, Fabaceae) (52).

Dentre os flavonoides estudados, a rutina tem se destacado em função das suas diversas atividades farmacológicas. Entre as atividades terapêuticas da rutina, está a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas ou de hipertensão, por promover a normalização da resistência e permeabilidade da parede destes vasos. Outros sintomas de fragilidade capilar também são melhorados, entre eles, a perda da acuidade visual e alterações do campo visual (52).

Vários estudos têm associado rutina ao tratamento do diabetes, mostrando que esse flavonoide pode ser um aliado nessa terapêutica. Ratos que tiveram o diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) receberam por via oral doses diárias de rutina. O tratamento resultou na diminuição da glicose e na melhora no perfil lipídico desses ratos. A rutina ainda impediu alterações na atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), na aminotransferase (AST) e na lactato desidrogenase (LDH) no soro de fígado e coração, indicando o efeito protetor desse flavonoide contra a toxicidade cardíaca e hepática causada pela estreptozotocina (53).

Foi observado, em outro estudo, que após 45 dias de administração oral de rutina, ratos com diabetes induzida por STZ, tiveram uma diminuição de glicose no sangue em quase 63%. Além disso, foi observado que ratos tratados com esse flavonoide tiveram uma diminuição do LDL-C (colesterol lipoproteína de baixa densidade) e o controle do PCR-us (proteína C reativa ultrasensível), contribuindo como fatores importantes para a diminuição do risco aterogênico, provocado por DM (53).

Um outro estudo, *in vitro*, foi realizado para investigar o efeito da rutina na captação de glicose em um alvo à insulina (músculo sóleo) e os mecanismos de ação envolvidos. Ratos que foram tratados com rutina (500 mM), e com ou sem os inibidores; éster trisacetoximetilhidroxi-2-naftalenilmetilfosfônico (HNMPA (AM3), um inibidor da atividade do receptor tirosina-quinase de insulina; a wortmannina, um inibidor da fostatidilinositol-3-

quinase (PI3K); RO318220, um inibidor da proteína quinase C; colchicina, um agente-despolimerização de microtúbulos; PD98059, um inibidor de proteína ativada por mitogênioquinase (MEK); e cicloeximida, um inibidor da síntese de proteínas em fresco de Krebs Riger. Os resultados mostraram que a rutina pode ter um efeito positivo sobre a captação de glicose em comparação com as vias de sinalização da insulina, mostrando que esse flavonoide pode apresentar fortemente uma evidência para o papel insulino-mimético na homeostase da glicose (54).

Tanto a rutina, como o ácido clorogênico, principais compostos da amoreira branca (*Morus alba* L.) também foram capazes de reduzir o nível de glicose no sangue de ratos com diabetes melito (55).

Pacientes, entre 40 a 50 anos, com diabetes melitos tipo II por mais de 5 anos, tiveram níveis de açúcar no sangue em jejum, índice de massa corporal (IMC), pressão arterial, perfil lipídico, ureia e creatinina, eletrólitos, SGOT (transaminase glutâmico oxalacética), TGP (soro transaminase glutâmico pirúvica) e fosfatase alcalina (ALP) medidos. Em seguida, receberam comprimidos de rutina por 60 dias, e depois de 90 e 120 dias tiveram os parâmetros medidos novamente. Os resultados mostraram que a rutina diminuiu significativamente ( $P < 0,05$ ) os níveis de açúcar em jejum, pressão arterial sistólica e diastólica, HDL, uréia e creatinina. Porém, aumentou TGL, HDL e VLDL. Foi observada também uma diminuição nos níveis de TGO, TGP, ALP e IMC, porém de forma não-significativa (56).

Um estudo mostrou que a rutina apresentou atividade hipoglicêmica. O teste foi uma comparação entre a rutina, a quercetina, o ácido elágico e o ácido boswelico, e todos apresentaram atividade hipoglicemiante, sendo o melhor resultado obtido por rutina. O estudo sugeriu ainda, que o mecanismo de ação envolvido pode ser pelo aumento da utilização periférica de glicose e inibição da atividade de transportador de glicose a partir do intestino (57).

A rutina, principal composto da infusão de *Ruta graveolens*, foi avaliada em ratos com diabetes tipo 2 induzido por nicotinamida-estreptozotocina. A rutina foi oralmente administrada numa dose entre 50 a 125 mg/kg/dia, durante 30 dias. Foi observado que tanto esse composto quanto a *Ruta graveolens*, melhoraram significativamente a hiperglicemia, a hiperlipidemia, insulina, conteúdo de glicogênio no fígado e as atividades de hexquinase, glicose-6-

fosfatase e glicogênio fosforilase, bem como o estresse oxidativo em ratos diabéticos. Os estudos, *in vitro* e *in situ*, indicaram que a liberação de insulina aumentou significativamente a partir das ilhotas de Langerhans, a ligação da insulina ao seu receptor e a captação de glicose periférica pelo diafragma do rato, enquanto no intestino a absorção de glicose foi significativamente diminuída. Além disso, aumentou a expressão de PPAR $\gamma$  no tecido adiposo (58).

Em comparação com a acarbose, a quercetina, a rutina e a isoquercitrina (quercetina-3-glicosila) mostram uma inibição significativa da isomaltase, mas não mostraram atividade inibitória contra a alta  $\alpha$ -amilase pancreática suína (59).

Ratos com diabetes induzido por estreptozotocina apresentaram uma concentração de lipídios alterada no fígado e nos rins. A composição de ácidos graxos também foi alterada nestes tecidos. O tratamento com rutina diminuiu significativamente a concentração de ácido palmítico, ácido esteárico e ácido oleico nesses animais, enquanto que os ácidos linolênico e araquidônico foram significativamente aumentados no fígado e nos rins. Por outro lado, a administração de rutina em ratos normais não mostrou qualquer efeito significativo sobre a composição de ácidos graxos no fígado e nos rins (60).

A nefropatia diabética é uma importante complicação microvascular e uma das principais causas da doença renal da fase final. Ao serem administradas 3 doses diárias, durante 10 dias, a ratos diabéticos, a rutina diminuiu significativamente os níveis de glicose no sangue em jejum, creatinina, ureia, proteína na urina, a intensidade do stress oxidativo e p-Smad 7. A expressão de produtos FGA, colágeno IV e laminina, o TGF- $\beta$ 1 (factor de transformação de crescimento- $\beta$ 1), p-Smad 2/3 e CTGF (fator de crescimento do tecido conjuntivo) também foi significativamente inibida por rutina. Além disso, a rutina foi capaz de inibir a proliferação de células mesangiais e diminuir a espessura da membrana glomerular basal (GBM) (61)

## 1.2 O Gênero *Bauhinia*

O gênero *Bauhinia* pertence à família Caesalpinaceae que compreende mais de 600 espécies distribuídas pelo mundo, conhecidas popularmente por unha-de-vaca ou pata-de-vaca, devido ao formato de suas folhas. A maioria das espécies é de origem do continente Asiático, mas existem espécies nativas do Brasil, como a *B. longifolia* e a *B. forficata* (62, 63).

São árvores silvestres, pequenas, de caule muito duro, com cascas fibrosas e folhas fendidas, típicas das espécies de *Bauhinia*, formando dois lobos cuja forma lembra o rastro da pata dos bovinos. As folhas podem variar entre pontiagudas e arredondadas, dependendo de cada espécie. As espécies mais conhecidas desse gênero são: *Bauhinia forficata*, *Bauhinia variegata*, *Bauhinia unguolata* e *Bauhinia cheilantha* (64).

Plantas dessas espécies são facilmente encontradas nas calçadas, pois apresentam uma excelente aparência e produzem flores bastante perfumadas, com formas que lembram orquídeas, podendo apresentar cores branca, rosa e essas duas cores juntas (65).

No Brasil, os extratos do gênero *Bauhinia* têm sido largamente utilizados na medicina popular no controle da glicemia, além de outras aplicações como, anti-inflamatório e analgésico (66, 67).

A atividade hipoglicemiante de *Bauhinia* foi identificada desde 1929, e vários testes clínicos e experimentais confirmaram o efeito hipoglicemiante dos extratos de plantas desse gênero (67, 68).

Foi utilizado extrato aquoso das folhas de *Bauhinia thoningii* para avaliar a atividade hipoglicemiante, bem como o efeito no perfil lipídico como indicador de risco coronariano em ratos com diabetes induzido por aloxano. Os resultados mostraram que a administração por via oral do extrato foi capaz de reduzir em mais 80% a quantidade de glicose no sangue desses animais e também houve melhora nas complicações cardiovasculares provocadas pelo diabetes. A infusão das folhas dessa espécie reduziu a lipoproteína de baixa densidade e o indicador de risco coronariano (69)

Ratos não obesos tratados com o extrato aquoso de *Bauhinia forficata* tiveram uma melhora no metabolismo corporal; porém quando avaliada a

recuperação dos tecidos, principalmente as glândulas salivares, as alterações do epitélio secretor e interações com o compartimento estromal (compartimento que referiu-se a sustentação do órgão) adquirido durante o período prolongado de tratamento com o extrato, não foi observada uma melhora significativa (70).

Do extrato fluido hidroetanólico (1:2) dessa espécie foram obtidas três frações que foram secadas de formas diferentes: a primeira foi seca em estufa, a segunda foi seca por pulverização e a terceira passou pelo processo de secagem por granulação com adjuvantes. Estas três frações foram administradas oralmente, durante sete dias a ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. Os resultados mostraram que nem o teor de flavonoides e nem a atividade hipoglicemiante se alterou entre as frações obtidas, porém, o perfil glicêmico dos ratos analisados estava melhor naqueles que receberam o extrato seco por granulação por adjuvantes (71).

O extrato etanólico das flores de *Bauhinia tomentosa* Linn. foi administrado intraperitonealmente, durante 7 dias, a ratos com diabetes induzida após 48h da administração de estreptozotocina. Foi observada, então, a redução dos níveis de glicose no plasma, além da diminuição do colesterol, dos níveis de LDL e VDL e aumento nos níveis de HDL, mostrando a atividade hipoglicemiante e hipolipidêmica dessa planta (72).

Na investigação para avaliar o efeito protetor ao hipotireoidismo causado pela administração de dexametasona em ratos com diabetes tipo II, foi observado que a administração oral de *Bauhinia purpurea* (2,5 mg/kg) pode aumentar os níveis de T4 e T3 circulantes para os níveis eutireoideo; além disso, foi capaz de diminuir os níveis de glicose no sangue, níveis de LDL e aumento de antioxidantes celulares (73).

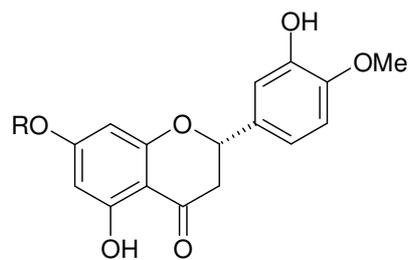
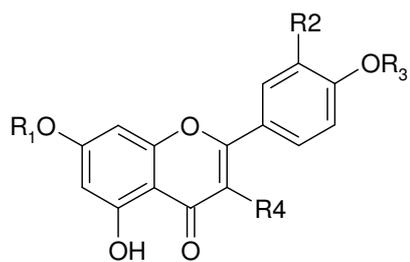
Vários são os estudos que enfocaram a confirmação da atividade hipoglicemiante dessa planta. Dessa maneira, torna-se importante a busca das substâncias responsáveis por essa atividade, bem como a definição do mecanismo molecular de ação dos prováveis compostos que desempenham a atividade farmacológica desse extrato.

### 1.3 *Bauhinia variegata*

Ainda não há relatos na literatura sobre a composição da espécie *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC, objeto desse estudo. Porém, a espécie *Bauhinia variegata*, em comparação com outras espécies do gênero, é bastante estudada. Os principais compostos isolados dessa espécie estão apresentados no **Quadro 1** e suas estruturas são apresentadas na **Figura 2**.

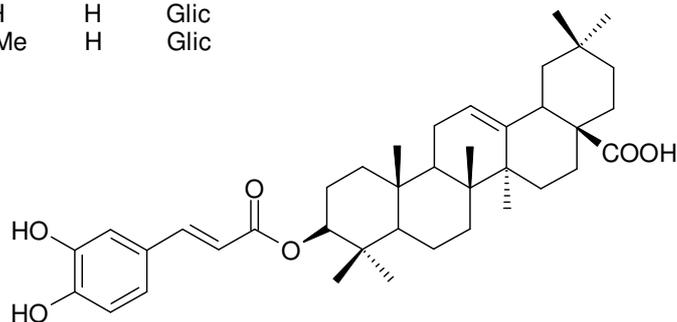
**Quadro 1:** Principais compostos isolados de *Bauhinia variegata*

Partes da planta	Composto	Referências
Partes aéreas	Campferol ( <b>1</b> ) Ombuina ( <b>2</b> ) Campferol 7,4'dimetil-éter 3- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -glucopiranosídeo ( <b>3</b> ) isohamnetina 3- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -glucopiranosídeo ( <b>4</b> ) hesperidina ( <b>5</b> ) Campferol 3- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -glucopiranosídeo ( <b>6</b> ) junto com um cafeato 3-beta-trans-(3,4-diidroxicinamoiloxi) olean-12-en-28-oico ( <b>7</b> )	(74)
Casca da Raiz	Campferol ( <b>1</b> ), Campferol 7,4-dimetil-éter 3- <i>O</i> -β-glucopiranosídeo( <b>3</b> ) Camperol 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopiranosídeo ( <b>6</b> ), (2 <i>S</i> )-5,7-dimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavanona ( <b>8</b> ), quercetina 7-metil-éter (ramnetina) ( <b>9</b> ) dihidrodibenzoxepina, 5,6-diidro-1,7-diidroxi-3,4-dimetoxi-2-metildibenz[b,f]oxepina ( <b>10</b> ), , 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxi-7- <i>O</i> -α-1-ramnopiranosil (1→3)- <i>O</i> -β- <i>D</i> -galactopiranosídeo ( <b>11</b> ), 2,7-dimetoxi-3-metil-9,10-diidrofenantrena-1,4-diona ( <b>12</b> ), N-naftil-2-anilina ( <b>13</b> ), bicicloamanimbina ( <b>14</b> ), mahainbina ( <b>15</b> ), girinimbina ( <b>16</b> ), 30-norhopane ( <b>17</b> ), cerotato de etila ( <b>18</b> ), friedelina ( <b>19</b> ), ácido palmítico ( <b>20</b> ), β-sitosterol ( <b>21</b> ), palmitato de β-sitosterol ( <b>22</b> ), aplisterol ( <b>23</b> ), taraxeran-3α-ol ( <b>24</b> ), naringina ( <b>25</b> ), quercetina ( <b>26</b> ), n-octacosano ( <b>27</b> ), e ácido decosanóico ( <b>28</b> )	(75-80)
Folhas	Campferol-3- <i>O</i> - <i>D</i> -glucopiranosídeo ( <b>6</b> ), 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxi-3,4-metilenodioxichalcona ( <b>29</b> ), e Campferol-3- <i>O</i> -α- <i>L</i> -ramnosídeo ( <b>30</b> ), quercetina 3-metil-éter ( <b>31</b> ), luteolina ( <b>32</b> ), rutina ( <b>33</b> ), narcissina ( <b>34</b> ), isoquercitrina ( <b>35</b> ) daucosterol ( <b>36</b> ) (-)-epicatequina ( <b>37</b> ), ácido protocatecuico ( <b>38</b> ), ácido etil-éster-protocatecuico ( <b>39</b> ), Galato de metila ( <b>40</b> ), galato de etila ( <b>41</b> ), ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico ( <b>42</b> ), schizandrisídeo ( <b>43</b> ), ácido 23-hidroxi-3-alfa-[ <i>O</i> -alfa- <i>L</i> -1C4-ramnopiranosil-(1''-->4')- <i>O</i> -alfa- <i>L</i> -4C1arabinopiranosil-oxi]olean-12-en-28-oico éster <i>O</i> -alfa- <i>L</i> 1C4ramnopiranosil-(1''''-->4''''')- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -4C1-glucopiranosil-(1''''-->6)- <i>O</i> -beta- <i>D</i> -4C1-glucopiranosil ( <b>44</b> ) Caprilato de α-amirina ( <b>45</b> ) nor-α-amirina ( <b>46</b> ) lupeol ( <b>47</b> ) palmitato de 3β, 28-di hydroxil olean-12-enil ( <b>48</b> )	(81-85)

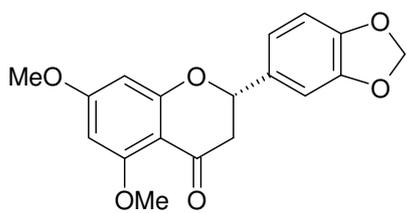


(6) R = Rha-Glic

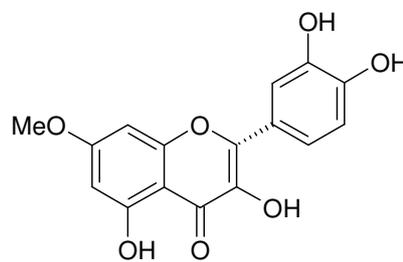
	R1	R2	R3	R4
(1)	H	H	H	H
(2)	Me	OH	Me	H
(3)	Me	H	Me	Glic
(4)	H	H	H	Glic
(5)	H	OMe	H	Glic



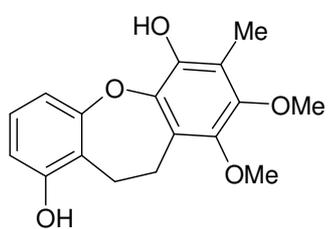
(7)



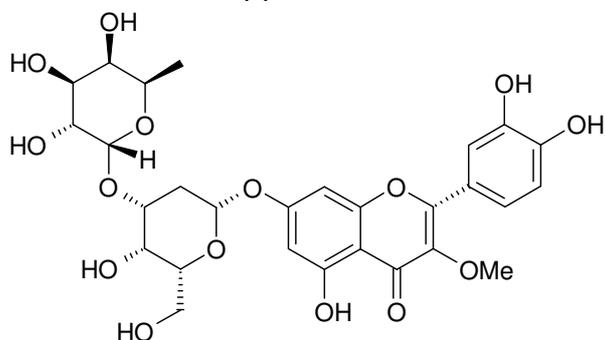
(8)



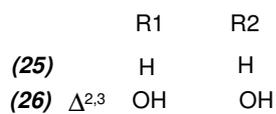
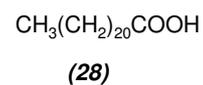
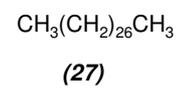
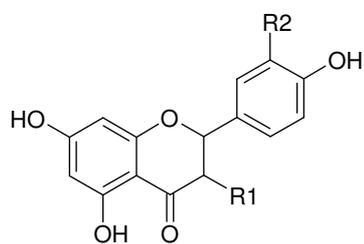
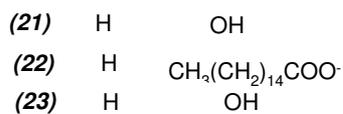
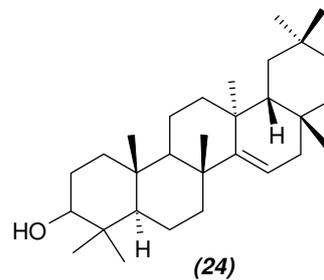
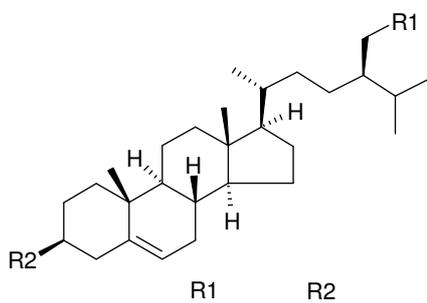
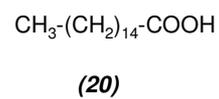
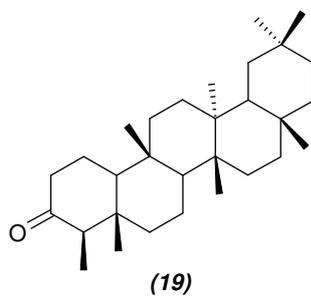
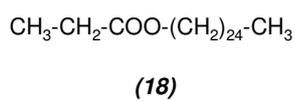
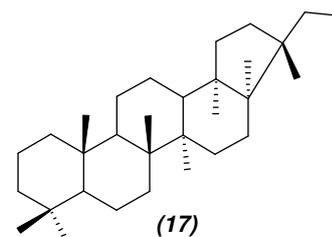
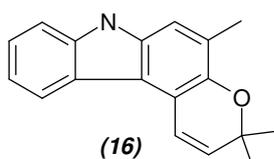
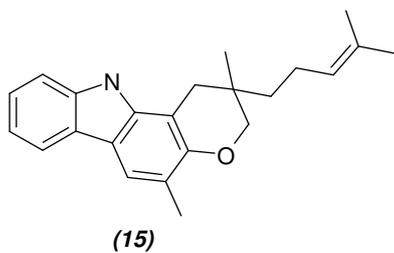
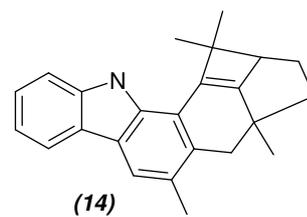
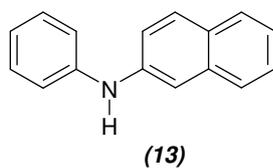
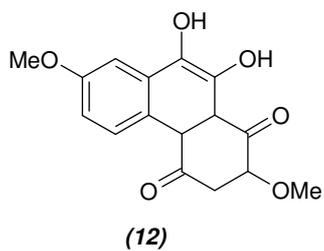
(9)

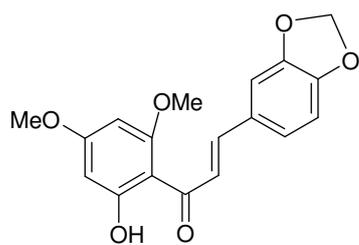


(10)

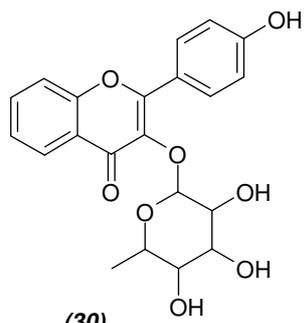


(11)

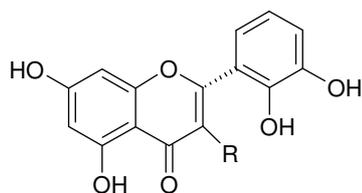




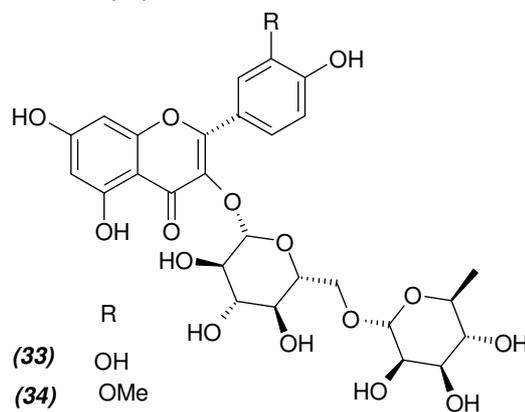
(29)



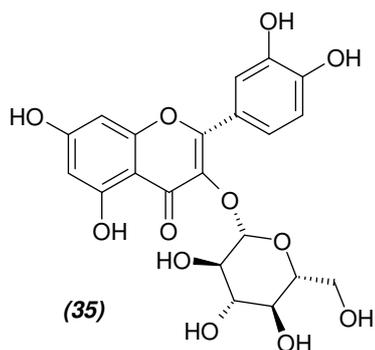
(30)



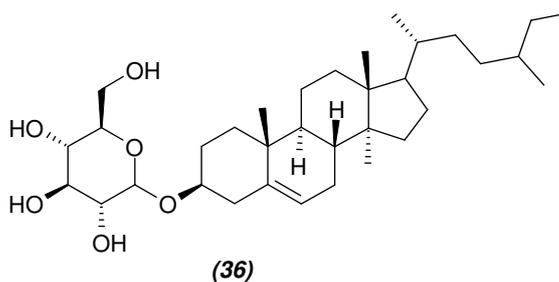
R  
 (31) OMe  
 (32) H



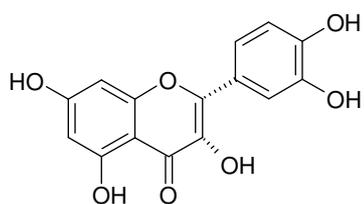
R  
 (33) OH  
 (34) OMe



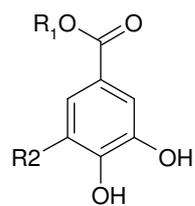
(35)



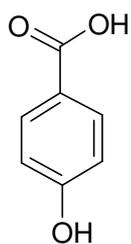
(36)



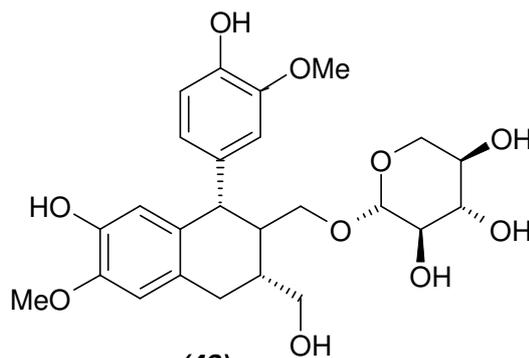
(37)



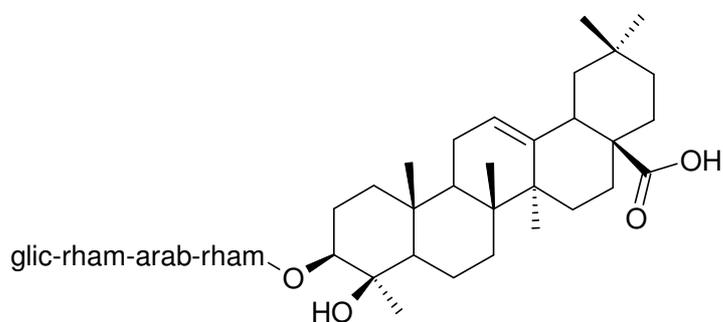
R1      R2  
 (38) H      H  
 (39) CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-      H  
 (40) CH<sub>3</sub>-      OH  
 (41) CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-      OH



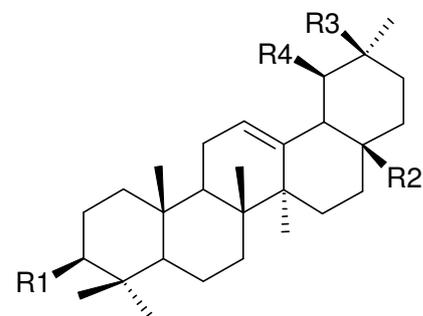
(42)



(43)



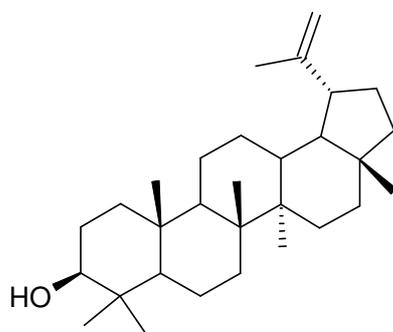
(44)

(45) Caprilato de  $\alpha$ -amirinaR1 = C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>COOR2 = CH<sub>3</sub>R3 = CH<sub>3</sub>

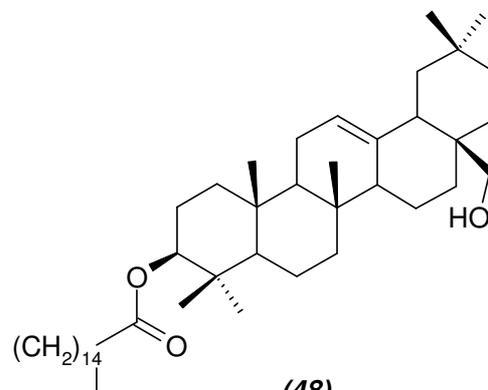
R4 = H

(46) nor  $\alpha$ -amirina

R1 = OH

R2 = CH<sub>3</sub>R3 = CH<sub>3</sub>R4 = CH<sub>3</sub>

(47)



(48)

Figura 02 – Principais compostos isolados de *Bauhinia variegata*.

Testes mostraram que os compostos **1-7** e os compostos **13** e **44** exibiram significativa atividade antiinflamatória. Esses resultados podem comprovar o uso medicinal de *Bv* (*Bauhinia variegata*) em processos anti-inflamatórios (74, 77, 84). Além disso, os compostos **6**, **29** e **30** apresentaram atividade antifúngica *Aspergillus niger* e *Cândida albicans* (83).

As lectinas formam um grupo heterogêneo altamente específico que pode fazer ligações entre os seus hidratos de carbono e as proteínas. Devido ao seu grande potencial biotecnológico, são amplamente utilizadas nas pesquisas biomédicas. Das sementes *Bauhinia variegata candida* foi isolada uma lectina (BvCL) que foi purificada por filtração cromatográfica em gel Sephadex G75 e imobilizada em coluna de *D*-lactose. A análise de carboidratos indicou que BvCL é inibida por lactose, galactose, galactosamina, e outros derivados de galactosídeos. A sequência de ácido N-terminal de 17 resíduos de aminoácidos mostrou 90% de homologia sequencial das lectinas galactose-específicas da subfamília Caesalpinoideae (86).

Outra lectina dimérica foi isolada das sementes de *Bauhinia variegata* por cromatografia de afinidade em Affi-gel azul, cromatografia de troca iônica em Mono Q e de filtração em gel Superdex 75. Essa substância inibiu a proliferação de células de hepatoma HepG2 e de células de câncer de mama MCF7. Também apresentou inibição da atividade de transcriptase reversa de HIV-1 com um IC<sub>50</sub> de 1,02 µM (87).

O potencial de cicatrização da lectina *Bauhinia variegata* (nBVL) e a sua isoforma recombinante (rBVL-1) foi avaliado. Feridas na pele dorsal de ratos foram feitas e depois de 12 dias com tratamento tópico com as lectinas, D-galactose, BSA e solução salina, os animais foram sacrificados e foram avaliados parâmetros como taxa de contração, taxa de epitelização e histopatológica. Os resultados indicaram que a lectina foi mais eficaz no tratamento das feridas do que os controles, e que a lectina recombinante conseguiu reconstruir a pele mais rapidamente (88).

Além disso, foi verificada a atividade hepatoprotetora da casca do caule *Bauhinia variegata* em ratos *Sprague-Dawley* que foram administrados com tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>). O efeito desse extrato nas enzimas séricas aspartato aminotransferase (AST) marcadas, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e bilirrubina total e GGT, e proteínas e lipídeos

hepáticos foram significativos, exibindo a promissora atividade hepatoprotetora do caule dessa espécie. Além disso, a atividade antioxidante no tecido hepático foi avaliada por meio da determinação das atividades antioxidante enzimática: Glutationa reduzida (GSH), catalase (CAT), bem como o nível de peroxidação lipídica por malondialdeído (MDA) foram medidos e o extrato etanólico de *Bauhinia variegata* (89) mostrou uma redução significativa no MDA e aumento no CAT e GSH mesmo em doses baixas. O exame histopatológico do fígado mostrou um efeito hepatoprotetor do extrato, diminuindo a extensão da necrose centrolobular, alterações gordurosas e congestão de sinusóides, quanto comparados ao grupo tetracloreto de carbono (CCL<sub>4</sub>), ostrando que esse extrato possui uma significativa proteção contra lesões hepáticas induzidas por CCl<sub>4</sub>. (90)

A atividade imunomodulatória do extrato etanólico da casca do caule de *Bauhinia variegata* Linn (EBV) também foi observada. EBV mostrou um efeito significativo na resposta imune humoral primária e secundária, por meio do aumento do índice fagocitário de neutrófilos e aderência percentuais, mostrando que esse extrato possui um agente imunomodulatório promissor (91).

A casca do caule dessa espécie também apresentou potencial anticarcinogênico e antimutagênico. Os resultados mostraram que o extrato foi capaz de prevenir significativamente o carcinoma de pele, e ainda uma simples aplicação do extrato após 24 horas foi capaz de prevenir a formação de micronúcleos e as aberrações cromossômicas nas células de medulas ósseas de rato de maneira dose dependente (92).

O extrato etanólico e o aquoso de casca da raiz de *Bauhinia variegata*, também foram avaliados quanto à atividade antioxidante, pelo método de radical livre de DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazila), superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. Nos métodos testados, os extratos apresentaram significativa potencial antioxidante quando comparados com os controles ácido ascórbico e BHA (mistura de isômeros: 2- e 3-terc-butil-4-hidroxianisol), que possuem propriedades antioxidantes significantes (93).

Além disso, outros testes de atividade antioxidante de *Bauhinia variegata* são relatados na literatura. Os extratos metanólicos das folhas, do caule e dos botões florais dessa espécie apresentaram maior atividade antioxidante pelo

método da desoxirribose (para avaliar a atividade sequestradora do radical OH) que o controle positivo ácido ascórbico (94). O extrato metanólico de *B. variegata* L. foi fracionado em frações não-polares, (fração hexânica e clorofórmica) e frações polares (fração n-butanólica, fração acetato de etila) e essas frações foram utilizadas contra os radicais livres de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e também para avaliar a atividade genoprotetora ao DNA pBR322. Os resultados mostraram que as frações polares apresentaram maior atividade antioxidante do que as frações não polares. No entanto, todas as frações foram eficazes na proteção do plasmídeo de DNA pBR322 em relação ao dano induzido por peróxido de hidrogênio (95)

Resultados semelhantes também foram observados quando os extratos etanólico e aquoso das raízes de *Bauhinia variegata* Linn. foram utilizados para a avaliação do potencial antioxidante pelo método de DPPH, óxido nítrico e superóxido e para a avaliação da atividade nefrotóxica induzida por gentamicina intraperitonealmente em ratos Wistar. Os resultados foram positivos para a atividade antioxidante de ambos os extratos pelos métodos analisados. Além disso, os extratos foram capazes de produzir significativa atividade nefroprotetora, evidenciada pela diminuição de creatinina sérica, ureia, creatinina, além de menor congestão glomerular, congestão de vasos sanguíneos e descamação epitelial, redução no acúmulo de células inflamatórias e necrose de células renais, em ratos que foram anteriormente tratados com gentamicina (96, 97). A atividade nefroprotetora do extrato etanólico dessa espécie também foi evidenciada em ratos tratados previamente com cisplatina (98).

Esses extratos também foram testados quanto ao potencial anti-hiperlipidêmico em ratos hiperlipidêmicos induzidos por uma dieta rica em Triton WR-1339, estimando níveis de triglicerídeos, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), colesterol, lipídeos de baixa densidade (LDL) e lipídeos de alta densidade (HDL). Os resultados mostraram que os extratos foram capazes de reduzir significativamente os níveis de colesterol, triglicerídeo, LDL e VLDL, porém houve um aumento significativo nos níveis de HDL (93). A fração butanólica do extrato metanólico das folhas de *Bauhinia variegata* Linn também apresentou atividade anti-hiperlipidêmica em ratos induzidos pro Triton WR-1339 (99).

Das folhas de *Bauhinia variegata* foram identificados açúcares, antraquinona, saponinas, terpenoides e alcaloides. Na verificação do conteúdo de flavonoides foram encontrados de 11-222,67 mgQE/g desses compostos. As frações éter de petróleo e clorofórmica exibiram uma considerável inibição contra o crescimento de *Klebsiella pneumoniae*. Além disso, o extrato apresentou atividade antibacteriana contra cepas patogênicas de *Escherichia coli*, *Proteus* ssp. e *Pseudomonas* ssp. com a Concentração Mínima Bactericida entre 3,5 a 28,4 mg. Além disso, também foi verificada a atividade antioxidante desses extratos, e os extratos mais polares apresentaram atividade quelante de íons de metal apreciável em concentrações baixa (10-40 µg/mL). A fração aquosa do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* mostrou um pronunciado efeito citotóxico contra células cancerígenas DU-145, HOP-62, IGR-OV-1, MVF-7 e THP-1 com 90-99% de inibição ao crescimento. Esse estudo comprovou atividade antibacteriana, antioxidante e anticancer das folhas de *Bauhinia variegata* (100)

O extrato metanólico de *Bauhinia variegata* apresentou atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, que são bactérias responsáveis por doenças de origem alimentar, infecções hospitalares e cistite, respectivamente (101). E extratos etanólico, aquoso e acetônico também apresentaram atividade contra *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Providencia pseudomallei* (102). Além disso, o extrato etanólico apresentou atividade moluscicida potente contra o vetor caracol, *Limnaea acuminata*, sendo a quercetina responsável por essa atividade (103).

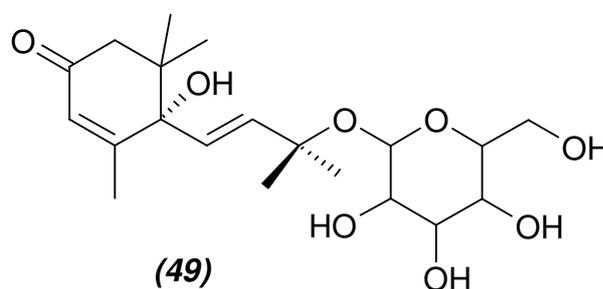
Também apresentou atividade antimicrobiana contra *Salmonella typhi*, seguido por *Vibrio cholera*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. aureus*; atividade antifúngica contra os dermatófitos, *T. mentagrophytes* e contra os agentes patogênicos de plantas *Mucor hiemalis* (104). A casca dessa planta também apresentou atividade contra quase todas as espécies de *Shigella*, a maioria das estirpes de *V. cholera*, além de *E. coli* 597, *E. coli* K88, *Enterobacter* AP596, *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas putida* MTCC 2252, *Sl. aeruginosa* AP 585 NLF e *Proteus vulgaris* AP 679 NLF (105)

Num estudo com o objetivo de investigar a presença de proteínas semelhantes à insulina nas folhas de *Bauhinia variegata*, foi possível observar

a existência de uma proteína semelhante à insulina bovina. Essa proteína foi extraída dos cloroplastos. Além disso, ratos com diabetes, tiveram uma diminuição nos níveis de glicose sérica quando receberam a proteína, e esse resultado foi semelhante ao que apresentou insulina comercial, que foi utilizada como controle (106).

O extrato etanólico da casca de *B. variegata* foi utilizado em ratos com diabetes induzida por aloxano, e foi observada uma diminuição significativa nos níveis de glicose no sangue desses animais, semelhante ao observado em ratos que receberam o tratamento com metformina. Porém, em ratos normoglicêmicos, não foi observada hipoglicemia quando tratados com o extrato dessa espécie, sugerindo que o efeito anti-hiperglicêmico de *B. variegata* pode ser atribuído ao aumento do metabolismo da glicose (107). Resultados semelhantes também foram observados em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, onde foi observada uma diminuição significativa nos níveis de glicose nesses animais, quando foram administrados os extratos etanólicos de *B. variegata* (108)

Em um estudo sobre a secreção de insulina em linhagem celular INS-1, o efeito do extrato etanólico das folhas *Bauhinia variegata* L. var *candida* e o principal constituinte (6S,7E,9R)-hidroximegastigma-4,7-dien-3-ona-9-*b*-glicopiranosídeo (roseosídeo) (**49**) foi verificado. O extrato bruto etanólico e seu principal constituinte promoveram um aumento da secreção da insulina de maneira dose-dependente (109).



O extrato da casca do caule de *Bauhinia variegata* apresentou atividade citotóxica contra células HeLa. O valor de IC<sub>50</sub> do extrato de 191,5 µg/mL foi capaz de induzir a apoptose em células HeLa por MTT e SRB, mostrando a potencial atividade citotóxica desse extrato (110)

Foi avaliada também, a atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato de folhas de *Bauhinia variegata*, utilizando três modelos: o edema induzido por carragenina na pata de rato, formação de granulomas induzido por pelotas de algodão e artrite induzida por adjuvantes, em ratos. Tanto o extrato etanólico quanto o extrato de éter de petróleo mostraram atividade anti-inflamatória nos três testes utilizados, quando comparados com diclofenaco de sódio (controle positivo), confirmando o tradicional uso dessa planta como anti-inflamatório (111).

Também com esses extratos foi possível avaliar a atividade antiulcerogênica e analgésica das raízes de *B. variegata* em ratos, cuja úlcera foi induzida por ácido acético. Doses entre 200-400 mg/kg de extratos etanólico ou aquoso das raízes dessa espécie foram administrados por via oral a ratos. E de maneira dose-dependente, os extratos foram capazes de inibir a formação de úlcera em até 99% (112).

A fração metanólica do extrato etanólico da casca do caule de *Bauhinia variegata* mostrou uma atividade anticatarata considerável em modelo ovino e embrião de pintinhos. O estudo fitoquímico dessa fração permitiu identificar a presença de ramnocitrina, ácido 4-O-β-D-glicosilbenzoico, 5,3'-diidroxio-6,7,4'-trimetoxiflavanona e 2,4,8,9,10-pentaidroxio-3,7-dimetoxiantraceno-6-O-α-L-ramnopiranosídeo (113) Estudos posteriores mostraram que o efeito anticatarata desse extrato foi produzido pela ramnocitrina, que nas doses entre 20-80 mg foi capaz de diminuir a opacificação induzida pelo peróxido de hidrogênio em modelos ovinos e de embrião de pintinhos (114).

Os extratos das raízes de *Bauhinia variegata* Linn foram capazes de prevenir a arritmia induzida por CaCl<sub>2</sub> em ratos albinos. Os animais foram divididos em 5 grupos: o grupo 1 foi o grupo controle, o grupo 2 foi o grupo controle com arritmia induzida por CaCl<sub>2</sub>, O grupo 3 com arritmia induzida por CaCl<sub>2</sub> e recebeu varapamil, o grupo 4 teve arritmia induzida por CaCl<sub>2</sub> e recebeu o extrato aquoso e o grupo 5 teve arritmia induzida por CaCl<sub>2</sub> e recebeu o

extrato etanólico. Os resultados mostraram que tanto no grupo tratado com verapamil, quanto no grupo tratado com os extratos das raízes de *B. variegata*, ocorreram diminuição nos níveis de cálcio e sódio no sangue e aumento nos níveis de potássio. Sabe-se que a raiz de *B. variegata* Lin contém esteroides, saponinas, taninos, compostos fenólicos e flavonoides, como a quercetina, rutina e apigenina, e estes compostos podem estar relacionados ao efeito benéfico antiarrítmico (115).

#### **1.4 *Bauhinia variegata* var. *variegata***

Existem poucos relatos na literatura sobre essa espécie.

Das sementes de *Bauhinia variegata* var. *variegata* foi relatado pela primeira vez o isolamento de uma lectina recombinante que foi capaz de inibir a aderência inicial de bactérias orais. A lectina das sementes de *B. variegata* var. *variegata* foram purificadas por cromatografia de afinidade e utilizadas em ensaios de hemaglutinação e quantificação de proteínas.

Nos ensaios de hemaglutinação, foi observada a atividade da lectina em eritrócitos de coelhos. Não foram observadas diferenças entre as formas recombinantes ou nativas dessa proteína, e foi observada uma aglutinação das hemácias imediatamente após a adição das células no meio contendo Lectina.

Esses resultados são relevantes, pois suportam a aplicação biotecnológica de lectinas em uma estratégia para reduzir o desenvolvimento de cárie dentária, inibindo a adesão inicial e a formação de biofilme (116).

Outro estudo com sementes de *Bauhinia variegata* var. *variegata*, apresentou o isolamento de um inibidor de tripsina com potenciais aplicações medicinais.

Geralmente, as sementes de leguminosas têm um elevado teor de inibidores de protease, e esses já foram identificados em diferentes variedades de *B. variegata* (117-119). Os inibidores de serina-protease (serpinas) de sementes de leguminosas inativam várias enzimas e são classificados em famílias; e nessas se incluem os inibidores de tripsina Kunitz (Tis) e Bowman-Birk TI e outros. A capacidade de inibir as proteases envolvidas em eventos fisiológicos, como coagulação e inflamação, é dada as TIs do tipo Kunitz. Dessa forma foi descrito o isolamento, a bioquímica e as propriedades

funcionais de um TI, isolada a partir das sementes de *B. variegata* var. *variegata* (BvvTI). Os resultados mostraram que BvvTI tem propriedades significantes transcriptase anti-HIV-1 reversa e contra o carcinoma anti-nasofaríngeo CNE-, mostrando seu potencial e aplicações medicinais (120).

O sobrenadante do homogeneizado das sementes de *B. variegata* var. *variegata* foi purificado por cromatografia de coluna de SP Sepharose e a fração adsorvida foi purificada numa coluna Mono S 5/50 GL, seguida de uma coluna Superdex 75 10/300 GL. O pico do inibidor de tripsina de *Bauhinia variegata* var. *variegata* (BvvTI), foi identificado e dializado extensivamente, em seguida foi liofilizado e armazenado em -20°C.

BvvTI foi avaliado por SDS-PAGE que revelou que a proteína estava homogênea e estava numa única banda a 21-kDa. A sequência da extremidade N - terminal de 20 primeiros aminoácidos de BvvTI foi comparada com Tis do tipo Kunitz de outras espécies de *Bauhinia*, e foi, então, observada uma homologia e a estabilidade desse inibidor de tripsina.

Testes mostraram que BvvTI, foi capaz de inibir a atividade de HIV-1 RTn com um valor de IC<sub>50</sub> de 6,4µM (controle positivo apresentou IC<sub>50</sub> de 2,5µM), porém, testes mais profundos deverão ser realizados.

Além disso, o ensaio de MTT revelou que BvvTI apresentou uma atividade antiproliferativa específica em células de câncer nasofaríngeo CNE-1 de maneira tempo-dependente, e no estudo apoptótico em células de CNE-1, BvvTI foi capaz de induzir mudanças morfológicas nessas células, quando a concentração desse novo inibidor de tripsina era aumentado de a 100 µM, sendo que a redução do número de células e corpos apoptóticos foram observados em conformidade. O estudo revelou ainda que BvvTI regula a expressão de mRNA das citocinas incluindo a IL-1β, IL-2, TNF-α e INF-γ de maneira dose-dependente. Essas atividades biológicas realçam as aplicações medicinais potenciais de BvvTI (121)

## 1.5 Diabetes melito tipo II e PPAR $\gamma$

O diabetes é considerado problema de saúde pública prevalente, em ascendência, oneroso do ponto de vista social e econômico, de grande impacto na morbimortalidade com complicações cardíacas, cerebrovasculares, vasculares periféricas, oculares, renais, neuropáticas, que leva a incapacidades ou à morte. Os principais fatores de risco são: excesso de peso, sedentarismo, tabagismo, alimentação inadequada, etc. Estima-se que a proporção de diabetes não diagnosticada em diversos países no mundo esteja entre 30-60% (122).

De acordo com os dados do *Diabetes atlas 5*, lançado em 14 de novembro de 2011 pela *International Diabetes Federation* (IDF), há 366 milhões de pessoas com diabetes atualmente em todo mundo e acredita-se que esse número pode chegar a mais de 500 milhões até 2030 (123).

Existem dois tipos de diabetes, o primeiro é o diabetes melito tipo 1 considerada doença autoimune órgão-específica, que resulta da destruição seletiva das células beta pancreáticas, produtoras de insulina, pela infiltração progressiva de células inflamatórias, particularmente por linfócitos T auto-reativos. As manifestações clínicas do distúrbio metabólico surgem quando cerca de 80% das células beta tenham sido destruídas (124).

E o diabetes melito tipo II, considerada como uma doença crônica, que se caracteriza pelo aumento da glicose na circulação sanguínea, ou seja, a hiperglicemia. Esse aumento ocorre porque a insulina, hormônio responsável pela absorção da glicose pelas células, deixa de ser produzida pelo pâncreas, ou então, é produzida de forma insuficiente ou não funciona adequadamente (122).

O diabetes tipo I atinge crianças e adolescentes, e o tipo II atinge principalmente a população entre 30 e 69 anos, embora hoje já se observe este quadro também em crianças devido à obesidade e ao sedentarismo infantil. (125)

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais gama (PPAR $\gamma$ ) pertencem à superfamília dos receptores nucleares, que são fatores de transcrição ativados por ligantes que atuam em processos fisiológicos através por meio da regulação da expressão de genes-alvo. Essa superfamília, em

humanos, é composta por 48 membros onde estão incluídos os receptores de esteroides, do hormônio tireodiano (TR), da vitamina D3 (VDR) e do ácido retinóico (RXR) (126, 127).

Estudos sugerem que a ativação do PPAR $\gamma$  diminui a progressão da aterosclerose e aumenta a sensibilidade à insulina, sendo por esse motivo utilizado no tratamento de diversas enfermidades, incluindo o diabetes melito do tipo II e dislipidemia (128).

Os PPARs foram identificados pela primeira vez em roedores na década de 90, e a partir dessa data suas propriedades fisiológicas vêm sendo estudadas (129). Eles modulam a expressão de numerosos genes-alvo que desempenham um papel central na regulação de glicose, lipídeos e metabolismo do colesterol, onde os desequilíbrios podem levar à diabetes, obesidade e doença cardiovascular (130).

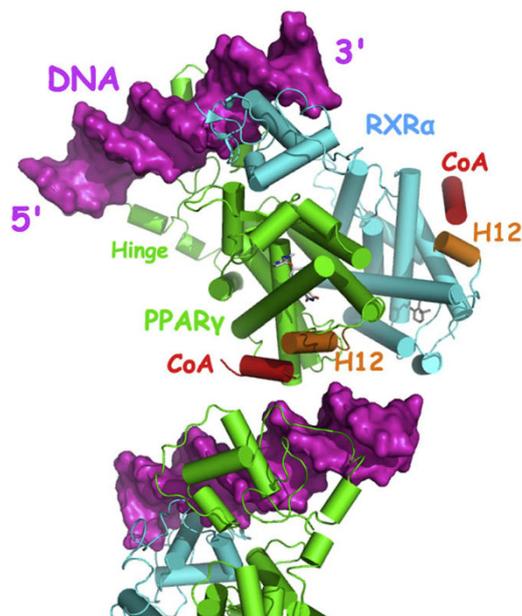
Por isso, os PPARs se tornaram atraentes alvos terapêuticos e farmacêuticos. A indústria tem pesquisado uma quantidade enorme de novos fármacos que sirvam como agentes moduladores do PPAR para o tratamento de diabetes melito tipo 2, obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (130).

Como outros receptores nucleares, os PPARs também apresentam uma organização estrutural dos domínios funcionais bem caracterizada e conservada: domínio amino-terminal, responsável pela transativação independente do ligante, composto pela região AF-1; domínio de ligação ao DNA (DBD – *DNA Binding Domain*); região de dobradiça; domínio de ligação ao ligante (LBD – *Ligand Binding Domain*); domínio AF-2 que promove a transativação dependente do ligante (131, 132) **Figura 03**.



**Figura 03 - Organização estrutural dos domínios funcionais dos PPARs.** Domínios funcionais dos PPARs: **A/B**) AF-1: transativação independente do ligante; **C**) DBD: Domínio de ligação ao DNA; **D**) Hinge: região de dobradiça; **E**) LBD: Domínio de ligação ao Ligante; **F**) AF-2: transativação dependente do ligante.

Os PPARs formam heterodímeros com RXR (receptor do ácido 9-*cis*-retinoico) que da mesma forma como os PPARs, possuem três isoformas distintas: RXR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (133). Esse complexo PPAR-RXR se liga diretamente ao elemento responsivo ao PPAR (PPRE) presente na região promotora dos genes-alvo. Os PPRE possuem 2 hexanucleotídeo, AGGTCA, separados por um único nucleotídeo, também chamado de DR-1 (134) como mostrado na **Figura 04**.

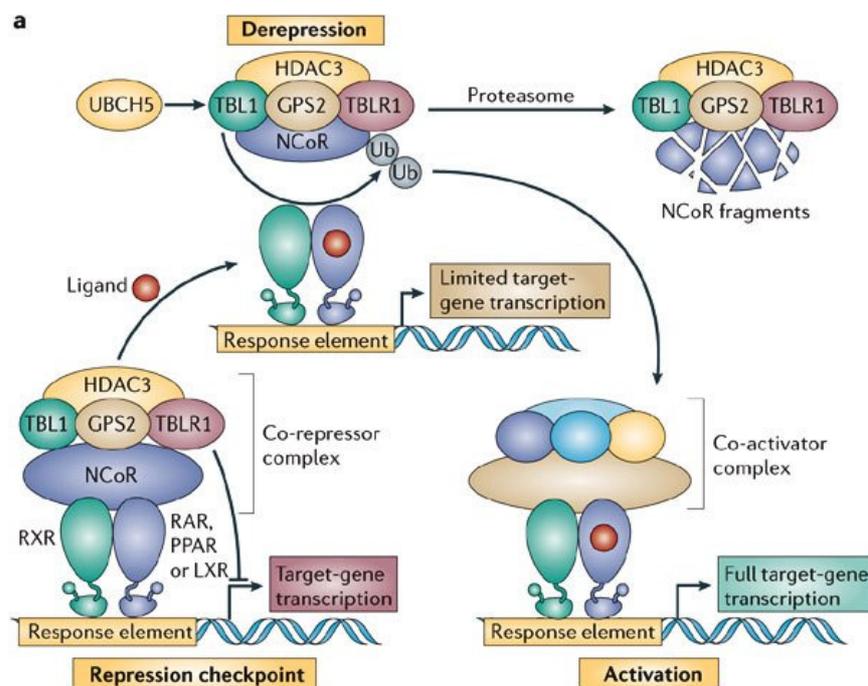


**Figura 04 - Estrutura cristalográfica do heterodímero PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$  em DNA e um fragmento de simetria cristalográfica relacionado ao complexo (134).**

A maioria dos receptores nucleares precisa de um ligante para que ocorra expressão gênica, e da mesma forma acontece com os PPARs. Para ativar a transcrição dependente do ligante, o receptor forma um heterodímero com RXR e esse complexo liga-se ao elemento responsivo dos receptores de proliferadores peroxissomais (PPRE) nos genes alvos (135).

Na ausência do ligante, o heterodímero PPAR-RXR encontra-se ligado aos PPREs e a proteínas correpressoras. Dessa forma, a cromatina se apresenta na forma enovelada, impedindo o recrutamento da maquinaria de início da transcrição, resultando na repressão da transcrição gênica (136). Na presença de um ligante agonista ao receptor, essa conformação se altera, ocorrendo a dissociação dos correpressores e a associação com proteínas coativadora com atividade de acetilase de histonas. As histonas acetiladas

promovem a modificação da estrutura da cromatina, que facilita o recrutamento da maquinaria de transcrição para o promotor dos genes-alvo, e o início da transcrição gênica (137, 138), conforme mostrado na **Figura 05**.

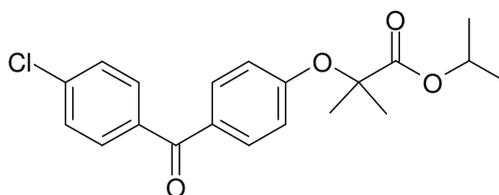


**Figura 05 - Exemplo de transativação dependente do ligante.** Na ausência do ligante o heterodímero RXR-PPAR encontra-se ligado ao elemento responsivo no DNA e a proteínas corepressoras. Na presença do ligante agonista ao receptor, ocorre a dissociação aos corepressores e a associação à proteínas coativadoras, resultando no início da transcrição gênica (139).

Os receptores dos proliferadores peroxissomais possuem três proteínas codificadas por genes distintos que foram identificadas como PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR $\beta/\delta$  (NUC1; NR1C2) e PPAR $\gamma$  (NR1C3) (140), sendo que o PPAR $\alpha$  possui 468 resíduos de aminoácidos em sua estrutura; o PPAR $\beta/\delta$  possui 441 e o PPAR $\gamma$  479 (141).

O primeiro membro da subclasse dos PPAR a ser identificado foi PPAR $\alpha$ , e foi clonado por Issemann e Greenem em 1990 e em, 1992 Dreyer identificou os outros dois PPARs (141). Os três subtipos de receptores estão presentes na maioria dos tecidos, embora apresente padrões de expressão teciduais isotipo-específica, sendo assim, expressos de forma desigual entre os diferentes órgãos (142).

O PPAR $\alpha$  é um importante regulador do metabolismo de lipídeos hepático. É conhecido por ativar a transcrição de números os genes, porém, de forma geral ainda não foi relatado a ligação de PPAR $\alpha$  com genes endógenos. É ativado por ligantes como ácidos graxos, derivados de ácidos graxos, além de ligantes sintéticos como, por exemplo, fenofibrato **(50)** (143).

**(50)**

O PPAR $\alpha$  está envolvido com a degradação  $\beta$ -oxidativa de ácidos graxos, na cetogênese, gluconeogênese, catabolismo de colesterol e metabolismo de lipídeos, e ainda possui efeitos antiinflamatórios por suprimir genes pró-inflamatórios (143, 144). No tecido adiposo, esse receptor pode controlar processos antiinflamatórios por três mecanismos: regulação direta da expressão de genes inflamatórios; diminuição da hipertrofia dos adipócitos e eventos sistêmicos provenientes do fígado (145).

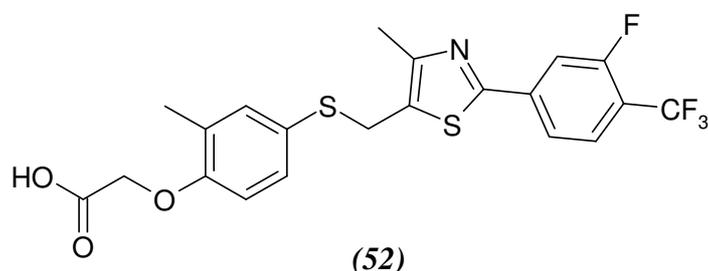
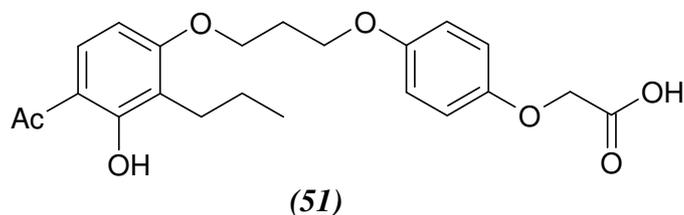
Porém, em geral, a investigação sobre o papel do PPAR $\alpha$  em fígado de humanos é dificultada pelo baixo nível de expressão desse receptor em linhagens de células de hepatoma humano (146).

O PPAR $\beta/\delta$  é o menos conhecido entre os PPAR. As características gerais de fixação do ligante de PPAR $\beta/\delta$ , dificulta a identificação fisiologicamente dos ligantes para o receptor (147). Os ligantes desse receptor podem ser compostos endógenos, que acabam atuando como ligantes naturais, como, por exemplo, ácidos oleicos e linoleicos.

Hipertrigliceridemia e resistência à insulina na obesidade, ou seja, síndrome metabólica, estão relacionadas com o armazenamento de gordura ectópica e prejuízo na regulação da oxidação de gordura. Alguns estudos sugerem que a ativação de PPAR $\beta/\delta$  pode corrigir essas anormalidades.

Esse receptor pode ser ativado por prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub> ou prostaciclina) ou análogos estáveis da prostaciclina como carbaprostaciclina. Os ligantes sintéticos de alta afinidade por PPAR $\beta/\delta$ , incluem **L165041** (ácido 4-[3-(4-acetil-3-hidroxi-2-propilfenoxi)propoxi]fenoxi) acético) **(51)**, e **GW0742**

(ácido 4-[2-(3-fluoro-4-trifluorimetil-fenil)-4-metil-tiazolil-5-metilsulfanil]-2-metil-fenoxi] acético) **(52)** (148).



Após a administração de L165041 a ratos diabéticos foi observado um aumento dos níveis séricos do colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDLc) e esse foi o primeiro efeito biológico descrito por um agonista de PPAR $\beta/\delta$  (149). Ratos com alto teor de gordura também apresentaram melhora na sensibilidade à insulina em resposta à ativação do receptor de PPAR $\beta/\delta$  (150).

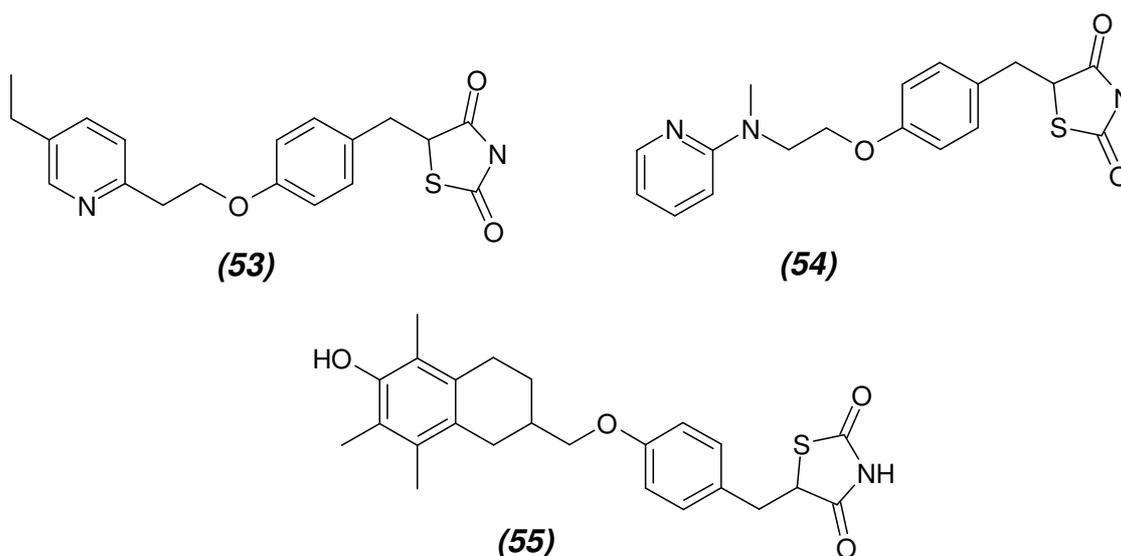
Esses relatos mostraram que os ligantes para o receptor de PPAR $\beta/\delta$  têm um grande potencial para o tratamento de doenças associadas a lipídeos, homeostase de glicose, incluindo diabetes.

O receptor de PPAR $\gamma$  é o mais estudado dentre os PPAR. Ele está intimamente envolvido com a regulação da expressão de genes que regulam o metabolismo, diferenciação celular, apoptose e inflamação.

Ele foi mapeado no cromossomo 3 na região 3p25, dando origem a três RNA mensageiros: PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2, PPAR $\gamma$ 3. O PPAR $\gamma$ 1 é expresso em uma ampla variedade de tecidos, incluindo coração, cólon, intestino delgado e

grosso, rins, pâncreas e baço. O PPAR $\gamma$ 2 é expresso no tecido adiposo e PPAR $\gamma$ 3 tem expressão restrita a macrófagos e intestino grosso (133).

Os principais ligantes de PPAR $\gamma$  são as tiazolidinadonas (TZD) ou glitazonas que são utilizados comercialmente como agentes anti-diabéticos. As principais glitazonas são: pioglitazona **(53)** (Actos®), rosiglitazona **(54)** (avandia®) e a troglitazona **(55)**, sendo essa última não mais disponível comercialmente devido aos seus efeitos tóxicos (151).



Elas agem aumentando a sensibilidade à insulina no fígado, músculos e adipócitos, diminuindo a resistência periférica. Além disso, quando ativam os receptores de PPAR, regulam a expressão de genes que afetam o metabolismo glicídico e lipídico responsáveis pela captação de glicose mediada pela insulina nos tecidos periféricos e pela diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, entre outros efeitos. São capazes também de aumentar a expressão dos transportadores de glicose (GLUT4), da lipoproteína lipase e reduzem a expressão da leptina e do fator de necrose tumoral (TNF-alfa) (152).

As principais expressões dos PPAR nos tecidos e funções das suas isoformas são apresentadas na **Tabela 02** (144).

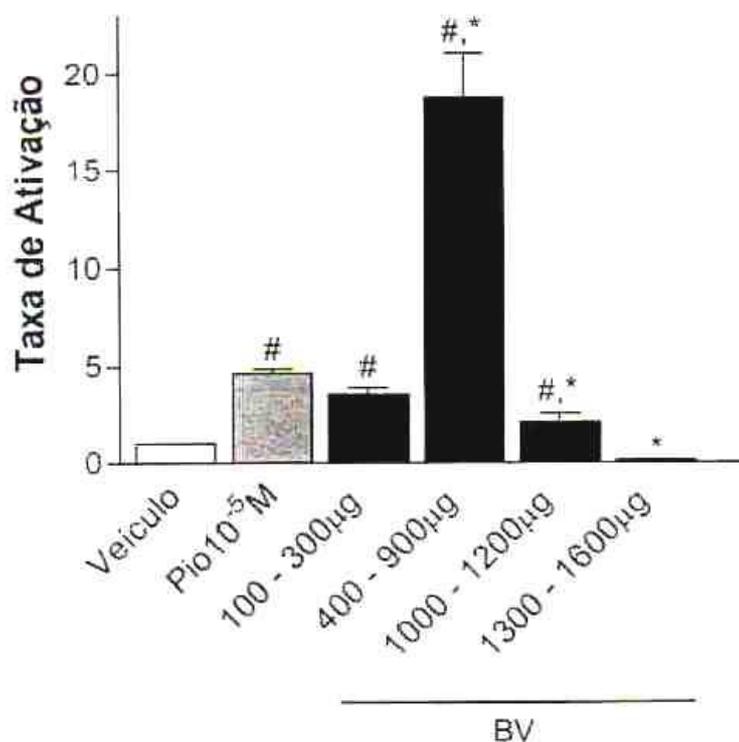
**Tabela 02.** Expressão das isoformas dos Receptores Ativado por Proliferadores Peroxissomais (PPAR) nos tecidos e suas principais funções.

<i>Isoformas</i>	<i>Tecidos ou tipos de células</i>	<b>Funções</b>
PPAR $\alpha$	Fígado, músculo esquelético, tecido adiposo marron, coração, vascular e células do tipo: macrófagos/monócitos, células endoteliais, células do músculo liso e linfócitos	Mediador do metabolismo de lipídeos, efeitos antiinflamatórios e cardioprotetores, homeostase lipídica de macrófagos.
PPAR $\beta/\delta$	Expresso em vários tecidos	Regulador do metabolismo de lipídeos, proliferação celular e resposta antiinflamatória
PPAR $\gamma$	Tecido adiposo branco e marron, cólon, baço, retina vascular e células do tipo: monócitos, macrófagos, endoteliais, células do músculo liso, linfócitos, células dendríticas, trombócitos e megacariócitos.	Diferenciação de pré-adipócitos para adipócitos, metabolismo lipídico, modulador da ação da insulina, homeostase lipídica de macrófagos, atividade trombolítica e antiinflamatória.

Em 2005, com o objetivo de estudar o mecanismo molecular envolvido no efeito anti-diabetogênico da espécie conhecida popularmente como “Pata-de-Vaca”, foi investigado o efeito do extrato de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC (Bv) sobre a atividade transcricional mediada pelo PPAR $\gamma$ . Para verificar se o efeito hipoglicemiante promovido pelo extrato aquoso de Bv em modelos animais poderia ser atribuído a uma atividade PPAR $\gamma$ -agonista do extrato, foi realizado um ensaio de gene repórter em células U937 co-transfectadas com plasmídeo de expressão para PPAR $\gamma$  e com plasmídeo repórter PPRE-tk-luc, seguido de tratamento com pioglitazona (controle positivo) e extrato aquoso das folhas de Bv (66).

Os resultados mostraram que o tratamento das células U937 com Bv induziu o aumento progressivo e significativo da atividade transcricional mediada pelo PPAR $\gamma$  (**Figura 06**). O extrato obtido de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC. apresentou, nas doses de 100  $\mu\text{g/mL}$  a 300  $\mu\text{g/mL}$ , um valor semelhante ao observado pela pioglitazona na concentração de  $10^{-5}$  M (ativações de  $3.5 \pm 0.3$  e  $4.6 \pm 0.2$ , respectivamente). Mais que isso, doses de 400  $\mu\text{g/mL}$  a 900  $\mu\text{g/mL}$  de Bv aumentaram a atividade transcricional mediada pelo PPAR $\gamma$  de forma significativamente maior do que a apresentada

pela pioglitazona ( $18.8 \pm 2.2$  e  $4.6 \pm 0.2$ , respectivamente). E em doses mais elevadas *Bv* diminuiu a atividade transcricional da célula provavelmente, por ocorrer efeitos tóxicos do extrato (66).



**Figura 06 - Extrato aquoso de *Bauhinia variegata* aumenta a atividade transcricional mediada por PPAR $\gamma$ .** Células U937 foram co-transfectadas com 3 $\mu$ g do plasmídeo repórter PPRE-tk-luc e 1,5 $\mu$ g do plasmídeo de expressão para PPAR $\gamma$ . As células foram tratadas por 24 horas com veículo, 10<sup>-5</sup>M de pioglitazona (Pio) e doses crescentes de *Bv*. A atividade luciferase foi, então, mensurada. # $p$ <0.05 vs. veículo e \* $p$ <0.05 vs. controle positivo. n =3. (66).

Esses resultados mostraram claramente que o extrato aquoso de folhas de *B. variegata* var. *variegata* DC. possui atividade agonista sobre PPAR $\gamma$  e este efeito farmacológico poderia explicar o mecanismo terapêutico dos extratos dessa espécie no diabetes. Assim, a identificação do composto responsável por esta atividade pode representar uma alternativa farmacológica no tratamento do Diabetes melito tipo 2.

Dessa forma, considerando que pouco se sabe sobre as atividades biológicas da espécie *B. variegata* var. *variegata* e que ainda pouco se sabe da química relacionada às atividades biológicas dessa espécie sobre os receptores PPARs, os seguintes objetivos são propostos:

## **CAPÍTULO 2: Objetivos**

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo Geral

Avaliar a atividade biológica e química das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC e Identificar agonistas do Receptor dos Proliferadores Peroxissomais - gama (PPAR $\gamma$ ) em extratos de folhas dessa espécie por meio de um estudo químico biomonitorado.

### 2.2 - Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito agonista dos extratos etanólico, aquoso e suas frações de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC sobre PPAR $\gamma$ .
- ✓ Avaliar a atividade sazonal agonista do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC sobre PPAR $\gamma$ .
- ✓ Caracterizar a(s) fração(ões) ou substância(s) isolada(s) da espécie em questão responsável(eis) pela atividade PPAR $\gamma$ -agonista presente no extrato de folhas *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.
- ✓ Quantificar polifenóis e flavonoides nos extratos brutos e frações das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante de extratos etanólico de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.
- ✓ Avaliar a atividade alelopática de extratos etanólico das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.

# **CAPÍTULO 3: Materiais e Métodos**

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

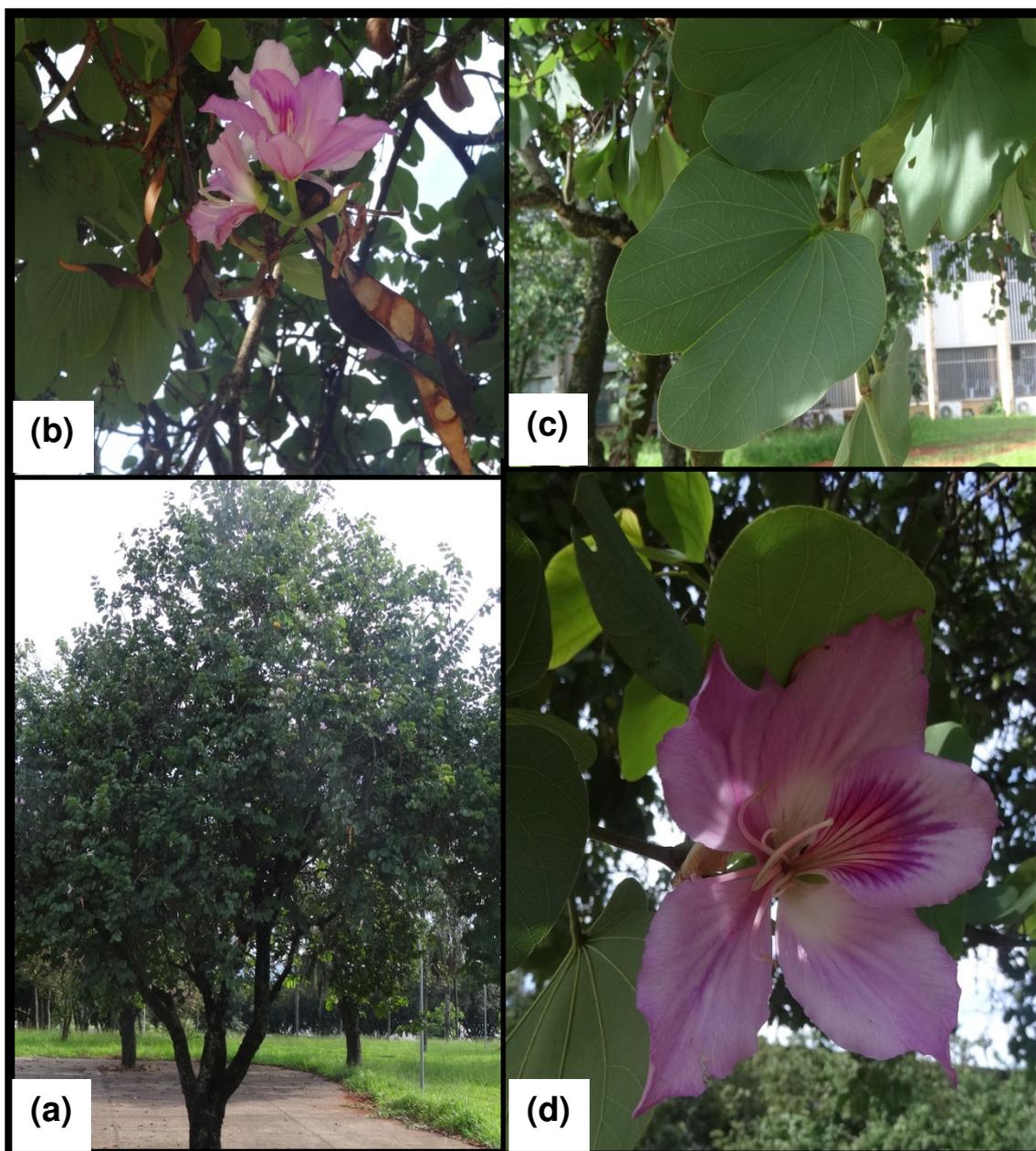
#### 3.1 - Descrição botânica

*Bauhinia* L. é um gênero pantropical, que pertence à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae. Este gênero tem cerca de 300 espécies, sendo cerca de 200 espécies brasileiras (153).

*Bauhinia variegata* L. é comumente conhecida como árvore de orquídea ou pata-de-vaca. Estes nomes comuns podem ser aplicados para várias espécies do gênero, sendo pouco úteis para a identificação da espécie. Possui folhas pecioladas, aproximadamente tão longas quanto largas, bilobadas, palmatinérveas e com os dois ápices arredondados. Suas flores são muito vistosas e ornamentais, de cor rósea, com variação mais escura no estandarte (pétala mais curta e mais larga que as demais), que se tornam mais claras até esbranquiçadas com o tempo; o ovário é súpero e elevado por um ginóforo, o estigma e o estilete são pilosos, com nectário; androceu com cinco estames férteis, anteras dorsifixas, bitecas e com deiscência longitudinal. É árvore exótica (não é nativa), amplamente cultivada no Brasil como ornamental, sendo originária do leste asiático, especificamente Índia e China (154).

É possível distinguir *B. variegata* e *B. forficata* a partir da anatomia foliar (65) bem como em relação a outras espécies do gênero por meio da combinação de caracteres morfológicos externos e anatômicos (65).

Entre as quatro variedades descritas para esta espécie, *B. variegata* var. *chinensis* DC. foi sinonimizada (155), restando três variedades: a) *B. variegata* var. *alboflava* De Wit, b) *B. variegata* var. *candida* (Aiton) Buch.-Ham. (não confundir com o homônimo sinonimizado *B. variegata* var. *candida* (Aiton) Corner, c) *B. variegata* var. *variegata* DC. (**Figura 07**). Esta última, usada no presente trabalho, distingue-se porque é a variedade típica da espécie, com flores róseas, enquanto as outras duas apresentam flores brancas.



**Figura 07 - *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC** (arquivos da autora). **(a)** Espécimen objeto desse estudo, localizada no Campus Universitário Darcy Ribeiro – Brasília – DF., **(b)** flores, galhos e frutos *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC., **(c)** Folha de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC., **(d)** Flor de *Bauhinia variegata* var *variegata* DC.

### **3.2 - Obtenção do material botânico**

Folhas *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC. foram coletadas no Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília - DF, em agosto de 2007 e também durante o período de julho de 2008 a abril de 2009, a cada trinta dias. Uma exsicata foi depositada no Herbário do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) sob o número RB 411 881, pela Profa. Ângela Vaz. E exsicatas testemunhas de quatro indivíduos dessa espécie foram incorporadas no acervo do Herbário da Universidade de Brasília (UB) com os dados: Brasil, Distrito Federal, Brasília, Campus da UnB, entrada Sul do ICC, sob o número S.M. Gomes 874 a 877 (fl), 21/05/2009.

As folhas foram secas a temperatura ambiente e pulverizadas em moinho de facas par posterior extração.

### **3.3 - Obtenção dos Extratos Brutos**

#### **3.3.1 - Obtenção do extrato etanólico bruto (BvEE)**

O material botânico (880,5 g) foi submetido à extração por maceração passiva, utilizando etanol como solvente. O processo de maceração foi repetido quatro vezes. Os extratos obtidos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo, sob vácuo, à temperatura de aproximadamente 40 °C (EE; 174,53g).

#### **3.3.2 - Obtenção do extrato aquoso bruto (BvEA)**

O extrato aquoso (BvEA) foi obtido da seguinte forma: o material botânico foi secado em estufa a 50°C e pulverizado. As folhas pulverizadas foram colocadas em água destilada, numa proporção de 1:10 (material botânico:solvente) e a mistura foi aquecida à temperatura de 50°C. A mistura foi deixada em arrefecimento por aproximadamente 30 min. Após esse período, o extrato foi filtrado, congelado e, posteriormente, submetido à liofilização.

### 3.4 - Fracionamento dos Extratos Brutos

#### 3.4.1 - Fracionamento do extrato etanólico bruto (BvEE)

O extrato etanólico bruto (BvEE, 70g), obtido pelo processo de maceração das folhas de *B. variegata* var. *variegata*, foi submetido a uma partição líquido-líquido, dividida em dois passos. No primeiro passo, a mistura água:metanol:hexano (1:1:2) foi utilizada como solvente e foram obtidas duas fases: a hidrometanólica e a hexânica. No segundo passo, a fração hidrometanólica foi submetida a uma nova partição com diclorometano, em razão volumétrica 1:1 obtendo-se a fração diclorometanólica e hidrometanólica.

Dessa forma, após o fracionamento do extrato foram obtidas três frações: hexânica (BvFH) (8,2g, 11,7%) diclorometanólica (BvFD) (24,8g, 35,4%) e hidrometanólica (BvFHM) (37,0g, 52,8%), que foram concentradas em evaporador rotativo, sob vácuo a uma temperatura inferior a 40°C, sendo que a fração hidrometanólica foi ainda congelada e liofilizada **Figura 08**.

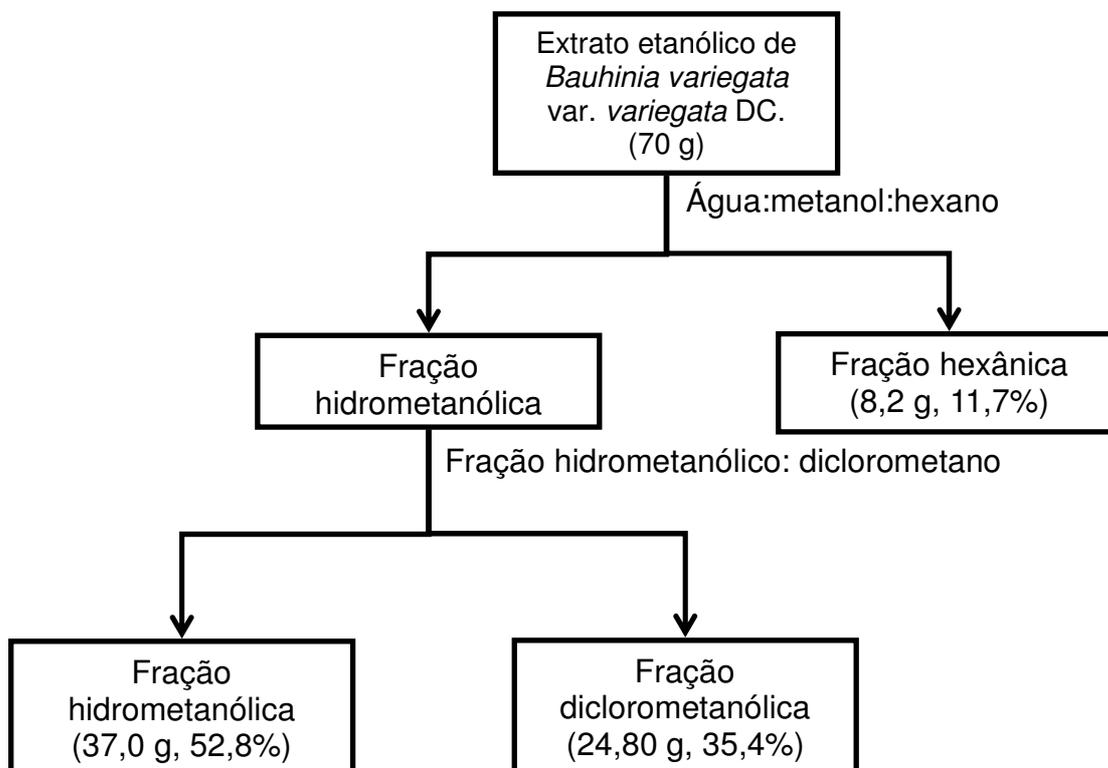


Figura 08 - Partição líquido-líquido do extrato etanólico (BvEE) de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.

### 3.4.2 - Fracionamento do extrato aquoso bruto (BvEA)

Parte do extrato aquoso das folhas de *B. variegata* var. *variegata* (8 g) foi solubilizada em uma mistura de metanol:água (3:2) e as duas frações - solúvel e insolúvel - foram separadas. A fração solúvel foi concentrada em evaporador rotativo, para retirada do metanol fornecendo assim, uma solução aquosa que foi submetida à partição líquido-líquido com hexano, clorofórmio, acetato de etila, resultando nas frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, e fração aquosa resultante da partição (**Figura 9**) (156, 157).

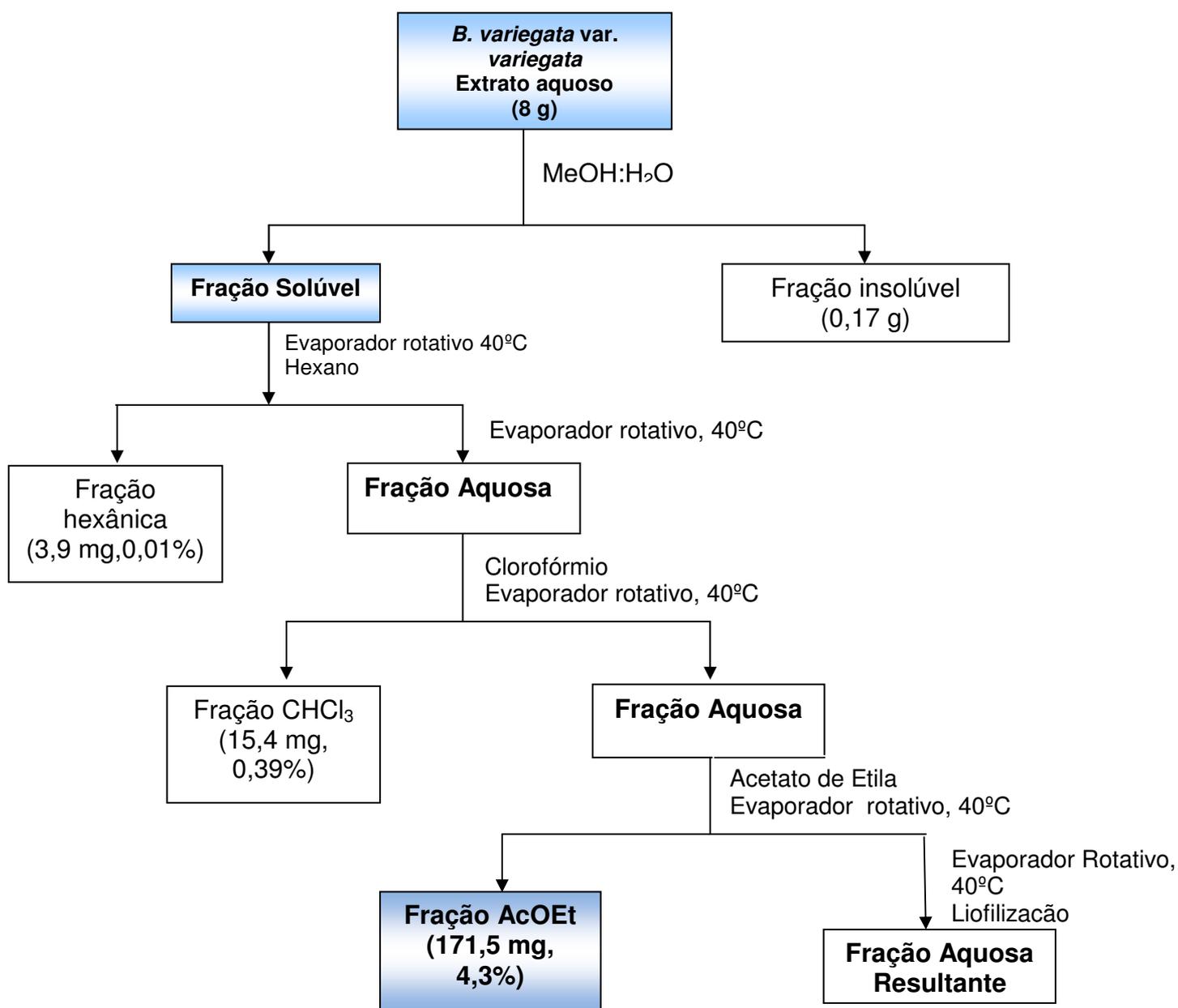


Figura 09 – Fracionamento do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var *variegata* DC.

### 3.5 - Análises cromatográficas

#### 3.5.1 – Cromatografia líquida em coluna de sephadex LH-20

O gel Sephadex™ LH-20 (Amersham Biosciences) foi suspenso em metanol e mantido por 24 horas em repouso. Após esse período foi empacotado em coluna de vidro (Altura: 25 cm; Diâmetro: 2,5 cm) até total decantação do gel. A coluna foi mantida em repouso por 24 horas. Em seguida, 82,8 mg da fração AcOEt (Figura 8) foram diluídos em quantidade mínima de metanol e a solução resultante foi aplicada no topo da coluna, que foi eluída com o mesmo solvente sendo obtidas 32 frações de 5 mL. As frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em Cromatografia de Camada Delgada (CCD). A coluna foi eluída até esgotamento.

#### 3.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

As análises por CLAE foram realizadas em equipamento da marca Hitachi Lachrom Elite e utilizados os detectores arranjo diodos (DAD). As amostras foram dissolvidas em solvente apropriado e filtradas.

##### - métodos analíticos:

**CLAE 01:** coluna: Lichrospher 100 NH2, 250 mm x 4,0 mm (HP 5 µm) mantida a 30°C; fluxo: 1 mL/min; eluente: bomba A (acetonitrila), bomba B (água); detector: por índice de refração (IR); sistema de eluição: isocrático; programa de eluição: bomba A: bomba B (80:20).

**CLAE 02:** coluna: LichroCART 150-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 µm); Pré-coluna: LichroCART 4-46 Purospher STAR RP 18e (5 µm); fluxo: 0,6 mL/min; eluente: bomba A (1% de solução de ácido fosfórico 0,1M), bomba B (acetonitrila); detector: DAD; intervalo de análise: 230-400 nm; sistema de eluição: gradiente.

Programa de eluição:	<b>Bomba A (%)</b>	<b>Bomba B (%)</b>
<b>Tempo (min)</b>		
0	90	10

40	70	30
50	50	50
55	90	10

### 3.5.3 - Cromatografia líquida em coluna de Sílica Gel (CC)

O extrato etanólico bruto (BvEE) foi submetido à cromatografia líquida em coluna (CC), utilizando-se Sílica gel 60 G (70-230 mesh - Merck), como fase estacionária, e solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade como fase móvel. A amostra BvEE foi dissolvida em quantidade mínima de solvente e do material adsorvente usado como fase estacionária e, logo em seguida, aplicada no topo da coluna.

A eluição das frações foi acompanhada por análise das mesmas em CCD, sendo que as frações que apresentavam o mesmo perfil foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo, sob vácuo, a 40°C, para posterior processo de purificação.

### 3.5.4 - Cromatografia em camada delgada (CCD)

#### - Fase Estacionária (FE):

- Placas de sílica gel 60G (Merck), preparadas em suporte de vidro, com 0,25 mm de espessura (analítica), ativadas a 105 °C.

## 3.6 - Reveladores (156)

### R1 – Solução ácida de anisaldeído

Reagente utilizado para detecção de esteroides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, sapogeninas, terpenos de modo geral (óleos essenciais), antibióticos e micotoxinas.

**Solução A:** Solução de anisaldeído em ácido acético 2%

**Solução B:** Solução etanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20%

A cromatoplaça foi borrifada com solução A, em seguida, com solução B e foi então aquecida a uma temperatura de 100°C.

**R2 – Reagente NP/PEG**

Reagente para detecção de flavonoides e outros compostos fenólicos pela intensificação de fluorescência.

**Solução A:** solução metanólica de difenilboriloxietilamina 2%.

**Solução B:** solução etanólica de polietilenoglicol – 400 (PEG 400) 5%.

A cromatoplaça foi borrifada com a solução A, em seguida com a solução B, e observada sob luz ultravioleta (= 365nm).

**R3 – radiação ultravioleta**

A cromatoplaça foi sistematicamente analisada sob luz ultravioleta (=365nm).

Detecção de substância contendo grupos cromóforos.

**R4 – verde de bromocresol**

Utilizado para a caracterização de ácidos graxos de cadeia longa.

Verde de bromocresol (0,100g) foi dissolvido em 100 mL de metanol e alcalinizado com solução 1 mol/L de NaOH até que a solução apresente cor azul intenso.

Detecção de ácidos carboxílicos pelo surgimento de cor amarela sobre fundo azul, imediatamente após a borrifação.

**R5 – Sulfato cérico**

Identificação de vários compostos. Detecção de lactonas sesquiterpênicas pelo aparecimento de mancha branca imediatamente após a borrifação.

Sulfato cérico (4,2 g) foi dissolvido em 500 mL de água, seguido da adição de 2,8 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi aquecida até a dissolução do sólido e após resfriamento, completou-se o volume para 1000 mL com água destilada. A cromatoplaça foi então, borrifada com esta mistura e aquecida a 100° C por 10 min.

**R6 – Reagente de Komarovsky**

Detecção de glicosídeos (saponinas), pelo aparecimento de manchas azuis, alaranjadas ou marrons, após aquecimento.

**Solução A:** Solução metanólica de 4-hidroxibenzaldeído a 2%

**Solução B:** solução etanólica de ácido sulfúrico a 50%

As soluções foram misturadas na proporção 3:2. Após a borrifação, a cromatoplaça foi aquecida a 100 °C por 10 min.

**R7 – Reagente de Dragendorff**

Utilizado para a revelação de alcaloides, compostos nitrogenados farmacologicamente ativos.

**Solução A:** nitrato básico de bismuto (1,7g) foi dissolvido em solução de ácido acético:água (1:4)

**Solução B:** solução aquosa de iodeto de potássio a 40%

Para borrifação da placa cromatográfica foi preparada uma solução composta de 5,0 mL de A; 5,0 mL de B; 20 mL de ácido acético e 70,0 mL de água. Detecção de alcaloides e peptídeos, pelo surgimento de mancha amarelo-alaranjada, imediatamente após a borrifação.

**3.7 - Análises Espectrométricas****3.7.1 - Espectrometria de Infravermelho (IV)**

Os espectros foram obtidos no espectrofotômetro Bomem Hartmann & Braun MB – 100 (Alemanha), com valores expressos em  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras foram analisadas em pastilhas preparadas com brometo de potássio (KBr) (Instituto de Química – IQ – UnB).

**3.7.2 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram registrados no espectrômetro Varian Mercury Plus (300 MHz, 7,04T, E.U.A), utilizando sondas de detecção ATB e SW de 5 mm de diâmetro interno. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm e os solventes deuterados foram  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CDCl}_3$ , e  $\text{MeOD}_4$ , com TMS (tetrametilsilano) como referência interna (Instituto de Química – IQ – UnB).

### **3.8- Ensaios Biológicos**

#### **3.8.1 - Atividade agonista dos extratos, frações e substâncias isoladas de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC. ao receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama (PPAR $\gamma$ )**

##### **- Procedimentos gerais**

Foram utilizados o ensaio de gene-repórter e a co-transfecção em células U937 (promonócitos humanos) e células mesangiais por meio da eletroporação com o plasmídeo de expressão CMV- PPAR $\gamma$  e o plasmídeo-repórter PPRE-Luc, que continha o elemento responsivo ligado à sequência que codifica o gene-repórter da luciferase.

As células U937 foram cultivadas em meio RPMI e as células mesangiais cultivadas em meio DMEN, ambas mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> em garrafas para cultura de células e placas, respectivamente. Ambos os meios de cultura continham 10% de soro fetal bovino com 2 mM de glutamina e 50 U/mL de penicilina e 50  $\mu$ g/mL de estreptomicina. Após 24 horas da realização da transfecção, as células foram lisadas e o substrato para a enzima luciferase (luciferina) (Luciferase Assay System, Promega) foi adicionado. Rosiglitazona (10<sup>-5</sup>M) diluída em uma mistura de dimetilsulfóxido:etanol (DMSO:EtOH, 2:3) foi utilizada como controle positivo.

##### **- Transfecção e ensaio de gene-repórter**

O plasmídeo que continha o promotor do citomegalovírus fusionado ao gene que codifica o receptor PPAR $\gamma$  (CMV- PPAR $\gamma$ ) foi co-transfectado com o plasmídeo repórter PPRE-Luc no núcleo das células U937 e nas células mesangiais por meio da eletroporação. Após a transfecção, as células foram tratadas com as amostras.

Para a transfecção, as células foram coletadas por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos e suspensas em 0,5 mL de solução contendo PBS + Cálcio + glicose. As células foram misturadas em um eppendorf com 3  $\mu$ g do plasmídeo repórter e 1,5  $\mu$ g do plasmídeo de expressão e posteriormente todo

o conteúdo foi transferido para cuvetas. Na eletroporação foi utilizado um gerador de pulso Bio-Rad com voltagem de 300 mV e 950  $\mu\text{F}$  de capacitância para as células U937, enquanto que para as células mesangiais foi utilizado 350 mV e 700  $\mu\text{F}$  de capacitância. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em meio de cultura próprio, plaqueadas 1 mL em placas Corning® de 12 poços e tratadas com o veículo utilizado (DMSO:EtOH 2:3), com rosiglitazona  $10^{-5}\text{M}$  (controle positivo) e com amostras.

Depois de 24 horas, as células U937 foram coletadas por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado e ao precipitado celular foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do tampão de lise 1X (Promega). Do lisado celular, foram utilizados 20  $\mu\text{L}$  e misturados com 20  $\mu\text{L}$  de luciferina (Luciferase Assay System, Promega). A única diferença na leitura das células mesangiais é que a coleta e a centrifugação não foram necessárias, uma vez que o tampão foi colocado diretamente nos poços da placa após a retirada do meio de cultura com a bomba à vácuo. O luminômetro quantificava a luz emitida da reação enzimática entre a luciferase e a luciferina correspondente à taxa de ativação do receptor pelo extrato aquoso de *Bauhinia variegata*.

#### **- Amostras utilizadas**

De modo geral, foi preparada uma solução-mãe na concentração de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para cada amostra, e posteriormente no tratamento das células, plaqueadas com 1 mL de meio de cultura na placa Corning® de 12 poços, foi utilizado 1  $\mu\text{L}$  da solução-mãe para obter uma concentração final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3  $\mu\text{L}$  da solução-mãe para obter uma concentração final de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 7  $\mu\text{L}$  da solução-mãe para obter uma concentração final de 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 9  $\mu\text{L}$  da solução-mãe para obter uma concentração final de 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Dessa forma, as amostras utilizadas para o ensaio de gene repórter foram:

- a) Os extratos aquosos das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* coletadas entre julho e dezembro de 2008, diluídos em água destilada numa concentração de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . A amostra foi testada nas concentrações de 100 a 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- b) A fração aquosa, resultante do fracionamento do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* diluído em água destilada numa concentração de 100

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . A amostra foi testada nas concentrações de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**c)** A fração clorofórmica, resultante do fracionamento do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* diluído em EtOH:DMSO 3:2 numa concentração de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . A amostra foi testada nas concentrações de 100, 300, 700 e 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**d)** A fração acetato de etila, resultante do fracionamento do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* diluído em EtOH:DMSO 3:2 numa concentração de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . A amostra foi testada nas concentrações de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**e)** O sólido resultante do fracionamento do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata*, diluído em água numa concentração de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . A amostra foi testada nas concentrações de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**f)** O extrato etanólico bruto das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata*, diluído em água destilada numa concentração de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , do qual foram utilizadas concentrações crescentes de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o teste.

**g)** Compostos descritos na literatura previamente isolados de *Bauhinia variegata*, como a luteolina, kaempferol, isoquercitrina, rutina, quercetina, hesperidina, naringina, ácido palmítico, ácido oleanólico, ácido cafeico, galato de metila, ácido clorogênico e ácido protocatecúico, todos esses compostos foram testados nas concentrações de  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M.

Durante o tratamento das células com amostra solúveis em água, 1  $\mu\text{L}$  de DMSO:EtOH (2:3) foi acrescentado em cada poço, uma vez que este foi o veículo usado para o controle positivo. Os experimentos foram feitos em triplicata.

#### **- Análise Estatística**

Todos os gráficos apresentados foram feitos com o auxílio do programa Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc.). Os resultados representam a média de pelo menos três ensaios em triplicata. A análise de variância a 5% (ONE-WAY-ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls foi feita pelo mesmo programa. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### - Cálculo da Taxa de ativação da transcrição

Este cálculo foi feito utilizando a razão entre a atividade média de cada triplicata das células tratadas com o controle positivo ou com os extratos e a atividade média das células tratadas com o veículo (DMSO:EtOH).

Para a comparação em porcentagem (%) da ativação do extrato em relação à taxa de ativação do controle positivo, a média das taxas de ativação de rosiglitazona  $10^{-5}$  M obtidas em todos os experimentos foi considerada como 100% e as porcentagens de ativação dos extratos foram calculadas.

### - Cálculo da correlação de Spearman

Os gráficos apresentados para a análise da correlação de spearman foram feitos com o auxílio do programa Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc.). Essa análise não-paramétrica foi utilizada quando observado que o grau de associação entre duas variáveis apresentam uma distribuição normal. O Coeficiente de correlação de *Spearman* foi utilizado para testar a força de correlação entre duas variáveis considerando um nível de confiança de 95%.  
(157)

### 3.8.2 - Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC pelo método de redução do complexo de fosfomolibdênio.

A capacidade antioxidante do extrato etanólico bruto (BvEE) e de suas frações diclorometanólica e hexânica foi avaliada pela utilização do método baseado na redução do complexo de fosfomolibdênio (158). Foi utilizado como padrão quercetina, composto de atividade antioxidante conhecida. Para isso foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601) onde foram registradas as absorbâncias de todas as substâncias analisadas.

### - Reagentes

O reagente foi preparado pela mistura de 25 mL de solução aquosa de fosfato de sódio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 28 mM), 25 mL de solução aquosa de molibdato de amônio tetra hidratado [ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 4 mM,] e 25 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,6 M,).

#### **- Substância de referência**

Foi preparada uma solução estoque (1 mg/mL) de quercetina (amostra gentilmente cedida pelo professor Dr. Lauro E. S. Barata do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Unicamp) a partir de sua solubilização em etanol o qual foi utilizado como solvente no preparo de todas as amostras. Para construção da curva-padrão foram feitas diluições consecutivas 0,05 mg/mL a 1,0 mg/mL, que partiram da solução estoque, utilizando-se o etanol como solvente.

#### **- Teste antioxidante**

Em tubos do tipo eppendorf (Axigen) 0,1 mL da solução estoque e das amostras a serem testadas, foi adicionado de 1 mL de reagente, em triplicata. Os tubos foram tampados e mantidos em banho-maria a 95°C por 90 min. Após o período determinado, as amostras foram deixadas a arrefecer até a temperatura ambiente.

O conteúdo de cada um dos tubos foi transferido para cubetas de plástico (caminho óptico 1cm) e analisado sob o comprimento de onda 695 nm em espectrofotômetro Shimadzu, previamente zerado com uma mistura de 1 mL do reagente e 0,1 mL do solvente utilizado no preparo das soluções das substâncias em análise.

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa Prisma e curvas-padrão foram construídas.

### **3.8.3 – Quantificação de polifenóis nos extratos aquosos de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* coletadas entre julho de 2008 a abril de 2009.**

O total de polifenóis nos extratos aquosos das folhas de *B. variegata* var. *variegata* coletadas entre julho de 2008 a junho de 2009 foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com algumas modificações (159). Foi utilizado como padrão ácido gálico. Para isso foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601) onde foram registradas as absorvâncias de todas as substâncias analisadas.

#### **- Reagentes**

Foi alicotado 65 µL da solução aquosa dos extratos na concentração de 2 mg/mL e em seguida, foi misturada com 250 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% e com 250 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e posteriormente o volume foi completado para 2500 µL.

#### **- Substância de referência**

Para construção da curva-padrão, foram feitas diluições consecutivas curva de ácido gálico (Sigma-Aldrich) de 0,01 mg/mL a 1,25 mg/mL utilizando-se água como solvente.

#### **- Quantificação de polifenóis**

Em tubos do tipo eppendorf (Axigen), 65 µL da solução aquosa dos extratos na concentração de 2 mg/mL foram misturados com 250 µL da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% e com 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), e posteriormente o volume foi completado para 2500 µL. Os tubos foram tampados e mantidos em temperatura ambiente por 1 h.

O conteúdo de cada um dos tubos foi transferido para cubetas de plástico (caminho óptico 1 cm) e analisado sob o comprimento de onda 760 nm em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601). O teste foi realizado 3 vezes e em triplicata. O total de polifenóis foi expresso em µg/g (equivalentes de ácido gálico). Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa Prisma GraphPad 3.0.

### **3.8.4 – Quantificação de flavonoides nos extratos aquosos de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* coletadas entre julho de 2008 a abril de 2009.**

O total de flavonoides nos extratos aquosos das folhas de *B. variegata* coletadas entre julho de 2008 a abril de 2009 foi determinado pelo método colorimétrico de Woisky and Salatino (1998) com algumas modificações (159). Foi utilizado, como padrão, quercetina. Para isso foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601) onde foram registradas as absorvâncias de todas as substâncias analisadas.

#### **- Reagentes**

Foi alicotado 250 µL das soluções a serem testadas na concentração de 2 mg/mL foram adicionadas a 500 µL da solução etanólica de  $AlCl_3$  à 5%, posteriormente o volume foi completado para 2500 µL.

#### **- Substância de referência**

Foram feitas diluições seriadas de 160 µg/mL a 1 µg/mL de quercetina em metanol (amostra gentilmente cedida pelo professor Dr. Lauro E. S. Barata do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Unicamp)

#### **- Quantificação de flavonoides**

Primeiramente os extratos aquosos foram solubilizados em metanol e houve uma formação de um precipitado branco que foi separado por decantação. O sobrenadante foi então seco em banho-maria e em seguida foi solubilizado em metanol na concentração de 2 mg/mL.

Em tubos do tipo eppendorf (Axigen), 250 µL da solução metanólica dos extratos na concentração de 2 mg/mL foram misturados com 500 µL da solução etanólica de  $AlCl_3$  5%. Em seguida, o volume foi completado para 2500 µL. Os tubos foram tampados e mantidos em temperatura ambiente por 1 h.

O conteúdo de cada um dos tubos foi transferido para cubetas de plástico (caminho óptico 1cm) e analisado sob o comprimento de onda 420 nm em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601). O teste foi realizado 3 vezes e em

triplicata. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa Prisma GraphPad 3.0.

### **3.8.5 - Avaliação do efeito de inibição de germinação do extrato de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC. em *Lactuca sativa* (160).**

#### **- Preparo das Sementes**

A escolha da espécie-alvo (*Lactuca sativa*) foi baseada em alguns fatores como: maior sensibilidade aos aleloquímicos, pequeno período requerido para a germinação (24 a 48 horas), potencial de germinação à temperatura ambiente do laboratório ( $27\pm 2$  °C) e facilidade no acesso.

Sementes selecionadas de alface, cultivar *Lactuca sativa*, previamente tratadas com hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos, lavadas em seguida com água destilada, foram colocadas para germinar em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. As placas foram previamente esterilizadas em autoclave, revestidas com papel de filtro Wathman nº1 e umedecidas com 10 mL das soluções a serem testadas para completa evaporação do solvente.

#### **- Teste de germinação**

As amostras nas concentrações de 500, 1000, 2000 e 4000 ppm foram solubilizadas em solvente adequado e as soluções distribuídas no volume de 10 mL para cada placa de Petri de modo que o papel ficasse umedecido. Após a evaporação do solvente utilizado no preparo das amostras (diclorometano ou etanol), foram adicionados 10 mL de água destilada e 25 sementes distribuídas de forma aleatória para cada placa, que foram mantidas a uma temperatura média de 25°C. O grupo controle recebeu apenas os solventes que foram utilizados para diluir os extratos (diclorometano ou etanol) e água destilada. Para cada tratamento foram feitas 3 repetições totalizando 75 sementes por grupo.

O número de sementes germinadas foi verificado nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas. O critério de germinação foi a emergência da radícula ( $\pm 2$  mm) seguida de curvamento geotrópico da raiz.

Para a análise dos testes foi utilizada a variável de germinação ou germinabilidade (G%), sendo que os valores foram obtidos por meio da seguinte expressão, descrita por Ferreira & Borghetti (2004) (160):

$$- G = N/A \times 100$$

Onde:

$G$  = percentual de germinação;

$N$  = número total de sementes germinadas;

$A$  = número total de sementes colocadas para germinar;

#### - **Análise estatística**

Os dados de germinação foram submetidos ao teste de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey a 5%, onde  $p < 0,05$ .

## **CAPÍTULO 04: Resultados**

#### 4.1 – Rendimentos dos extratos brutos obtidos de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.

De acordo com métodos de obtenção de extratos brutos e frações descritos, foram obtidos os seguintes rendimentos descritos na **Tabela 03**.

**Tabela 03** - Rendimentos dos extratos brutos das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.

<i>Extratos brutos</i>	Folhas secas (g)	Massa (g)	Rendimento (%)
BvEE	205,7	33,07	16,07
BvEA julho/2008	86,66	4,16	4,80
BvEA agosto/2008	44,91	5,12	11,40
BvEA setembro/2008	25,33	0,56	2,21
BvEA outubro/2008	93,76	3,01	3,21
BvEA novembro/2008	76,51	4,04	5,28
BvEA dezembro/2008	102,46	4,65	4,54
BvEA janeiro/2009	165,15	10,90	6,60
BvEA fevereiro/2009	135,48	3,40	2,51
BvEA março/2009	127,55	2,50	1,96
BvEA abril/2009	138,81	10,30	7,42

BvEE = extrato etanólico; BvEA= extrato aquoso

#### 4.2 – Análise da atividade agonista dos extratos aquosos brutos e frações obtidas de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC Ao receptor de PPAR $\gamma$

##### 4.2.1 - Avaliação sazonal agonista do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata*

##### 4.2.1.1 - Testes em células U937 dos extratos aquosos de folhas coletadas entre o período de julho a dezembro de 2008.

Os extratos aquosos das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC., coletadas nos meses de julho a dezembro de 2008, nas concentrações de 100 µg/mL a 900 µg/mL, foram utilizados no tratamento das células U937 co-transfectadas com o plasmídeo de expressão CMV- PPAR $\gamma$  e com o plasmídeo repórter PPRE-Luc. Posteriormente, a atividade agonista foi analisada por ensaio de gene-repórter.

Os resultados indicaram variações nas taxas de ativação durante estes seis primeiros meses de teste, porém os extratos, nas concentrações de 100 µg/mL e 300 µg/mL, mantiveram a taxa de ativação mais próxima daquela observada para o veículo, enquanto que nas concentrações de 700 µg/mL e 900 µg/mL apresentaram as maiores taxas de ativação do receptor PPAR $\gamma$ . A exceção ocorreu para os extratos obtidos nos meses de novembro e dezembro de 2008, em que estas últimas concentrações não ativaram o receptor de forma estatisticamente significativa. Nestes seis primeiros meses de teste, a maior taxa de ativação encontrada foi a do extrato de julho de 2008, nas concentrações de 700 a 900 µg/mL (**Tabela 04**).

**Tabela 04** - Atividade agonista ao PPAR $\gamma$  dos extratos aquosos de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC. coletada no período de julho a dezembro de 2008.

	jul/2008	ago/2008	set/2008	out/2008	nov/2008	dez/2008
<b>Veículo</b>	1,00 $\pm$ 0,00					
<b>Rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M</b>	4,71 $\pm$ 0,29*	5,00 $\pm$ 0,20*	4,95 $\pm$ 0,07*	5,13 $\pm$ 0,03*	5,10 $\pm$ 0,10*	4,91 $\pm$ 0,49*
<b>100 <math>\mu</math>g/mL</b>	1,08 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 0,01	1,15 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,04	1,20 $\pm$ 0,08	1,11 $\pm$ 0,04
<b>200 <math>\mu</math>g/mL</b>	1,20 $\pm$ 0,01	1,17 $\pm$ 0,03	1,15 $\pm$ 0,02	1,40 $\pm$ 0,04	1,30 $\pm$ 0,03	1,11 $\pm$ 0,07
<b>300 <math>\mu</math>g/mL</b>	1,34 $\pm$ 0,04	1,20 $\pm$ 0,05	1,27 $\pm$ 0,01	1,77 $\pm$ 0,12*	1,38 $\pm$ 0,25	1,09 $\pm$ 0,03
<b>400 <math>\mu</math>g/mL</b>	1,91 $\pm$ 0,09*	1,27 $\pm$ 0,10	1,39 $\pm$ 0,00*	2,01 $\pm$ 0,21*	1,44 $\pm$ 0,23	1,10 $\pm$ 0,09
<b>500 <math>\mu</math>g/mL</b>	1,86 $\pm$ 0,13*	1,41 $\pm$ 0,04	1,38 $\pm$ 0,01*	1,88 $\pm$ 0,18*	1,50 $\pm$ 0,32	1,18 $\pm$ 0,06
<b>600 <math>\mu</math>g/mL</b>	2,06 $\pm$ 0,09*	1,49 $\pm$ 0,13	1,37 $\pm$ 0,00*	1,94 $\pm$ 0,20*	1,76 $\pm$ 0,33	1,16 $\pm$ 0,06
<b>700 <math>\mu</math>g/mL</b>	3,50 $\pm$ 0,29*	1,83 $\pm$ 0,20*	1,54 $\pm$ 0,07*	1,74 $\pm$ 0,09*	1,27 $\pm$ 0,03	0,74 $\pm$ 0,19
<b>800 <math>\mu</math>g/mL</b>	3,63 $\pm$ 0,31*	1,95 $\pm$ 0,17*	1,49 $\pm$ 0,07*	1,89 $\pm$ 0,21*	1,69 $\pm$ 0,45	0,74 $\pm$ 0,21
<b>900 <math>\mu</math>g/mL</b>	3,61 $\pm$ 0,29*	2,00 $\pm$ 0,20*	1,55 $\pm$ 0,09*	2,08 $\pm$ 0,15*	1,27 $\pm$ 0,05	0,69 $\pm$ 0,19

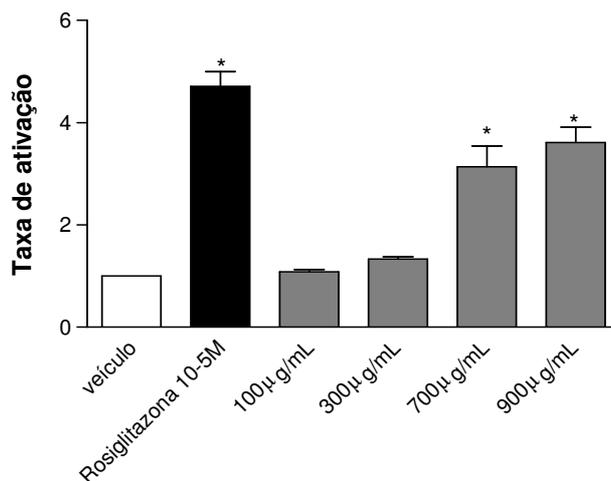
**Legenda:** Células U937 foram co-transfectadas com 1,5  $\mu$ g do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3  $\mu$ g do plasmídeo PPRE-Luc. Tratamentos: veículo (DMSO: EtOH, 2:3), Rosi = rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M e extrato aquoso das folhas de *B. variegata* var. *variegata* nas concentrações de 100  $\mu$ g/mL a 900  $\mu$ g/mL. \*p<0,05 vs veículo.

#### 4.2.1.2 - Testes em células mesangiais dos extratos aquosos de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* coletadas entre o período de janeiro a abril de 2009.

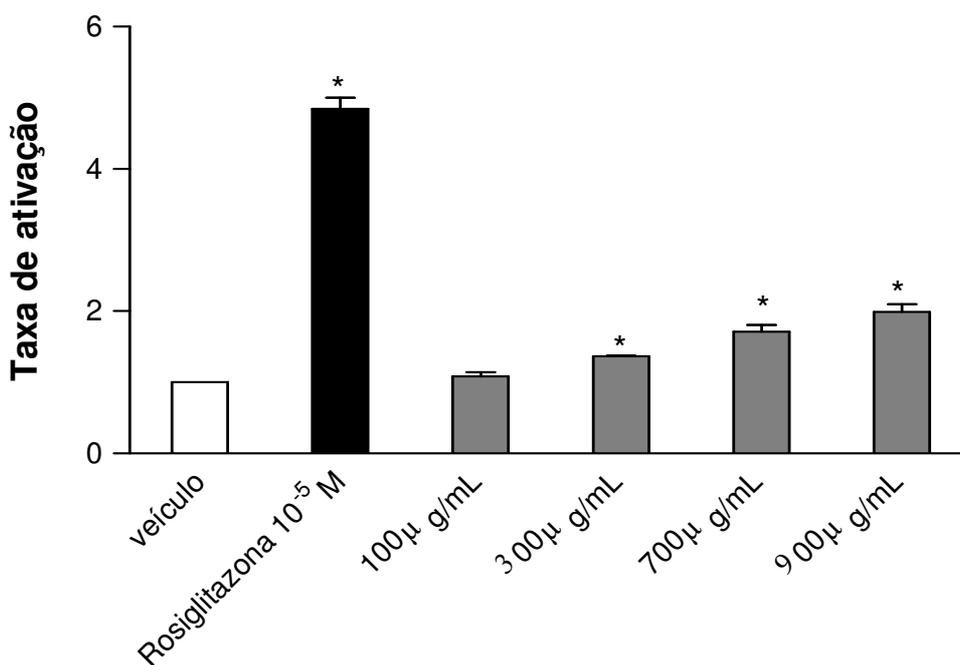
Os ensaios realizados com células U937 mostraram um padrão nas taxas de ativação promovidas por BvEA nas concentrações analisadas. Assim, os testes realizados com os extratos aquosos das folhas dessa espécie coletadas no período de janeiro a abril de 2009 foram feitos somente com as concentrações de 100 µg/mL, 300 µg/mL, 700 µg/mL e 900 µg/mL.

Para os testes, o plasmídeo de expressão CMV- PPAR $\gamma$  e o plasmídeo repórter PPRE-Luc foram co-transfectados em células mesangiais, e a atividade agonista foi avaliada por ensaio de gene-repórter. Ao longo dos meses foi necessária a troca de linhagem celular U937 para células mesangiais e para garantir a ausência de variação de resultados pela troca de células o experimento realizado com BvEA de julho de 2008 foi repetido dessa vez com células mesangiais, para as quatro concentrações citadas acima. O extrato, nas concentrações de 100 µg/mL e 300 µg/mL, promoveram uma taxa de ativação de  $1,08 \pm 0,06$  e  $1,36 \pm 0,01$  vezes em células mesangiais, enquanto que nas células U937 apresentaram taxas de  $1,08 \pm 0,04$  e  $1,34 \pm 0,04$  vezes, respectivamente.

As concentrações de 700 µg/mL e 900 µg/mL mostraram taxas de ativação de  $1,71 \pm 0,10$  e  $1,99 \pm 0,10$  nas células mesangiais, enquanto que ativações maiores, da ordem de  $3,14 \pm 0,40$  e  $3,61 \pm 0,29$  vezes, foram alcançadas quando os ensaios foram feitos usando células U937 (**Figuras 10 e 11**). Porém, para essas duas concentrações houve ativação do receptor estatisticamente diferente do veículo e, dessa forma, os resultados não mostraram variação significativa com a mudança de células. A diminuição da taxa de ativação pode ter ocorrido devido o armazenamento do extrato, pois ainda não se sabe quais condições devem ser mantidos para melhor conservação do composto ativo.

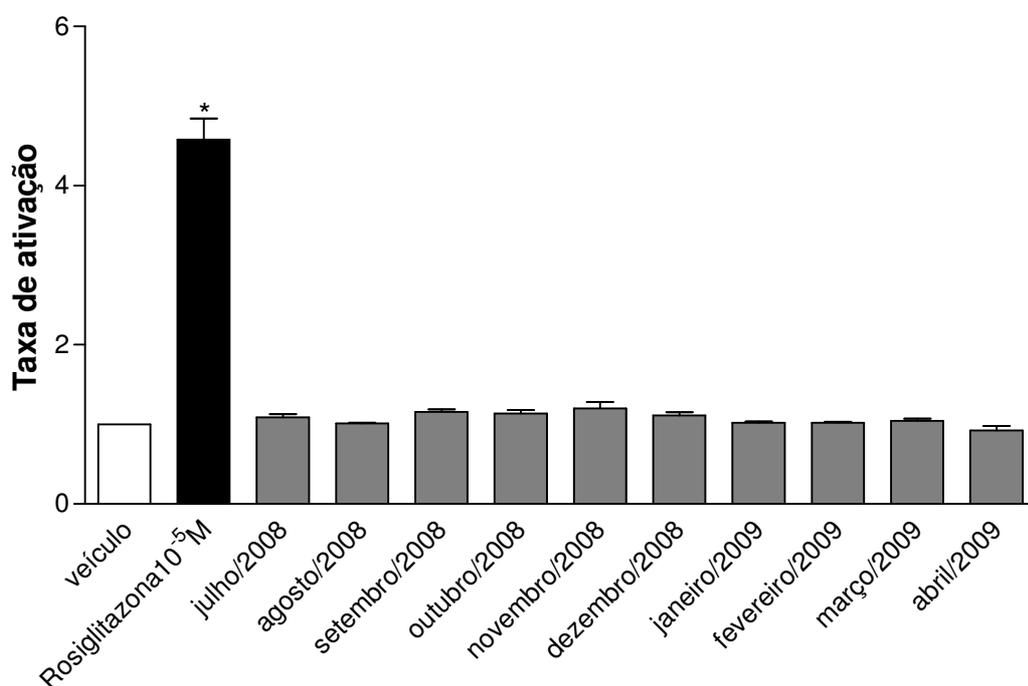


**Figura 10 - Atividade agonista do extrato aquoso de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* coletadas em julho de 2008 ensaiada por co-transfecção em células U937.** Células U937 foram co-transfectadas com 1,5 µg do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3 µg do plasmídeo PPRE-Luc. O tratamento foi realizado com o veículo (DMSO:EtOH 2:3), com a rosiglitazona 10<sup>-5</sup> M e com o extrato aquoso. \*p<0,05 vs veículo. n = 3.

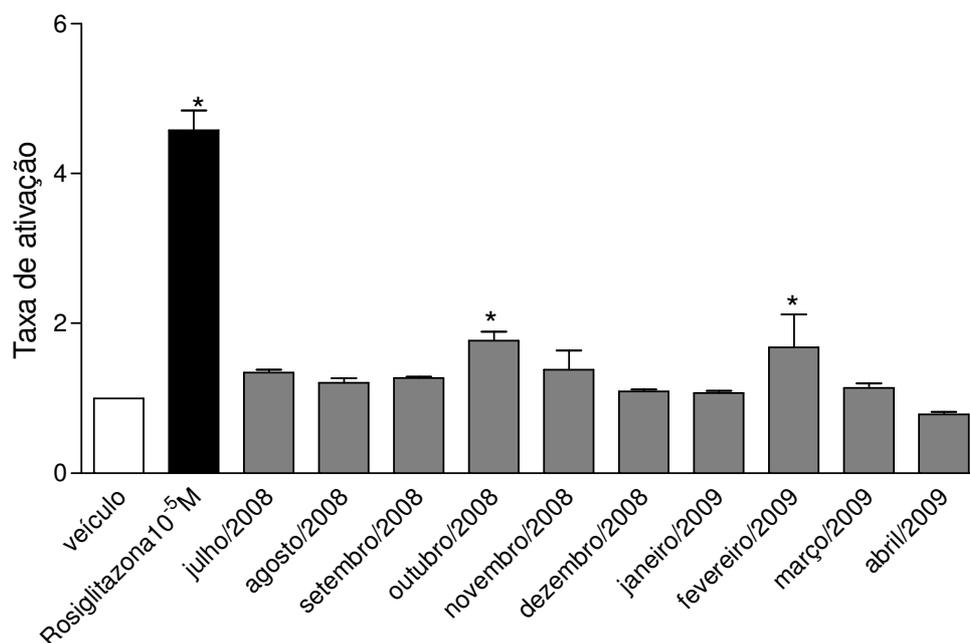


**Figura 11 - Atividade agonista do extrato aquoso de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* coletadas em julho de 2008 ensaiada por co-transfecção em células mesangiais** Células mesangiais foram co-transfectadas com 1,5µg do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3 µg do plasmídeo PPRE-Luc. Foram tratadas com o veículo (DMSO:EtOH 2:3), com a rosiglitazona 10<sup>-5</sup> M e com o extrato aquoso. \*p<0,05 vs veículo. n = 3

Dessa forma, os extratos de janeiro a abril de 2009 foram testados nas quatro concentrações escolhidas em células mesangiais. Ao analisar todos os extratos juntos foi observado que a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  manteve-se com taxa de ativação próxima ao veículo durante os 10 meses testados (jul/2008-abr/2009) (**Figura 12**). O extrato aquoso, na concentração de 300  $\mu\text{g/mL}$ , apresentou pequenas variações para a ativação do receptor durante o período testado. Somente para o extrato de outubro de 2008 foi obtida taxa de ativação ( $1,77 \pm 0,12$ ) diferente estatisticamente do veículo (**Figura 13**).

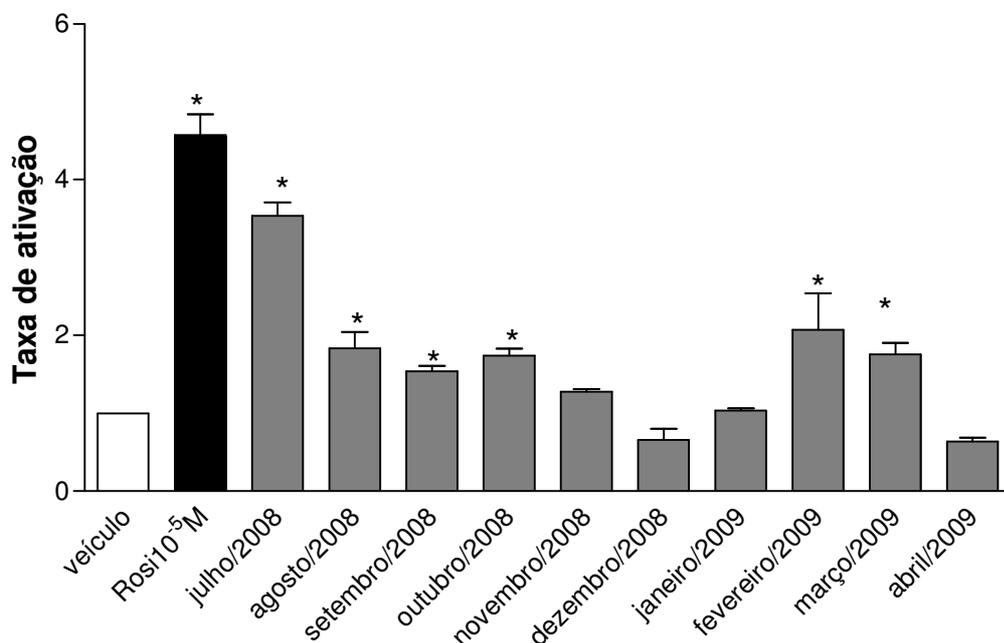


**Figura 12 - Atividade agonista dos extratos aquosos de *Bauhinia variegata* var. *variegata* (julho de 2008 a abril de 2009) na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ .** As células foram co-transfectadas com 1,5  $\mu\text{g}$  do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO:EtOH 2:3), com a rosiglitazona  $10^{-5}\text{M}$  e com o extrato aquoso. \* $p < 0,05$  vs veículo. Teste realizado em triplicata.  $n = 3$ .



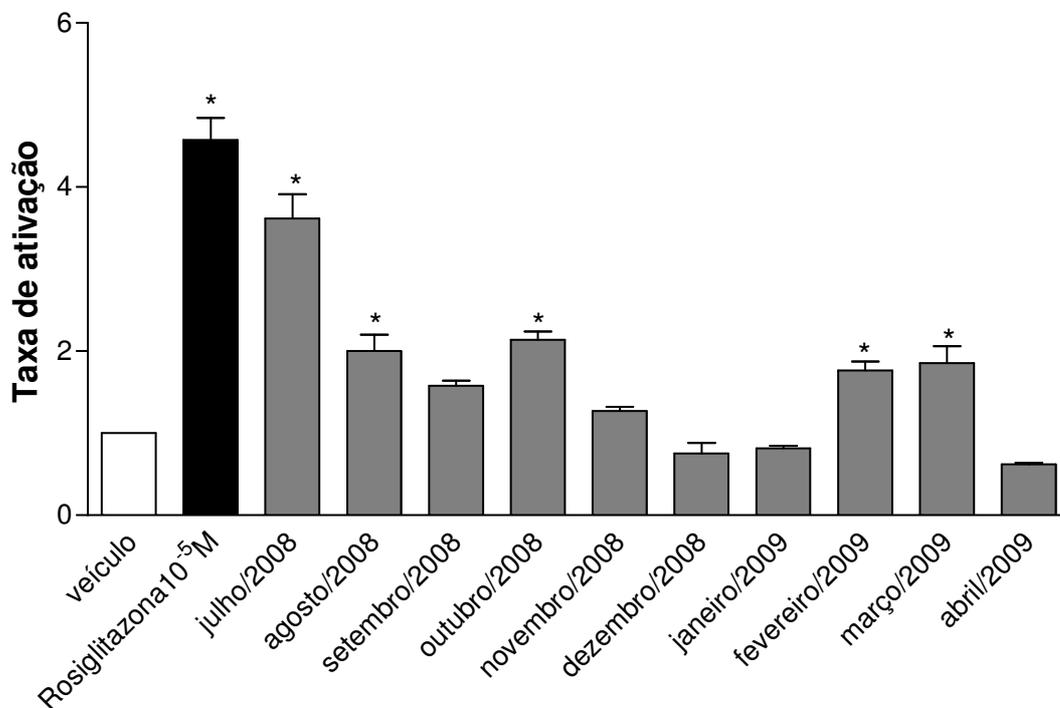
**Figura 13 - Atividade agonista dos extratos aquosos de *Bauhinia variegata* var. *variegata* (julho de 2008 a abril de 2009) na concentração de 300  $\mu\text{g/mL}$ .** As células foram co-transfectadas com 1,5 $\mu\text{g}$  do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO:EtOH 2:3), com a rosiglitazona  $10^{-5}$  M e com o extrato aquoso. \* $p < 0,05$  vs veículo. Teste realizado em Triplicata. n = 3.

Os testes realizados com a concentração de 700  $\mu\text{g/mL}$  resultaram em ativação do receptor com os extratos de julho de 2008, agosto de 2008, outubro de 2008, fevereiro de 2009 e março de 2009 apresentando taxas de  $3,50 \pm 0,29$ ;  $1,83 \pm 0,20$ ;  $1,74 \pm 0,09$ ;  $2,07 \pm 0,47$  e  $1,75 \pm 0,25$ , respectivamente (**Figura 14**).



**Figura 14 - Atividade agonista dos extratos aquosos de *Bauhinia variegata* var. *variegata* (julho de 2008-abril de 2009) na concentração de 700 µg/mL.** As células foram co-transfectadas com 1,5 µg do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3 µg do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO:EtOH 2:3), com a rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M e com o extrato aquoso. \*p<0,05 vs veículo, #p<0,05 vs rosiglitazona. Teste realizado em triplicata. n = 3.

Da mesma forma, foi observado que na concentração de 900 µg/mL houve ativação do receptor, com as seguintes taxas: 3,61 ± 0,29; 2,00 ± 0,20; 2,08 ± 0,15; 1,76 ± 0,10 e 1,85 ± 0,20, respectivamente, para julho, agosto e outubro de 2008, e fevereiro e março de 2009 (**Figura 15**).



**Figura 15 - Atividade agonista dos extratos aquosos de *Bauhinia variegata* var. *variegata* (julho de 2008-abril de 2009) na concentração de 900 µg/mL.** As células foram co-transfectadas com 1,5 µg do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3 µg do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO:EtOH 2:3), com a rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M e com o extrato aquoso. \*p<0,05 vs veículo. Teste em triplicata. n = 3.

A taxa de ativação da rosiglitazona (controle positivo) foi comparada com a obtida por cada um dos extratos nas concentrações de 100 µg/mL, 300 µg/mL, 700 µg/mL e 900 µg/mL (**Tabela 05**). De forma geral, nas três últimas concentrações os extratos foram capazes de promover ativações decrescentes com o passar dos meses. Os extratos aquosos de julho, agosto e outubro de 2008, e fevereiro e março de 2009, nas concentrações de 700 µg/mL e 900 µg/mL, foram capazes de ativar o receptor, sendo que o melhor resultado foi apresentado pelo extrato de julho de 2008 na concentração de 900 µg/mL (79% da ativação em relação ao controle positivo).

**Tabela 05.** Taxas de ativação dos extratos aquosos de *Bauhinia variegata* var. *variegata* (julho de 2008 a abril de 2009).

	100 µg/mL	300 µg/mL	700 µg/mL	900 µg/mL
<b>Veículo</b>	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
<b>Rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M</b>	4,57 ± 0,26*	4,57 ± 0,26	4,57 ± 0,26*	4,57 ± 0,26*
<b>jul/2008</b>	1,08 ± 0,04	1,34 ± 0,04	3,50 ± 0,29*	3,61 ± 0,29*
<b>ago/2008</b>	1,01 ± 0,01	1,20 ± 0,05	1,83 ± 0,20*	2,00 ± 0,20*
<b>set/2008</b>	1,15 ± 0,03	1,27 ± 0,01	1,54 ± 0,07	1,55 ± 0,09
<b>out/2008</b>	1,13 ± 0,04	1,77 ± 0,12*	1,74 ± 0,09*	2,08 ± 0,15*
<b>nov/2008</b>	1,20 ± 0,08	1,38 ± 0,25	1,27 ± 0,03	1,27 ± 0,05
<b>dez/2008</b>	1,11 ± 0,04	1,09 ± 0,03	0,74 ± 0,19	0,69 ± 0,19
<b>jan/2009</b>	1,02 ± 0,01	1,07 ± 0,02	1,03 ± 0,02	0,83 ± 0,03
<b>fev/2009</b>	1,02 ± 0,01	1,68 ± 0,44	2,07 ± 0,47*	1,76 ± 0,10*
<b>mar/2009</b>	1,04 ± 0,02	1,14 ± 0,06	1,75 ± 0,25*	1,85 ± 0,20*
<b>abr/2009</b>	0,92 ± 0,05	0,78 ± 0,03	0,68 ± 0,02	0,63 ± 0,03

\*p<0,05 vs veículo.

De acordo com esses resultados, a ativação do receptor pelo extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC (BvEA), pode variar no decorrer do ano, e essa variação parece ter ocorrido por influência de variações meteorológicas locais, que podem ter afetado o metabolismo secundário da planta e conseqüentemente, a composição química de BvEA.

A **Tabela 06** apresenta a comparação entre a taxa de ativação e os dados meteorológicos no período de julho de 2008 a abril de 2009. Os dados meteorológicos foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

**Tabela 06.** Comparação entre a taxa de ativação nas concentrações de 700 e 900 µg/mL e os dados meteorológicos do período de julho de 2008 a abril de 2009.

amostra	Taxa de ativação		Dados meteorológicos				
	700µg/mL	900µg/mL	Precipitação Pluviométrica (mm)	Temperatura média mensal (°C)	Umidade do ar média mensal (%)	Insolação (horas)	Pressão
<b>Veículo</b>	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	-	-	-	-
<b>Rosi 10<sup>5</sup>M</b>	4,57 ± 0,26*	4,57 ± 0,26*	-	-	-	-	-
<b>jul/2008</b>	3,50 ± 0,29*	3,61 ± 0,29*	0	18,9	45	9,02	890,2
<b>ago/2008</b>	1,83 ± 0,20*	2,00 ± 0,20*	2,7	21,5	35	9,18	888
<b>set/2008</b>	1,54 ± 0,07	1,55 ± 0,09	79,9	23,1	42	7,83	887,4
<b>out/2008</b>	1,74 ± 0,09*	2,08 ± 0,15*	38,7	24,1	47	8,05	886,8
<b>nov/2008</b>	1,27 ± 0,03	1,27 ± 0,05	271	21,6	75	4,11	884,9
<b>dez/2008</b>	0,74 ± 0,19	0,69 ± 0,19	323,4	21,2	81	3,4	888,4
<b>jan/2009</b>	1,03 ± 0,02	0,83 ± 0,03	205	22,1	76	5,39	885,5
<b>fev/2009</b>	2,07 ± 0,47*	1,76 ± 0,10*	134,8	22,2	73	5,69	886
<b>mar/2009</b>	1,75 ± 0,25*	1,85 ± 0,20*	81	22,3	73	5,9	885,3
<b>abr/2009</b>	0,68 ± 0,02	0,63 ± 0,03	375,9	20,9	78	4,6	886,7

**Fonte:** Estação Climatológica Principal de Brasília do Instituto Nacional de Meteorologia –INMET/ Brasília – DF.

O coeficiente de correlação  $r$ , introduzido por Spearman (1906), é um teste não-paramétrico utilizado quando, na avaliação do instrumento como um todo, a distribuição aparenta rejeitar a hipótese de normalidade. Mede o grau de distribuição entre duas variáveis quando nenhuma tem distribuição normal (161). Tem sido frequente a sua utilização em estudos ligados à Medicina, Epidemiologia, Biologia, Psicologia e Ciências Sociais (157).

Quando uma correlação é positiva, as variáveis  $X$  e  $Y$  crescem no mesmo sentido, ou seja, se a variável  $X$  cresce, a variável  $Y$  cresce. Então, uma correlação positiva perfeita apresenta  $r = +1$ , e nessas condições,  $x$  e  $y$  são diretamente relacionadas, ou seja, quanto maior  $x$ , maior  $y$  também.

Quando uma correlação é negativa, as variáveis  $X$  e  $Y$  crescem em sentidos contrários, isto é, se a variável  $X$  cresce, a variável  $Y$  decresce; então, uma correlação negativa perfeita apresenta  $r = -1$ , e nessas condições são inversamente relacionadas, ou seja, quanto maior  $x$ , menor  $y$ .

Quando não existe correlação,  $r = 0$ , ou seja, não existe relação entre as duas variáveis  $x$  e  $y$ .

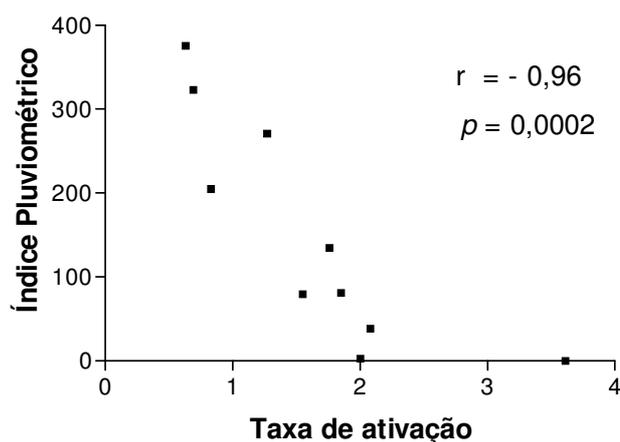
Dessa forma, por meio da correlação de Spearman, foram comparados dados da taxa de ativação nas concentrações de 700  $\mu\text{g/mL}$  e 900  $\mu\text{g/mL}$  com os dados meteorológicos da Estação Climatológica Principal de Brasília do Instituto Nacional de Meteorologia –INMET/ Brasília – DF entre os meses de julho de 2008 a abril de 2009. Os resultados mostraram que há uma correlação negativa forte entre a taxa de ativação na concentração de 700  $\mu\text{g/mL}$  ou de 900  $\mu\text{g/mL}$  e o índice pluviométrico e a umidade do ar; e uma correlação positiva forte entre taxa de ativação na concentração de 900 $\mu\text{g/mL}$  e a horas de exposição a insolação às quais a planta foi submetida (**Tabela 07**).

**Tabela 07.** Correlação entre taxa de ativação no receptor de PPAR $\gamma$  apresentada pelos extratos de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC. coletadas no período entre julho de 2008 e abril de 2009 e dados meteorológicos no mesmo período.

Dados meteorológicos	Concentração			
	700 $\mu\text{g/mL}$		900 $\mu\text{g/mL}$	
	Correlação de Spearman (r)	Valor de $p$	Correlação de Spearman (r)	Valor de $p$
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	0,11	0,75	0,22	0,53
Umidade (%)	<b>-0,74</b>	<b>0,01</b>	<b>-0,80</b>	<b>0,007</b>
Índice pluviométrico (mm)	<b>-0,83</b>	<b>0,004</b>	<b>-0,93</b>	<b>0,0002</b>
Insolação (h)	0,75	0,01	<b>0,86</b>	<b>0,002</b>
Pressão (mbar)	0,22	0,53	0,29	0,40

\* $p \leq 0,01$

Os resultados mais expressivos foram observados na correlação entre taxa de ativação e índice pluviométrico; e o gráfico apresentado na **Figura 16** mostra uma reta decrescente, principalmente para a concentração de 900  $\mu\text{g/mL}$



**Figura 16 - Correlação entre a taxa de ativação na concentração de 900  $\mu\text{g/mL}$  e o índice pluviométrico no período entre julho de 2008 a abril de 2009.  $p \leq 0,01$**

Os resultados indicaram que existe uma forte correlação entre a taxa de ativação apresentada por BvEA nos receptores de PPAR $\gamma$  e dados meteorológicos do período de coleta das folhas, como umidade do ar, índice pluviométrico e insolação. De acordo com esses resultados, BvEA apresenta maior atividade no receptor quando existe menor umidade do ar e quantidade de chuvas e maior período de insolação.

Dessa forma, uma análise química foi realizada de forma a compreender melhor esse resultado.

#### **4.2.2 – Quantificação de polifenóis e flavonoides nos extratos aquosos de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.**

Para caracterizar os extratos testados nos receptores de PPAR $\gamma$ , foi realizada a quantificação de polifenóis e flavonoides nos extratos testados.

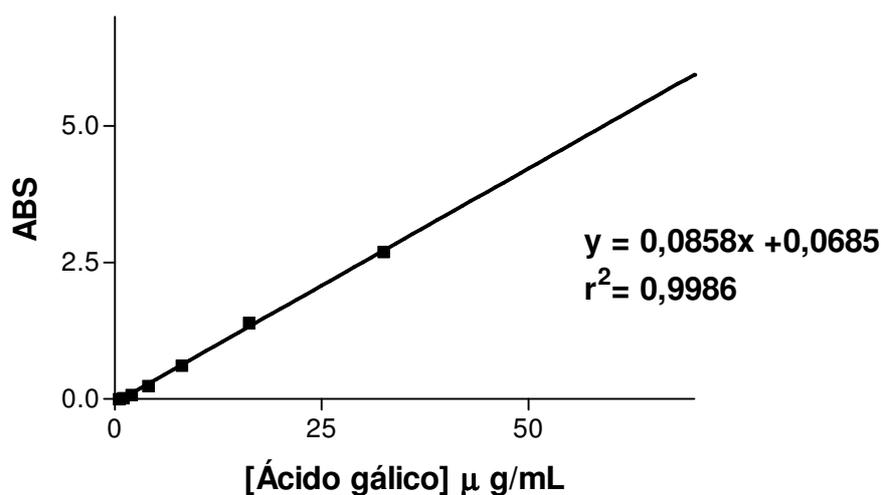
##### **4.2.2.1 – Quantificação de polifenóis totais nos extratos aquosos das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu**

O total de polifenóis de BvEA (julho de 2008 a abril de 2009) foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com algumas modificações (159). O reativo de Folin-Ciocalteu, quando na presença de compostos fenólicos, muda sua coloração de amarela para azul, e a intensidade da coloração azul é maior quanto maior o teor de compostos fenólicos na solução (162). O ácido gálico foi utilizado como padrão e assim, foi construída uma curva nas concentrações finais de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  a 32, 5  $\mu\text{g/mL}$  e sendo obtidas as absorvâncias em cada concentração (**Tabela 08 e Figura 17**).

Após a obtenção das absorvâncias e a média destas para cada concentração de cada amostra, foi possível determinar a concentração de compostos fenólicos em equivalentes a ácido gálico, por meio da equação da curva padrão de ácido gálico.

**Tabela 08.** Valores das densidades ópticas obtidas para as diferentes concentrações de ácido gálico submetidas à reação com o reagente de Folin-Ciocalteu.

ácido gálico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média dos valores
0,508	0,005 $\pm$ 0,010
1,016	0,022 $\pm$ 0,008
2,031	0,079 $\pm$ 0,019
4,063	0,242 $\pm$ 0,024
8,125	0,617 $\pm$ 0,055
16,250	1,395 $\pm$ 0,124
32,500	2,696 $\pm$ 0,128



**Figura 17 - Curva-padrão de ácido gálico submetido à reação com o reagente de Folin-Ciocalteu.**

Os resultados mostraram que a quantidade de polifenóis nos extratos das folhas coletadas entre julho de 2008 a junho de 2009 não variou durante o ano, e também não foi observada correlação significativa entre a presença de polifenóis no extrato e a taxa de ativação ( $r = 0,02$ ,  $p = 0,58$ ) (**Tabela 09**).

**Tabela 09.** Quantificação de polifenóis nos extratos aquosos de folhas de *Bauhinia variegata var. variegata* coletadas entre julho/2008 a abril/2009.

<b>Mês</b>	<b>Quantidade de polifenóis (mg/g)</b>
julho/2008	35,32 ± 5,07
agosto/2008	45,68 ± 6,49
setembro/2008	35,77 ± 4,49
outubro/2008	45,51 ± 3,89
novembro//2008	41,30 ± 4,90
dezembro/2008	37,07 ± 8,74
janeiro/2009	50,02 ± 2,33
fevereiro/2009	44,44 ± 0,58
março/2009	52,16 ± 5,08
abril/2009	37,39 ± 2,75

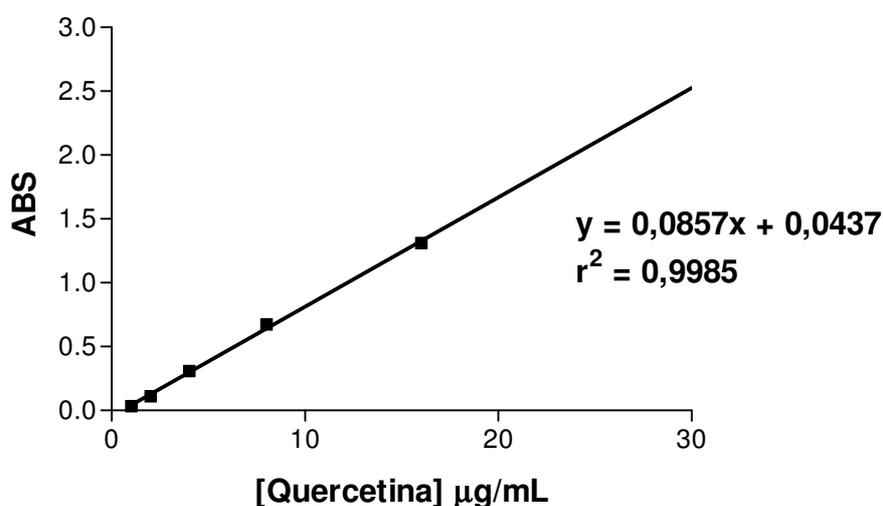
#### **4.2.2.2 – Quantificação de flavonoides nos extratos aquosos de folhas de *Bauhinia variegata var. variegata* pelo método de formação de complexos por cloreto de alumínio.**

O total de flavonoides de BvEA de julho de 2008 a abril de 2009 foi determinado pelo método colorimétrico de Woisky e Salatino (1998) com algumas modificações (159). Este método baseia-se na capacidade que o cloreto de alumínio tem de formar complexos estáveis com os flavonoides, produzindo uma coloração amarela intensa (163). Dessa forma, foi utilizado como padrão o flavonoide quercetina, nas concentrações finais de 1 a 16 µg/mL e foi construída uma curva-padrão de acordo com a **Tabela 10** e a **Figura 18**.

**Tabela 10.** Valores das densidades ópticas obtidas para as diferentes concentrações de quercetina submetidas à reação com o cloreto de alumínio.

Concentração final de quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média dos valores
1	0,033
2	0,111
4	0,309
8	0,673
16	1,311

**Curva-padrão de quercetina**



**Figura 18 - Curva-padrão de quercetina submetida à reação com cloreto de alumínio.**

A **Tabela 11** mostra que nos meses de setembro a dezembro de 2008 houve uma pequena redução na quantidade de flavonoides, mas, não foi observada uma correlação entre a quantidade de flavonoides e a taxa de ativação apresentada pelos extratos no receptor de  $\text{PPAR}\gamma$ . Por outro lado, houve um aumento na produção de flavonoides no período de seca, porém não estatisticamente significativo. (Correlação de Spearman  $r = 0,2$ ,  $p = 0,58$ ).

**Tabela 11.** Quantificação de flavonoides nos extratos aquosos de folhas de *Bauhinia. variegata var. variegata* coletadas entre julho/2008 a abril/2009.

<b>Mês</b>	<b>Flavonoides (mg/g)</b>
julho/2008	7,29 ± 1,52
agosto/2008	6,56 ± 0,98
setembro/2008	4,48 ± 0,06
outubro/2008	4,23 ± 0,57
novembro//2008	3,49 ± 0,55
dezembro/2008	2,86 ± 0,17
janeiro/2009	8,07 ± 1,27
fevereiro/2009	6,34 ± 0,80
março/2009	6,47 ± 0,48
abril/2009	7,05 ± 0,74

A literatura mostra que polifenóis ou flavonoides podem ser ligantes do receptor de PPAR $\gamma$  (164-166). E dos extratos aquosos de folhas do gênero *Bauhinia* foram isolados vários ligantes que ativam esse receptor (83, 84). No entanto, esses testes mostraram que não existe uma correlação entre a taxa de ativação dos extratos em PPAR $\gamma$  com o teor de polifenóis ou flavonoides presentes nos extratos analisados.

Ainda quando analisada a quantidade de polifenóis ou flavonoides nos extratos testados, não houve correlação significativa entre o conteúdo desses compostos e as condições meteorológicas da época da coleta das plantas. **(Tabela 12)**

**TABELA 12.** Correlação entre quantidade de polifenóis e flavonoides, taxa de ativação em PPAR $\gamma$  das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC coletadas entre julho de 2008 e abril de 2009 e as condições meteorológica nesse mesmo período.

	Flavonoides		Polifenóis	
	Correlação de spearman (r)	Valor de $p$	Correlação de spearman (r)	Valor de $p$
900ug/mL	0,2	0,58	0,09	0,81
Temperatura	-0,33	0,34	0,44	0,2
umidade	-0,14	0,68	0,01	0,97
Pluviométrico	-0,23	0,51	-0,0006	1000
insolação	0,36	0,29	0,09	0,81
pressão	0,03	0,94	-0,6	0,07
Flavonoides	-	-	0,2	0,58

#### 4.2.3 – Análise, por CLAE-DAD, dos extratos aquosos de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* coletadas entre julho de 2008 a abril de 2009.

Parte das amostras correspondentes aos meses entre julho/2008 a abril/2009 foi analisada por CLAE-DAD.

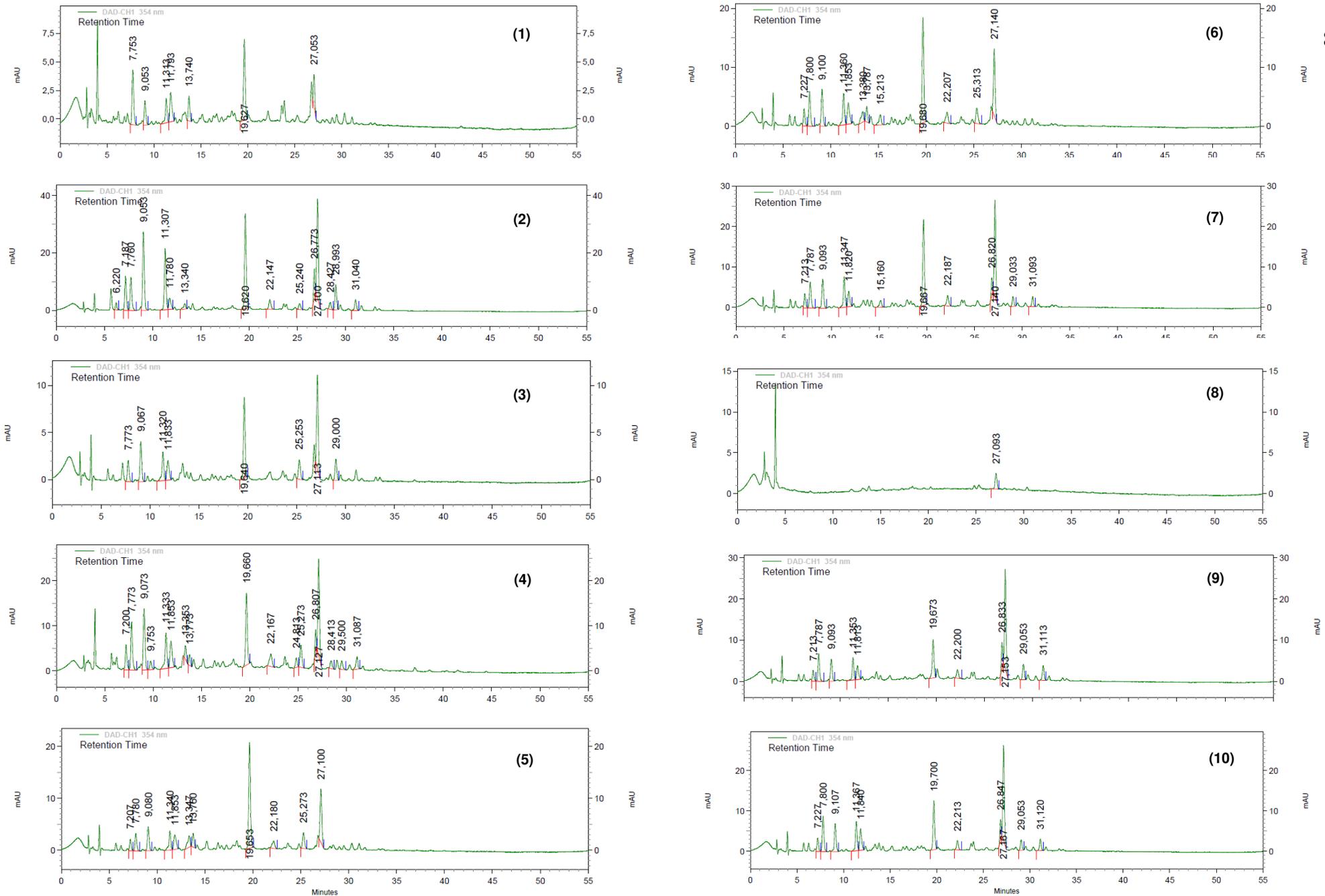
Com base nos cromatogramas obtidos, com os respectivos espectros na região do ultravioleta de picos proeminentes, e de acordo com os tempos de retenção apresentados foi possível fazer a seguinte análise:

1. Em todas as amostras analisadas, foi detectada a presença de derivados de ácido clorogênico.
2. Dos 10 extratos analisados, 5 apresentaram picos com tempo de retenção e similaridade espectral com derivado de rutina: os extratos aquosos de folhas coletadas em agosto e outubro de 2008; janeiro, março e abril de 2009.
3. Dos 5 extratos, cujo cromatograma mostrou a presença de derivados rutina, apenas os extratos de agosto/2008, outubro/2008 e março/2009 apresentaram atividade no receptor de PPAR $\gamma$ .

4. Os cromatogramas dos extratos de janeiro/2009 e abril/2009 apresentaram pico referente aos derivados de rutina, porém não apresentaram ativação no receptor de PPAR $\gamma$ .
5. Os extratos de julho/2008 e fevereiro/2009 apresentaram ativação no receptor de PPAR $\gamma$ , mas os cromatogramas não mostraram pico referente aos derivados de rutina.
6. Não foi verificada correlação entre taxa de ativação em PPAR $\gamma$  e a presença ou ausência dos derivados de rutina nos extratos aquosos de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.

A **Figura 19** mostra a comparação para as análises no CLAE-DAD dos meses entre julho/2008 a abril/2009, apresentando ainda tempos de retenção.





**Figura 19 - Cromatograma do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* referente ao pico no tR= 27,0 min em comparação ao padrão analítico rotina.** Condições de análise: coluna: LichroCART 150-4,6 Purospher STAR RP 18e (5µm); Pré-coluna: LichroCART 4-46 Purospher STAR RP 18e (5µm); fluxo: 0,6mL/min; eluente: bomba A (água, solução de ácido fosfórico 0,1M), bomba B (acetonitrila); detector: DAD; intervalo de análise: 230-400 nm; sistema de eluição: gradiente. Para cada gráfico eixo x: intensidade dos picos e eixo y: tempo (min). (1) julho/2008, (2) agosto/2008, (3) setembro/2008, (4) outubro/2008. (5) novembro/2008. (6) dezembro/2008. (7) janeiro/2009. (8) fevereiro/2009. (9) março/2009. (10) abril/2009.

A **Tabela 13** mostra a relação entre a atividade agonista dos extratos nos receptores de PPAR $\gamma$  e a análise no espectro de CLAE-DAD

**Tabela 13.** Avaliação da relação entre composição química de extratos aquosos de folhas de *Bauhinia variegata var. variegata* DC. e a atividade agonista em PPAR $\gamma$  (análise por CLAE-DAD em comparação com padrões selecionados)

Coleta	Atividade agonista em PPAR		CLAE	
	900 $\mu\text{g/mL}$	Ativo?	Tempo de retenção	Análise
<b>jul/2008</b>	<b>3,61 <math>\pm</math> 0,29*</b>	<b>Sim</b>	<b>27,0</b>	-
<b>ago/2008</b>	<b>2,00 <math>\pm</math> 0,20*</b>	<b>Sim</b>	<b>26,77</b>	<b>Rutina</b>
set/2008	1,55 $\pm$ 0,09	Não	27,1	-
<b>out/2008</b>	<b>2,08 <math>\pm</math> 0,15*</b>	<b>Sim</b>	<b>26,80</b>	<b>Rutina</b>
nov/2008	1,27 $\pm$ 0,05	Não	27,10	-
dez/2008	0,69 $\pm$ 0,19	Não	27,10	-
jan/2009	0,83 $\pm$ 0,03	Não	26,80	Rutina
<b>fev/2009</b>	<b>1,76 <math>\pm</math> 0,10*</b>	<b>Sim</b>	<b>27,00</b>	-
<b>mar/2009</b>	<b>1,85 <math>\pm</math> 0,20*</b>	<b>Sim</b>	<b>27,00</b>	<b>Rutina</b>
abr/2009	0,63 $\pm$ 0,03	Não	26,88	Rutina

\* Compostos analisados: ácido clorogênico, ácido ferúlico, miricetina, rutina, ácido ferúlico, isoquercitrina, hesperidina, quercetina, kaempferol, luteolina, catequina, epicatequina

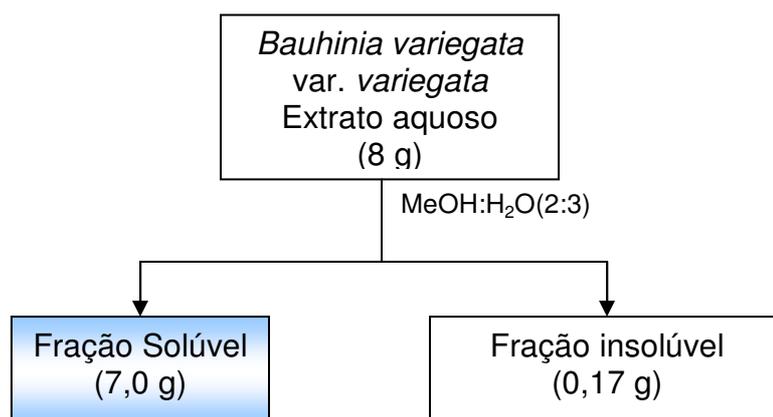
Após a observação dos cromatogramas, foi observado que a presença de derivados de rutina nos extratos de *B. variegata var. variegata var. variegata*, não está diretamente relacionado aos meses de atividade dos extratos em PPAR $\gamma$ . Provavelmente esse composto esteja de forma majoritária nos extratos, por isso a identificação dele se tornou mais evidente.

A busca de novas moléculas que sejam capazes de atuar contra a resistência à insulina é de grande importância no âmbito de várias doenças como diabetes mellitus tipo II. Portanto, torna-se necessário a identificação composto ativo dessa espécie. Dessa forma, aqueles extratos que apresentaram atividade em PPAR $\gamma$ , foram submetidos a fracionamento na tentativa de isolamento da substância responsável pela atividade.

#### 4.2.4 – Fracionamento do extrato aquoso e avaliação da atividade agonista das frações obtidas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC ao receptor de PPAR $\gamma$ em células mesangiais.

Os extratos aquosos brutos de julho e agosto de 2008, que apresentaram uma atividade agonista significativa ao receptor de PPAR $\gamma$ , foram escolhidos para o fracionamento biomonitorado.

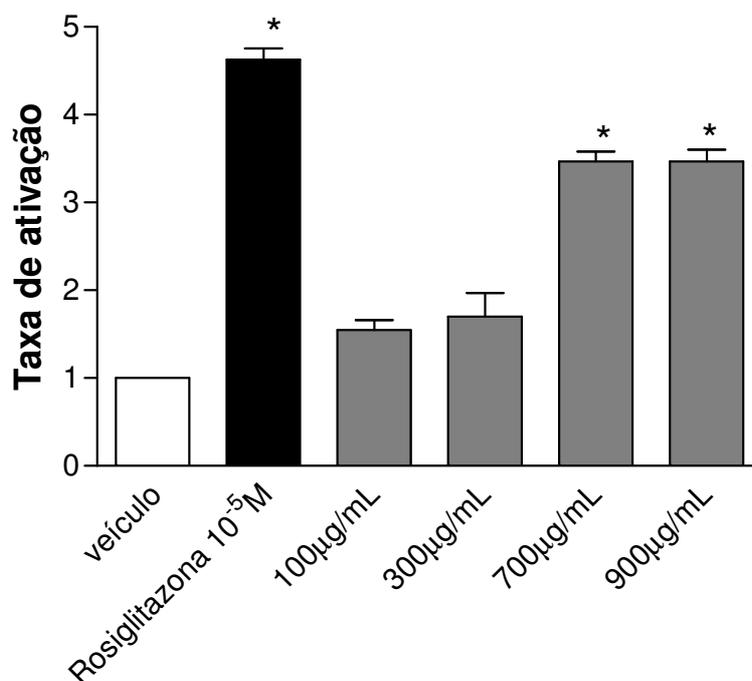
Assim, 8 g do extrato aquoso ativo foram solubilizados em MeOH:H<sub>2</sub>O (2:3), fornecendo 2 frações: solúvel e insolúvel. A fração insolúvel (0,17 g) foi levada a um frasco tarado, e secada em banho-maria. A fração solúvel foi levada ao evaporador rotativo para retirada do metanol, em seguida congelada e liofilizada (7 g) (**Figura 20**).



**Figura 20 – Fracionamento do extrato aquoso de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* e biomonitoramento das frações com atividade agonista ao receptor de PPAR $\gamma$ .**

Parte da fração solúvel (25 mg) foi solubilizada em água e utilizada, nas concentrações de 100, 300, 700 e 900  $\mu\text{g/mL}$ , no tratamento das células mesangiais co-transfectadas com o plasmídeo de expressão CMV-PPAR $\gamma$  e com o plasmídeo repórter PPRE-Luc. Posteriormente, a atividade agonista foi analisada por ensaio de gene-repórter.

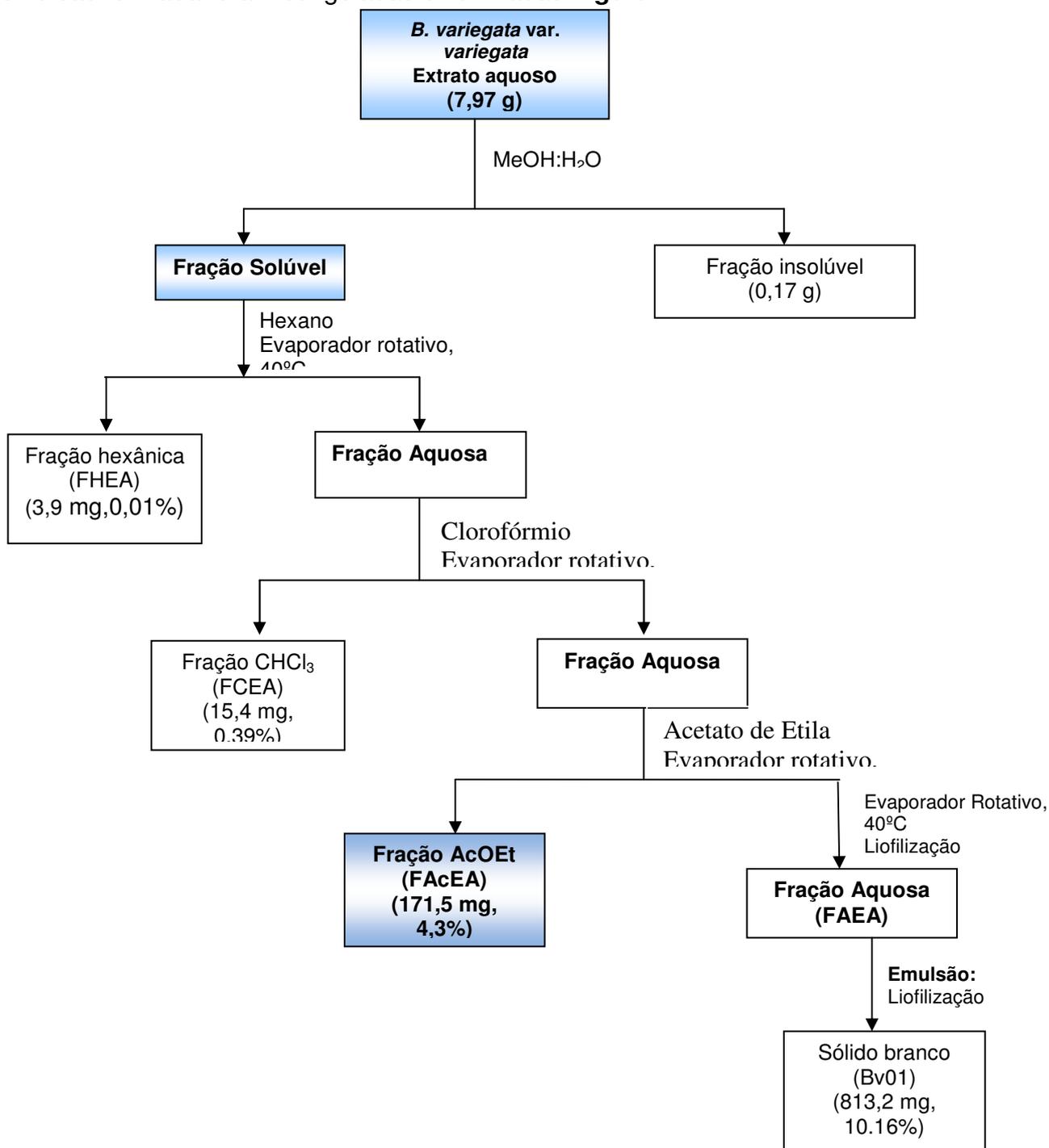
Os resultados indicaram que essa fração apresentou taxa de ativação ao receptor diferente do controle negativo apenas nas concentrações de 700 e 900  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 21**).



**Figura 21 - Atividade agonista da fração solúvel em MeOH:H<sub>2</sub>O 2:3 do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* na concentração de 100, 300, 700 e 900  $\mu\text{g/mL}$ .** As células foram co-transfectadas com 1,5  $\mu\text{g}$  do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO:EtOH 2:3), com a rosiglitazona  $10^{-5}\text{M}$  e com a fração MeOH:H<sub>2</sub>O 2:3. Nas concentrações de 700 e 900  $\mu\text{g/mL}$  a ativação do receptor de forma estatisticamente diferente do veículo foi obtida. . \* $p < 0,05$  vs veículo. n= 3.

A fração solúvel foi solubilizada em água e submetida a uma partição líquido-líquido com hexano, clorofórmio e acetato de etila, fornecendo então as sub-frações hexânica (3 mg), clorofórmica (15,4 mg), acetato de etila (171,5 mg) e a sub-fração aquosa (4 g) resultante desse processo, conforme mostrado no esquema apresentado na **Figura 22**. Durante o fracionamento com solventes orgânicos, uma emulsão foi formada entre a fase aquosa e a fase orgânica, essa emulsão (813,2 mg) também foi separada.

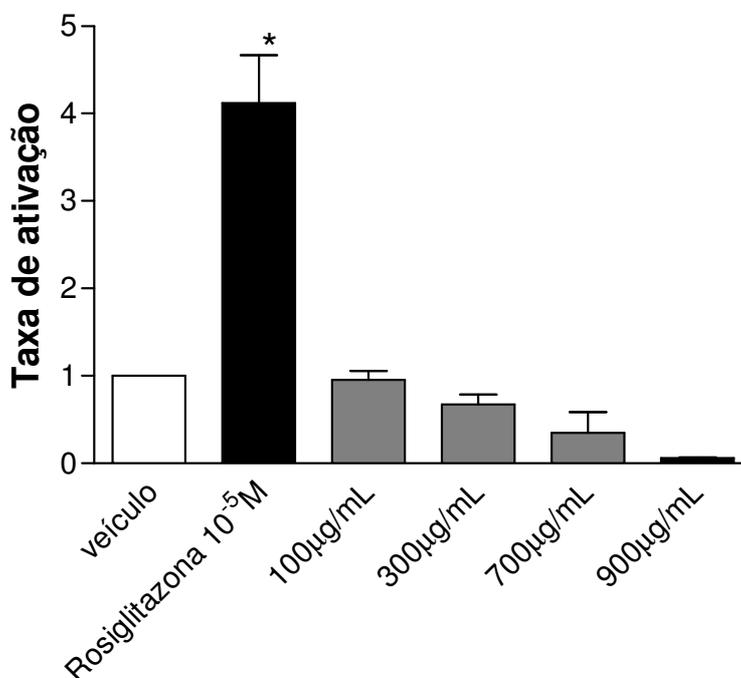
Todas essas frações foram concentradas em evaporador rotativo a uma temperatura de aproximadamente 40 °C, sendo que a sub-fração aquosa e a emulsão formada foram congeladas e liofilizadas **Figura 22**.



**Figura 22** – Partição líquido-líquido fração solúvel em MeOH:H<sub>2</sub>O 2:3 do extrato aquoso de folhas de *Bauhinia variegata var. variegata* e biomonitoramento das frações com atividade agonista ao receptor de PPAR $\gamma$

#### 4.2.4.1 – Avaliação da atividade agonista da fração aquosa obtida do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* ao receptor de PPAR $\gamma$ em células mesangiais.

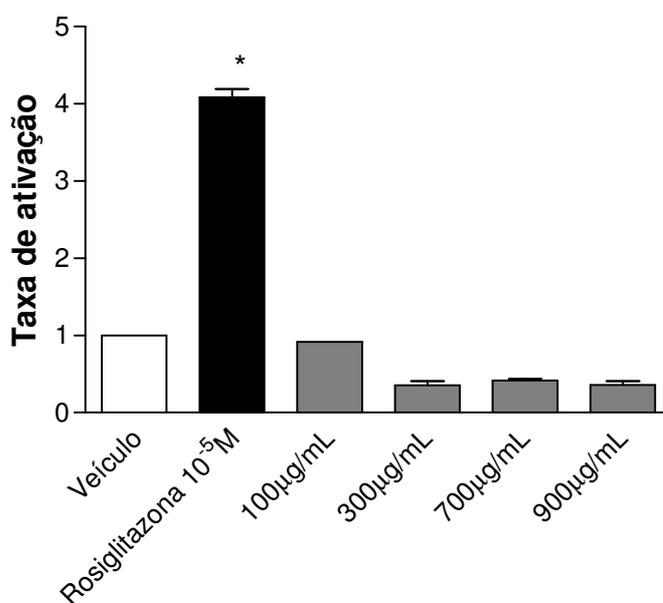
A fração FAEA (Figura 22) foi solubilizada em água destilada nas concentrações de 100, 300, 700 e 900  $\mu\text{g/mL}$  e utilizada no tratamento das células mesangiais co-transfectadas com o plasmídeo de expressão CMV-PPAR $\gamma$  e com o plasmídeo repórter PPRE-Luc. Na avaliação da atividade agonista por ensaio de gene-repórter dessa fração, não foi observada a ativação do receptor diferente do veículo (**Figura 23**).



**Figura 23 - Atividade agonista da fração aquosa do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* na concentração de 100, 300, 700 e 900  $\mu\text{g/mL}$ .** As células foram co-transfectadas com 1,5  $\mu\text{g}$  do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO:EtOH 2:3), com a rosiglitazona  $10^{-5}$  M e com a fração aquosa. Não houve a ativação do receptor de forma estatisticamente diferente do veículo foi obtida. . \* $p < 0,05$  vs veículo. Teste realizado em triplicata. n= 3.

#### 4.2.4.2 – Avaliação da atividade agonista da fração clorofórmica obtida do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* ao receptor de PPAR $\gamma$ em células mesangiais.

A fração FCEA (Figura 22) foi solubilizada em EtOH:DMSO 3:2 nas concentrações 100, 300, 700 e 900  $\mu\text{g/mL}$ . Da mesma forma que a fração aquosa, também foi utilizada no tratamento das células mesangiais co-transfectadas com o plasmídeo de expressão CMV-PPAR $\gamma$  e com o plasmídeo repórter PPRE-Luc. Posteriormente, a atividade agonista foi analisada por ensaio de gene-repórter, porém, essa fração não apresentou ativação do receptor estatisticamente diferente do controle negativo **Figuras 24**.

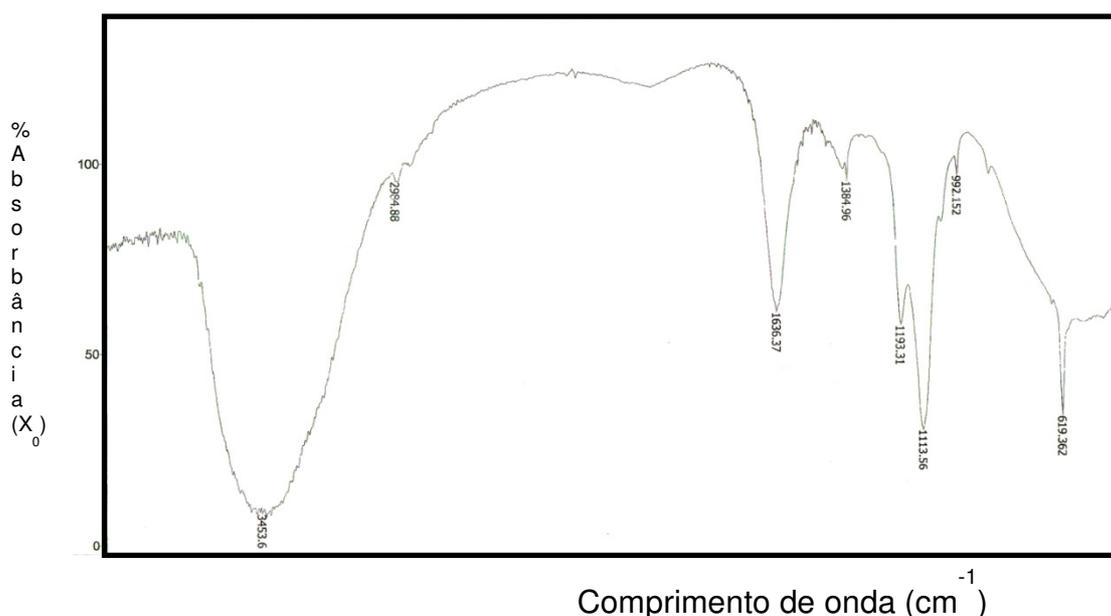


**Figura 24 - Atividade agonista da fração clorofórmica do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* na concentração de 100, 300, 700 e 900 $\mu\text{g/mL}$ .** As células foram co-transfectadas com 1,5  $\mu\text{g}$  do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO:EtOH 2:3), com a rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M e com a fração clorofórmica. Não houve a ativação do receptor de forma estatisticamente diferente do veículo. \* $p < 0,05$  vs veículo. Teste realizado em triplicata. n= 2.

#### 4.2.4.3 – Identificação e avaliação da atividade agonista da emulsão proveniente da fração aquosa obtida do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* ao receptor de PPAR $\gamma$ em células mesangiais.

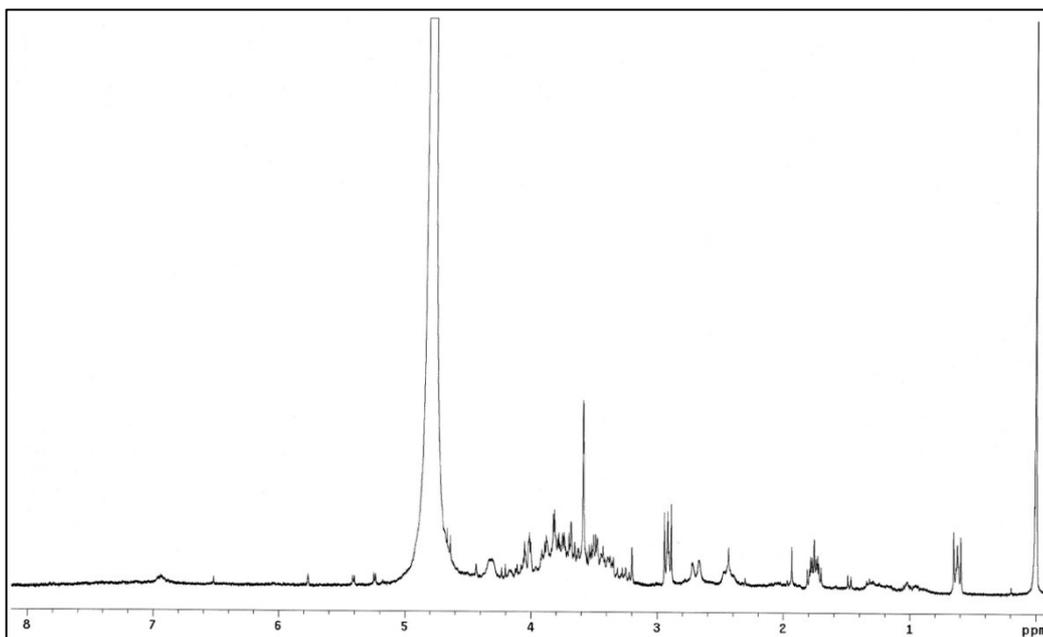
A emulsão proveniente do fracionamento de BvEA, após liofilização, se apresentou como um sólido branco solúvel em água denominado **Bv01**. Mostrou relativa pureza quando submetido à CCD (eluente: tetracloroetileno:acetato de etila 6:4, revelador: R1, página 21). **Bv01** foi identificado pela espectrometria de IV e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

O espectro de Infravermelho da amostra **Bv01** apresentou uma banda larga em  $3453,6\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação O-H; em  $2984,9\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramento de ligação C-H; em  $1636\text{ cm}^{-1}$ , atribuída a estiramento de ligação dupla 4 C=O, e em  $1193,31$  atribuída à deformação de ligação O-H (**Figura 25**) (167).



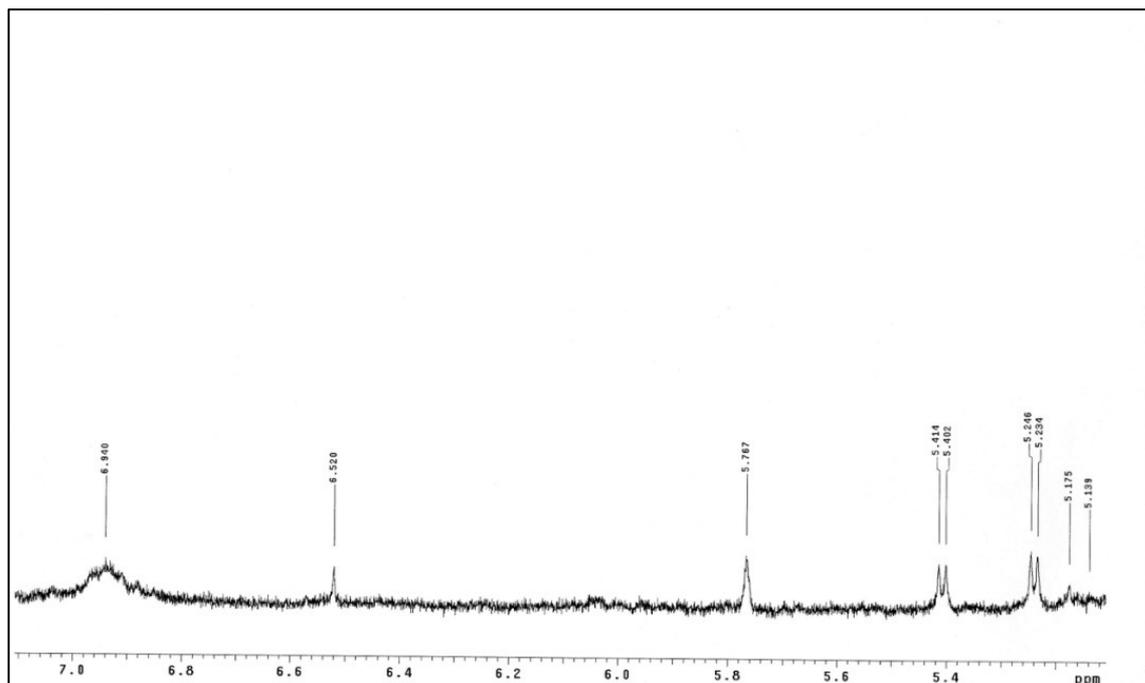
**Figura 25 – Espectro na região Infravermelho (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) de Bv01.**

A **Figura 26** mostra o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra Bv01. O perfil espectral sugeriu que Bv01 fosse de natureza glicídica ou glicosídica, devido ao acúmulo de sinais entre  $\delta 6,0$  e  $\delta 3,0$



**FIGURA 26 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Bv01 (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).**

A expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  na região entre  $\delta 4,5$ -  $\delta 7,0$  permitiu visualizar a presença de dois dupletos:  $\delta 5,40$ , e  $\delta 5,23$  sugerindo a presença de dois hidrogênios anoméricos. A comparação com dados da literatura permitiu atribuir os sinais aos hidrogênios anoméricos de sacarose ( $\delta 5,40$ ) e  $\alpha$ -glicose ( $\delta 5,23$ ) (168). Em água, a proporção anomérica  $\alpha$ : $\beta$  de D-glicose é cerca de 2:3. Apesar de não ser possível identificar a presença do hidrogênio anomérico de  $\beta$ -D-glicose (aproximadamente  $\delta 4,68$ ), a presença de sinais satélites em  $\delta 6,94$  e  $\delta 6,52$  sugerem a presença dos dois isômeros (169).



**FIGURA 27 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Bv01 – Expansão da região  $\delta$ 4,5- $\delta$ 7.0 (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).**

Também foi obtido o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra Bv01. O espectro mostra sinais correspondentes de compostos glicosilados. Foi observado sinais entre  $\delta$ 62 –  $\delta$ 78 correspondentes a carbonos de açúcares (**Figura 28**). Além de um sinal em  $\delta$ 98,6, correspondente ao carbono anomérico de frutose, também foi observado um sinal em  $\delta$ 106,3 região referente a carbono anomérico de galactose e/ou sacarose. A **Tabela 14** mostra os sinais correspondentes para esses açúcares (170).

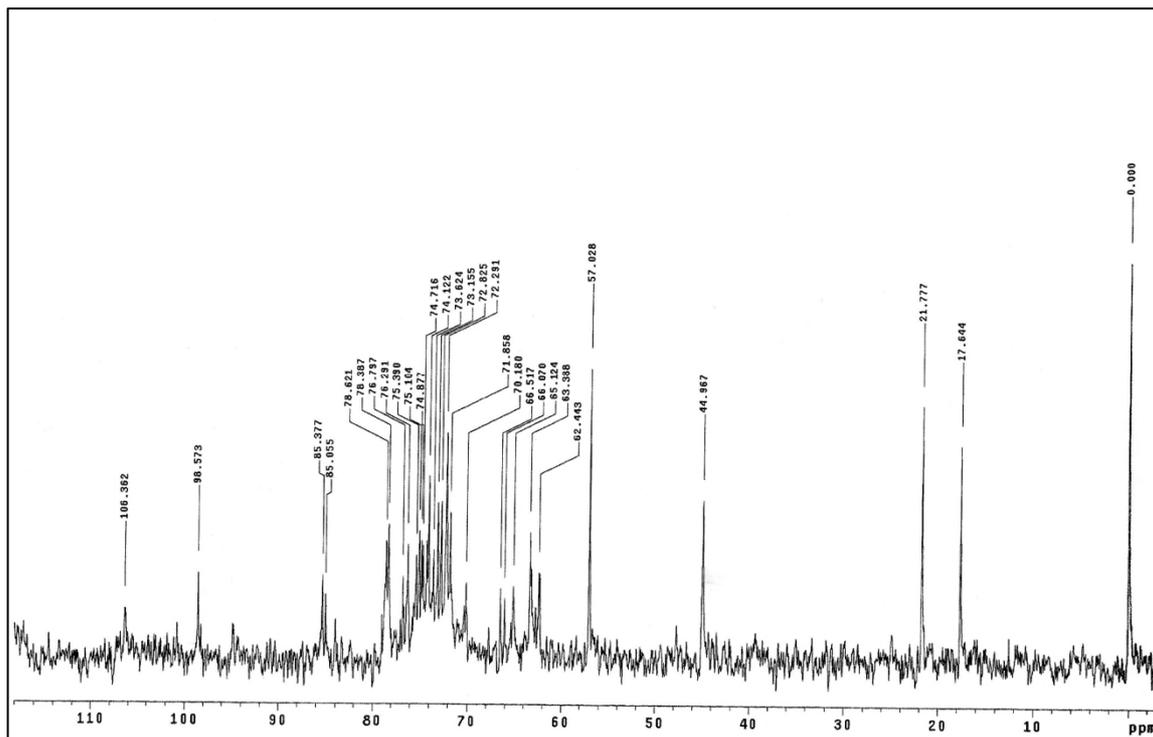


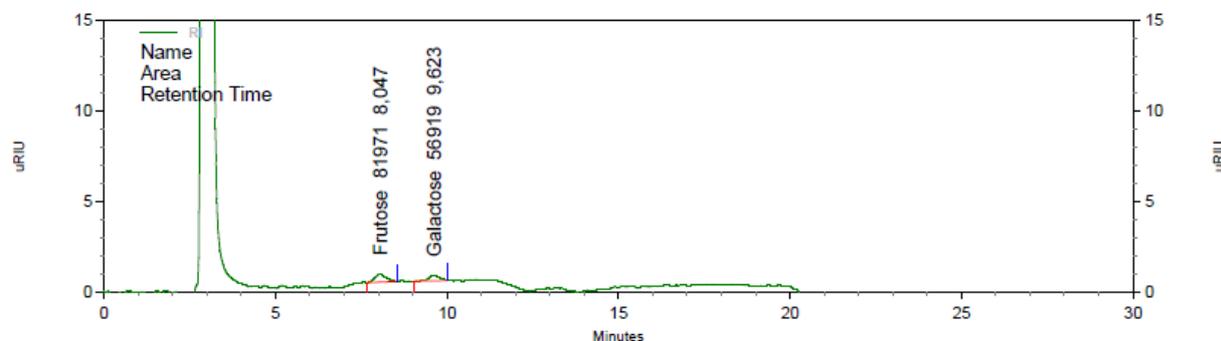
Figura 28 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de Bv01 (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ).

A Tabela 13 mostra os sinais correspondentes aos açúcares sacarose,  $\beta$ -D-galactose e  $\beta$ -D-frutose (170).

**Tabela 14.** Comparação entre os sinais encontrados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de Bv01 e sinais encontrados na literatura para sacarose,  $\beta$ -D-galactose e  $\beta$ -D-frutose (170).

	Bv01	Sacarose	Bv01	$\beta$ -D-galactose	Bv01	$\beta$ -D-frutose	Bv01
<b>C1</b>	98,5	94,6	106,3	104,0	65,1	64,8	106,3
<b>C2</b>	73,6	73,5	71,8	71,7	98,6	99,0	74,1
<b>C3</b>	75,1	75,1	73,6	73,8	70,1	68,5	76,7
<b>C4</b>	71,8	71,9	70,1	69,7	70,2	70,6	70,2
<b>C5</b>	74,9	74,9	76,2	76,0	70,2	70,1	76,8
<b>C6</b>	62,5	62,9	62,4	62,0	63,3	64,2	61,4
<b>C1'</b>	65,1	63,9	-	-	-	-	-
<b>C2'</b>	106,3	106	-	-	-	-	-
<b>C3'</b>	78,6	79	-	-	-	-	-
<b>C4'</b>	76,7	76,7	-	-	-	-	-
<b>C5'</b>	85	84	-	-	-	-	-
<b>C6'</b>	65,1	65	-	-	-	-	-

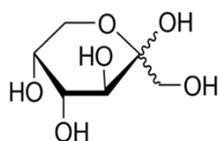
Além disso, a análise de Bv01 por CLAE-IR deu origem a dois sinais (**Figura 29**). A comparação com o tempo de retenção (t<sub>R</sub>) de amostras de açúcar mostrou que Bv01 continha frutose (t<sub>R</sub> = 8,04) e galactose.



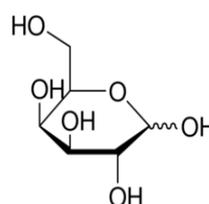
**Figura 29 – Cromatograma de Bv01 em CLAE – DAD da mistura açúcares.**

Condições da análise: Coluna: Lichrospher 100 NH<sup>2</sup>, 250 mm x 4,0 mm (HP 5μm) mantida a 30°C; fluxo: 1 ml/min; eluente: bomba A (acetonitrila), bomba B (água); detector: por índice de refração (IR); sistema de eluição: isocrático; programa de eluição bomba A: bomba B (80:20); região de análise entre 230nm e 400nm.

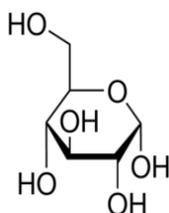
De acordo com os resultados obtidos, Bv01 é composto pelos açúcares frutose (**56**), galactose (**57**), glicose (**58**) e sacarose (**59**).



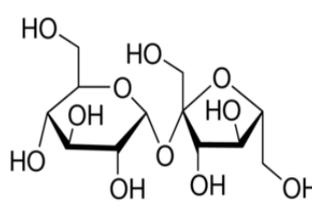
**(56)**



**(57)**



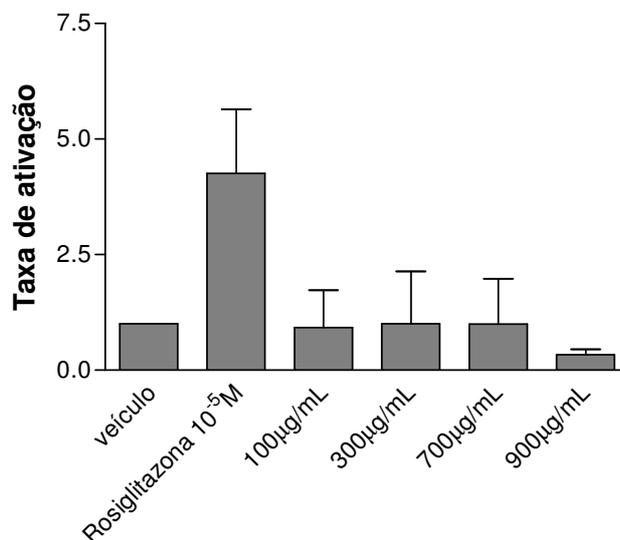
**(58)**



**(59)**

Bv01 também foi utilizada no tratamento das células mesangiais co-transfectadas com o plasmídeo de expressão CMV-PPAR $\gamma$  e com o plasmídeo

repórter PPRE-Luc. Posteriormente, a atividade agonista foi analisada por ensaio de gene-repórter, porém, essa fração não apresentou taxa de ativação diferente do veículo.

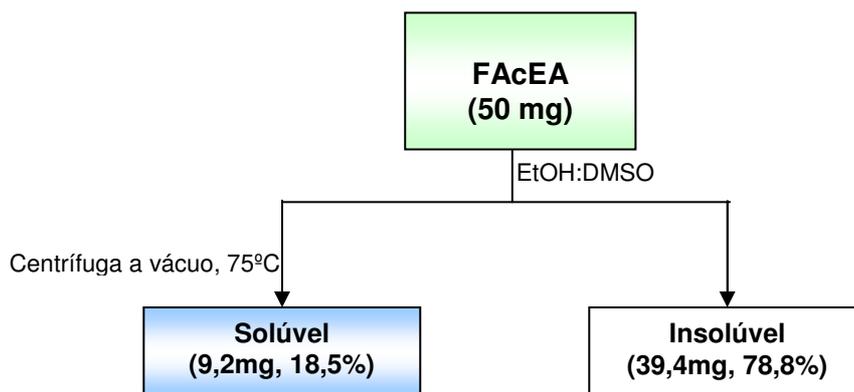


**Figura 30 - Atividade agonista de Bv01 (sólido branco obtido da fração aquosa do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata*) na concentração de 100, 300, 700 a 900 µg/mL.** As células foram co-transfectadas com 1,5 µg do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3 µg do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO: EtOH 2:3), com a rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M e com o sólido branco da fração aquosa do extrato aquoso. Teste realizado em triplicata n=2.

#### 4.2.4.4 – Avaliação da atividade agonista da fração acetato de etila obtida do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* ao receptor de PPAR $\gamma$ em células mesangiais.

Para avaliação, 50 mg de FAcEA foram solubilizados em EtOH: DMSO (3:2) na concentração de 100 µg/mL e foi observada a formação de um precipitado sólido na cor branca.

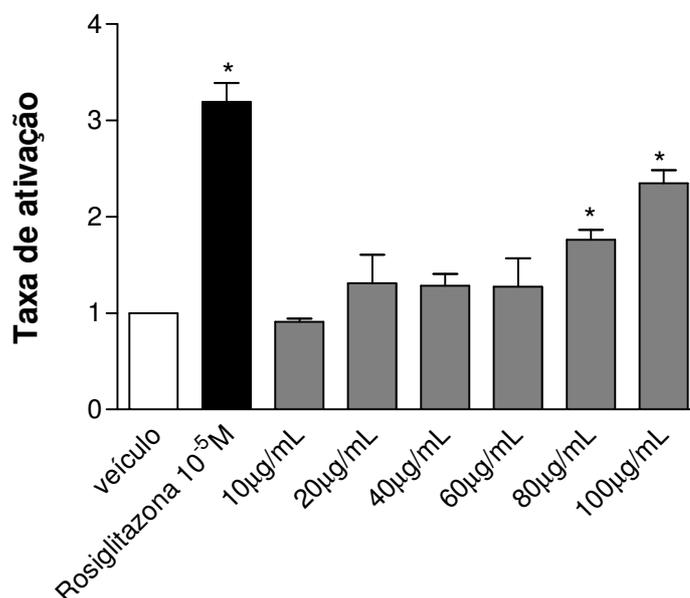
O precipitado foi separado. Esse sólido branco foi seco à temperatura ambiente (9,2 mg) e a fase solúvel foi seca em centrífuga a vácuo à 75°C (39,4 mg) **Figura 31.**



**Figura 31 – Partição fração acetato de etila do extrato aquoso de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* e biomonitoramento das frações com atividade agonista ao receptor de PPAR $\gamma$ .**

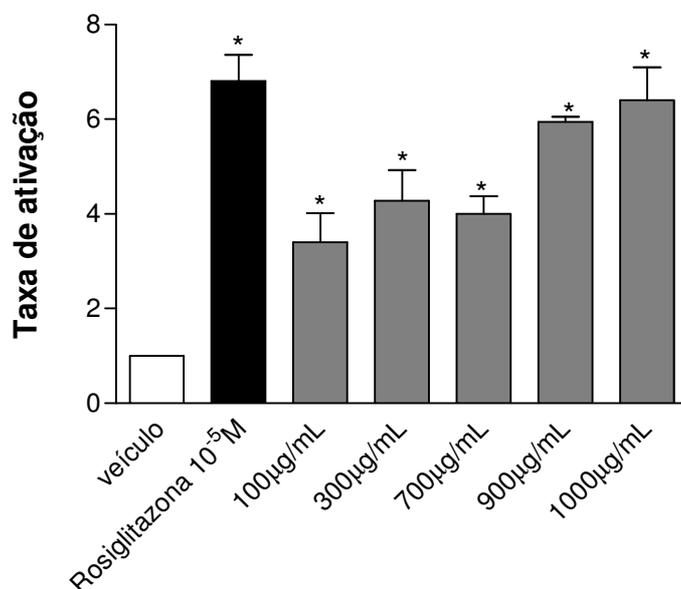
A parte solúvel da fração acetato de etila foi solubilizada em EtOH:DMSO 3:2 na concentração-mãe de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Para os testes foram utilizadas as concentrações de 10 a 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e, posteriormente, as concentrações de 100 a 900  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , no tratamento das células mesangiais co-transfectadas com o plasmídeo de expressão CMV-PPAR $\gamma$  e com o plasmídeo repórter PPRE-Luc. Em seguida, a atividade agonista foi analisada por ensaio de gene-repórter.

Os resultados indicaram que essa fração apresentou taxa de ativação nas concentrações de 80 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Figura 32**). E também nas concentrações entre 100 a 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Figura 33**)



**Figura 32 - Atividade agonista da fração acetato de etila do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* na concentração de 10 a 100 µg/mL.**

As células foram co-transfectadas com 1,5 µg do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3 µg do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO: EtOH 2:3), com a rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M e com o sobrenadante da fração acetato de etila. Teste realizado em triplicata. n=1.

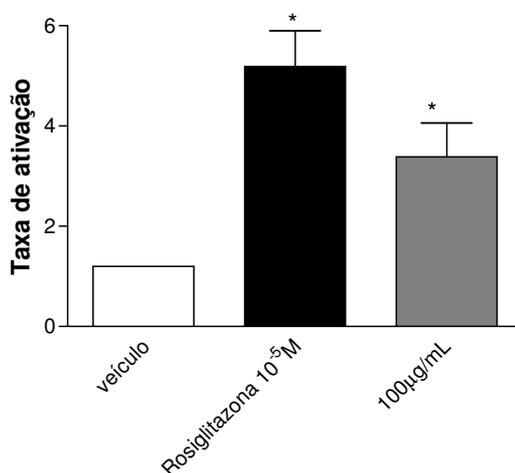


**Figura 33 - Atividade agonista do sobrenadante da fração acetato de etila do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* na concentração de 100, 300, 700 a 900µg/mL.**

As células foram co-transfectadas com 1,5 µg do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3µg do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO:

EtOH 2:3), com a rosiglitazona  $10^{-5}$ M e com o sobrenadante da fração acetato de etila. Teste realizado em triplicata. n=1.

Os resultados mostraram que a fração solúvel de FAcEA, principalmente a concentração de 100  $\mu$ g/mL, foi capaz de ativar o receptor de forma estatisticamente diferente do veículo, mostrando que essa sub-fração pode conter molécula ou moléculas responsáveis pela atividade de *Bauhinia variegata var. variegata* DC. (Figura 34).



**Figura 34 - Atividade agonista do sobrenadante da fração acetato de etila do extrato aquoso de *Bauhinia variegata var. variegata* na concentração de 100 $\mu$ g/mL.** As células foram co-transfectadas com 1,5  $\mu$ g do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3  $\mu$ g do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO: EtOH 2:3), com a rosiglitazona  $10^{-5}$ M e com o sobrenadante da fração acetato de etila. Teste realizado em triplicata. n=2.

#### 4.2.4.5 – Fracionamento de da fração acetato de etila do extrato aquoso de *Bauhinia variegata var. variegata* em coluna de sephadex.

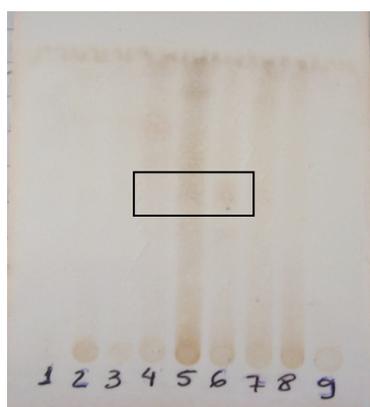
Parte de FAcEA (82,8mg) foi submetida à cromatografia por exclusão em gel utilizando Sephadex LH-20 (altura 25 cm; diâmetro: 2,5 cm), empacotada e eluída com metanol, fornecendo 32 frações de 5 mL. As frações

foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por CCD. A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em grupos (**Tabela 15**).

**Tabela 15.** Rendimentos das frações obtidas em coluna de Sephadex LH-20 da fração acetato de etila do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata*

<b>Bv</b>	<b>Frações</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
1	1-4	0,0008	0,10
2	5-8	0,0023	0,28
3	9	0,0027	0,33
4	10-11	0,0112	1,35
5	12-15	0,0271	3,27
<b>6</b>	<b>16-17</b>	<b>0,018</b>	<b>2,17</b>
7	18-19	0,0043	0,52
8	20-25	0,0056	0,68
9	26-32	0,0100	1,21

As frações 04, 05 e 06 apresentaram uma mancha em comum quando revelada com anisaldeído (**Figura 35**). E a fração 6 foi denominada de **Bv02** e parte dessa amostra foi retirada para teste no receptor de PPAR $\gamma$  e outra parte foi retirada para análise de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  por apresentar características mais puras em relação a outras amostras.

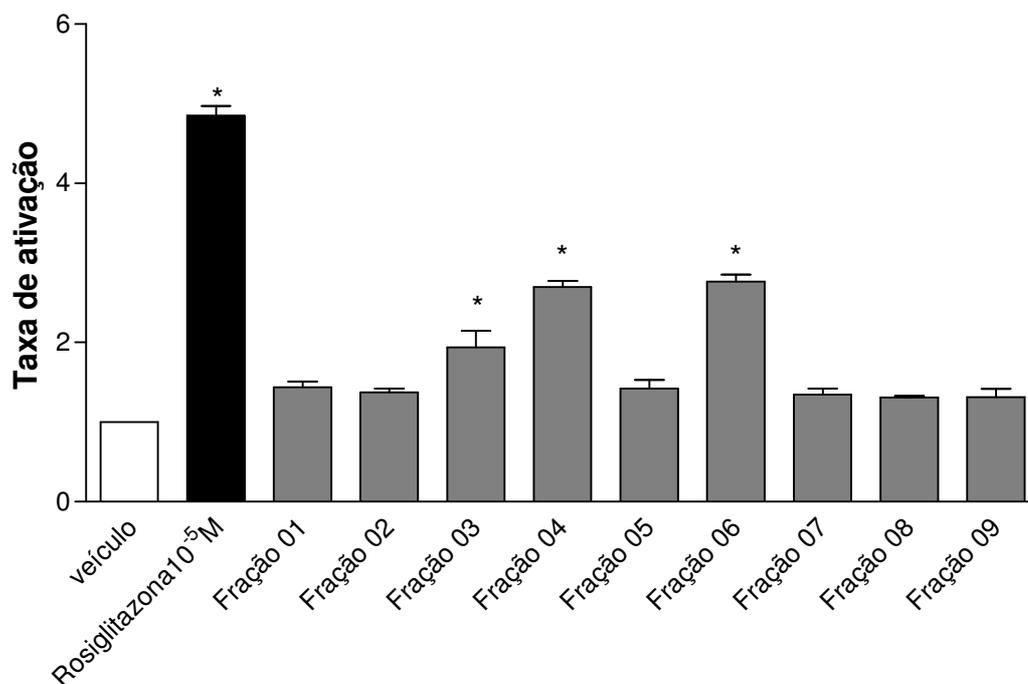


**Figura 35 –** Cromatografia em Camada Delgada das frações obtidas da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.

#### 4.2.4.6 – Avaliação da atividade agonista das frações obtidas em coluna de Sephadex LH-20 fração acetato de etila do extrato aquoso de *Bauhinia variegata var. variegata* ao receptor de PPAR $\gamma$ em células mesangiais.

Parte das frações obtidas em coluna de Sephadex-LH20 foi solubilizada em EtOH: DMSO 3:2 na concentração de 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , e foram utilizadas no tratamento das células mesangiais co-transfectadas com o plasmídeo de expressão CMV- CMV-PPAR $\gamma$  e com o plasmídeo repórter PPRE-Luc. Posteriormente, a atividade agonista foi analisada por ensaio de gene-repórter.

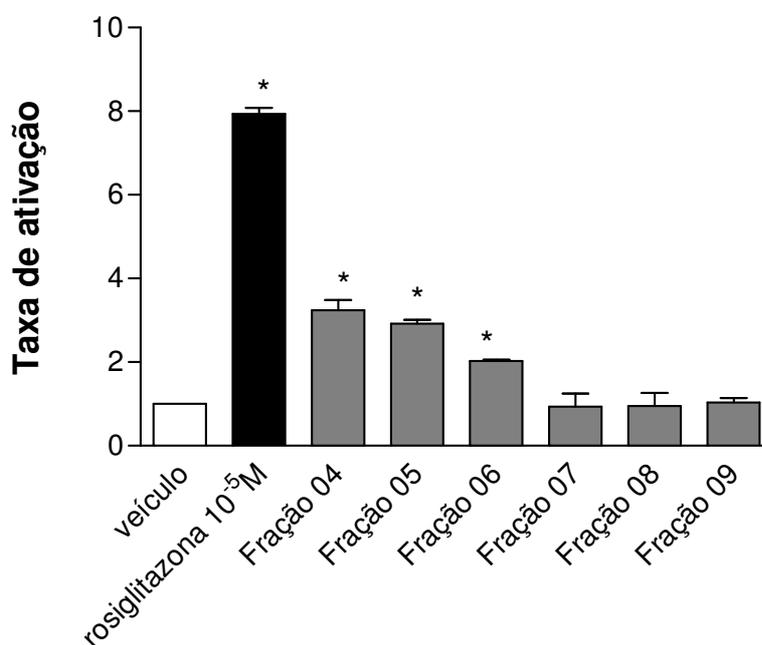
Os resultados preliminares mostraram que as frações 04, 05 e 06 diluídas em EtOH: DMSO 3:2 na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foram capazes de ativar o receptor de PPAR $\gamma$  (**Figura 36**).



**Figura 36 - Atividade agonista das frações obtidas da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila do extrato aquoso de *Bauhinia variegata var. variegata* na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .** As células foram co-transfectadas com 1,5  $\mu\text{g}$  do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO: EtOH 2:3), com a rosiglitazona 10<sup>-5</sup> M e com as frações da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila. Teste realizado em triplicata. n=1.

Na tentativa de observar melhor a atividade agonista das frações da coluna em Sephadex LH20, o teste em células mesangiais foi repetido, dessa

vez utilizando o plasmídeo contendo um receptor quimérico constituído pelo LBD do PPAR $\gamma$  fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 (LBD-PPAR $\gamma$ /DBD-GAL4) e o plasmídeo contendo o gene repórter da luciferase dirigido pelo promotor mínimo do adenovírus E1b e por uma sequência com cinco sítios de ligação do GAL4. Posteriormente, a atividade agonista foi analisada por ensaio de gene-repórter. Os resultados indicaram que as frações 04, 05 e 06 ativaram o receptor de PPAR $\gamma$  - GAL estatisticamente diferente do veículo (**Figura 37**).



**Figura 37 - Atividade agonista das frações obtidas da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila do extrato aquoso de *Bauhinia variegata* var. *variegata* na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .** As células foram co-transfectadas com 1,5  $\mu\text{g}$  do plasmídeo LBD-PPAR $\gamma$ /DBD-GAL4 e 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo GAL4-Luc e tratadas com o veículo (DMSO: EtOH 2:3), com a rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M e com o sobrenadante da fração acetato de etila. n=2.

Os resultados mostraram que as frações 04, 05 e 06 isoladas da coluna de Sephadex LH-20, apresentam atividade agonista ao receptor de PPAR $\gamma$ . Porém, principalmente a fração 6, apresentou uma diminuição na taxa de ativação em relação às outras frações que também vinham apresentando resultados favoráveis. Provavelmente a forma de armazenamento dessa fração possa ter influenciado, uma vez que não se sabe quais as melhores condições

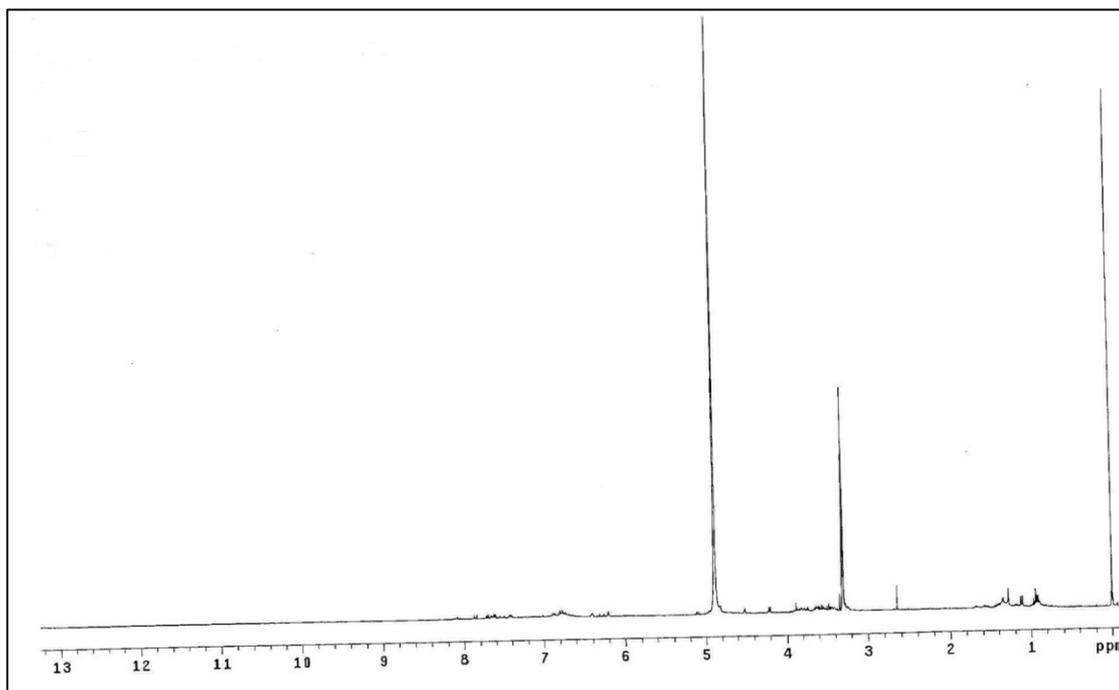
para armazenar a substância responsável por essa atividade, e estudos sobre esse assunto se tornam necessários.

Mas, de acordo com esses resultados, torna-se necessária a identificação da substância responsável por essa atividade.

#### 4.2.4.7– identificação das substâncias presentes em Bv02

Parte de **Bv02** (9 mg), isolada da coluna de Sephadex LH-20 oriunda de FAcEA, foi submetida à análise nos espectros RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOH, (**Figura 38**), apresentou sinais correspondentes à região aromática em  $\delta 7,73$  (1H, *d*,  $J = 3,3$  Hz, H-2'). Além disso, duplete em  $\delta 5,10$  (1H,  $J = 7,7$ Hz, H1'') referente a próton anomérico da porção de açúcar da isoquercitrina (**Figura 39**) e sinais em  $\delta 3,30$ - $3,80$  referente à região de açúcar (**Figura 40**).



**Figura 38 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração Bv02 (300MHz, MeOD).**

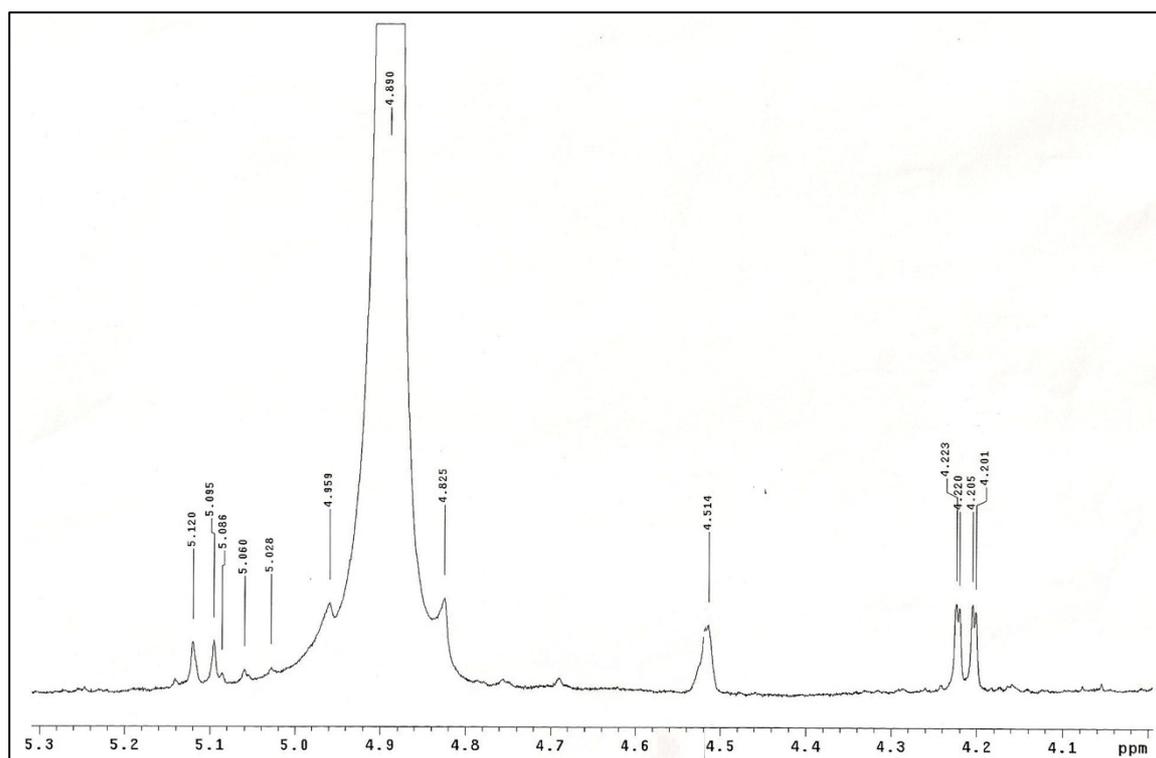
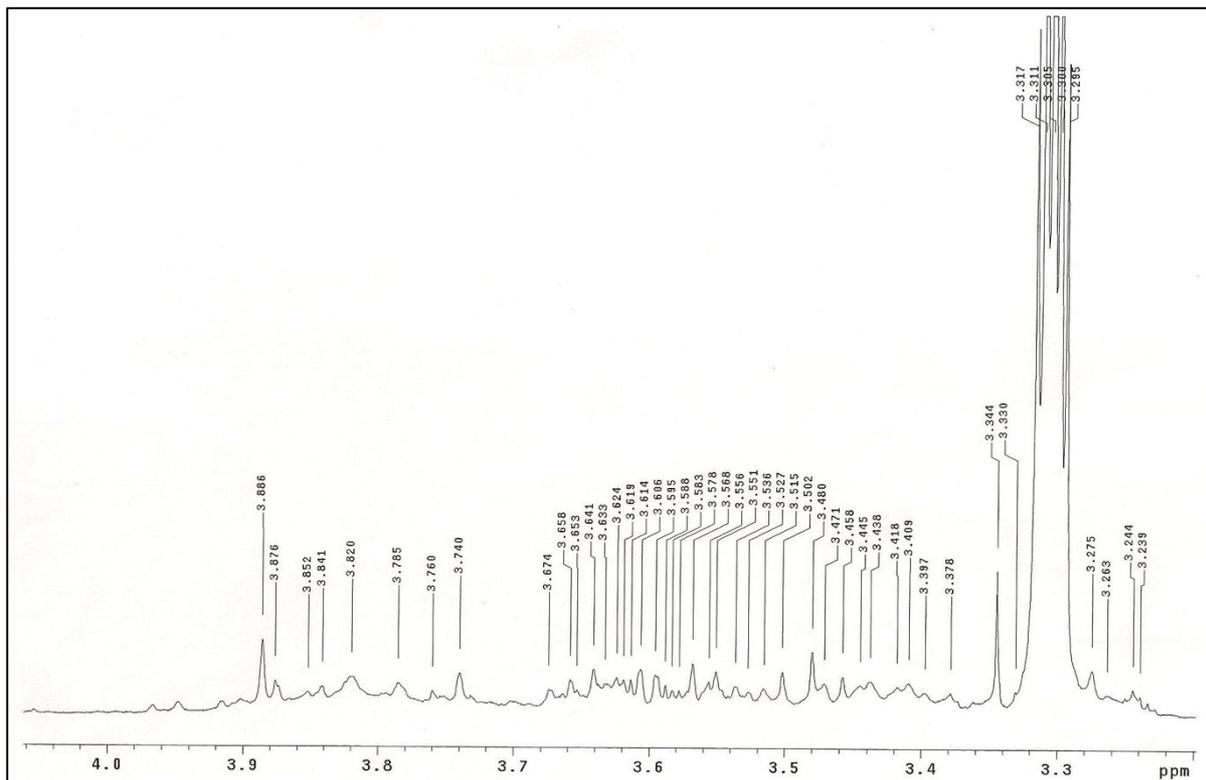
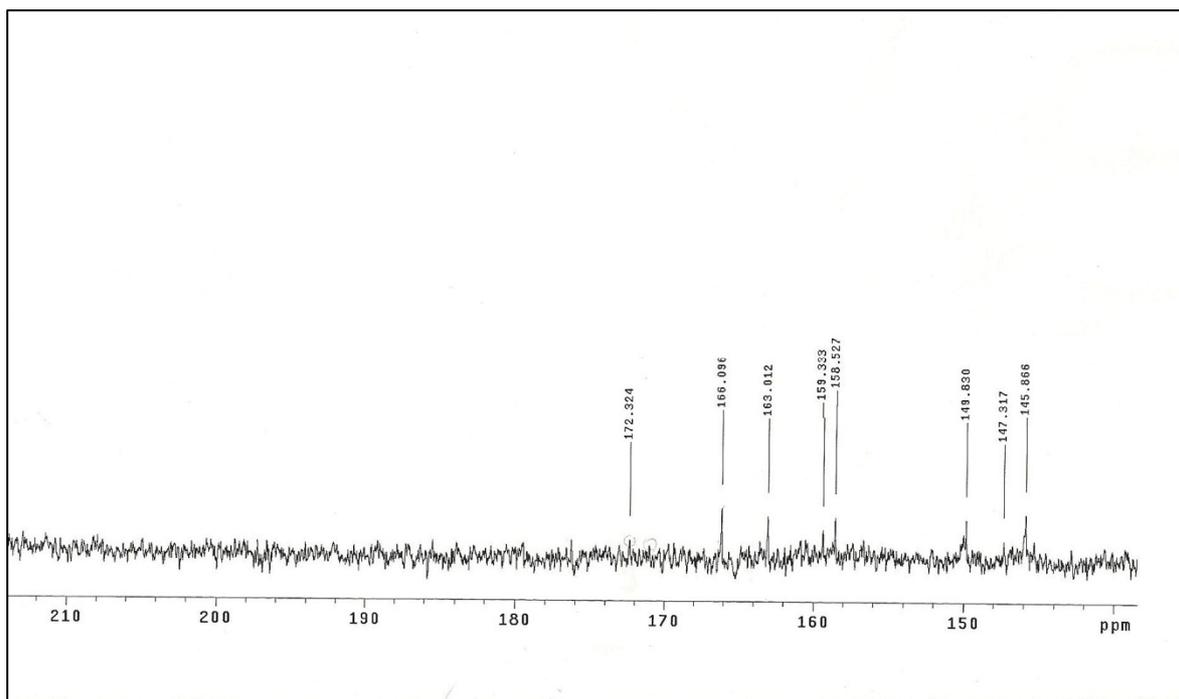


Figura 39 – Espectro de RMN 1H da fração Bv02. Expansão da região  $\delta$ 4,1- $\delta$ 5,3 (300MHz, MeOD).



**Figura 40 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração Bv02 – expansão da região  $\delta$ 3,3-  $\delta$ 4,0 (300 MHz, MeOD).**

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou sinais com deslocamentos químicos em  $\delta$ 163,0,  $\delta$ 166,1,  $\delta$ 145,8 e  $\delta$ 149,8 referentes aos sinais dos carbonos C-5, C-7, C-3' e C-4' que se caracterizam por serem carbonos aromáticos ligados à hidroxila; por isto, apresentam maior deslocamento químico do que os demais carbonos aromáticos presentes na estrutura. O sinal em  $\delta$ 104,7 foi atribuído ao carbono anomérico e sinais entre  $\delta$ 78,3 a  $\delta$ 62,5 mostraram-se consistentes aos relatados para a glicose. O sinal em  $\delta$ 179,5 corresponde ao carbono quaternário da carbonila, porém não foi possível a observação deste sinal, pois a amostra **Bv02** encontrava-se bastante diluída (**Figura 41**). (171, 172). De acordo com a comparação entre os sinais encontrados na literatura e os apresentados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  de **Bv02** tal amostra trata-se de um derivado de quercetina, provavelmente a isoquercitrina.



**Figura 41 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da fração Bv02 – Expansão da região  $\delta 145 - \delta 210$  (75MHz, MeOD).**

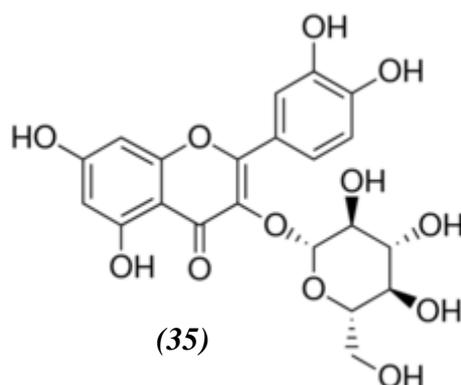
A **Tabela 16** mostra a comparação dos sinais encontrados para a fração **Bv06** nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e os relatos da literatura.

**Tabela 16.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ , 75 MHz, MeOD) dos carbonos de Bv02 em comparação com os dados da literatura ( $\delta$ , 75 MHz, MeOD). (171, 172).

Carbonos	Bv02	Isoquercitrina
C2	158,5	158,4
C3	135,6	135,6
C4	-	179,5
C5	163,0	163,0
C6	99,9	99,8
C7	166,1	166,0

C8	94,8	94,7
C9	159,3	159,0
C10	105,6	105,7
C1'	123,1	123,2
C2'	117,4	117,5
C3'	145,8	145,9
C4'	149,8	149,8
C5'	116,1	115,9
C6'	123,1	123,2
C1''	104,7	104,2
C2''	75,7	75,7
C3''	78,1	78,4
C4''	71,3	71,2
C5''	78,1	78,1
C6''	62,2	62,5

De acordo com os resultados encontrados nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  e de CCD, **Bv02** que corresponde à fração 06 da coluna de Sephadex LH-2, oriunda FAcEA tem na sua composição majoritariamente, um flavonoide derivado de quercetina, mais provavelmente isoquercitrina (**35**). Esse composto já foi isolado das folhas de *Bauhinia variegata*, porém esse é o primeiro relato da presença de isoquercitrina nas folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.



### **4.3 – identificação e avaliação da atividade agonista do extrato etanólico de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* ao receptor PPAR $\gamma$ .**

#### **4.3.1 - Estudo farmacognóstico preliminar do extrato etanólico de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata***

O extrato etanólico (BvEE) e suas frações foram analisados por CCD (sílica gel 60G, Merck), utilizando reveladores apropriados de acordo com o item 3.6. Os resultados estão apresentados na **Tabela 17**.

**Tabela 17.** Estudo farmacognóstico preliminar do extrato etanólico bruto e frações das folhas *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.

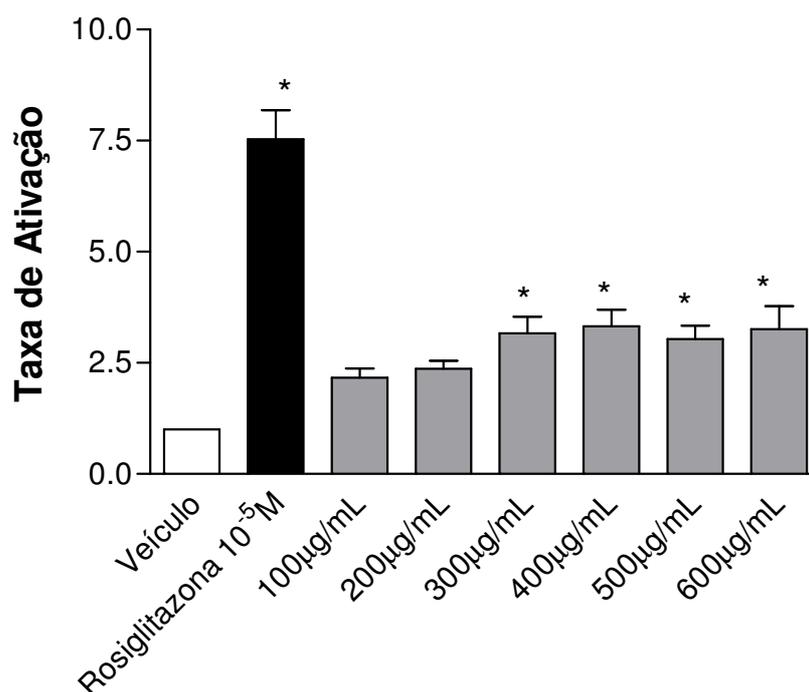
Reagentes	Compostos detectados	BvEE	BvFH	BvFD	BvFHM
Anisaldeído (R1)		+	+	+	+
NP/PEG (R2)	Compostos fenólicos	+	-	+	+
Verde de bromocresol (R3)	Ácidos de cadeia longa	+	+	+	-
Sulfato cérico (R5)	Lactonas sesquiterpênicas	+	+	+	+
Komarovsky (R6)	Glicosídeos de sapogenina	+	+	+	+
Dragendorff (R7)	Alcalóides	-	-	-	-

BvEE = Extrato etanólico de *Bauhinia variegata* var. *variegata*; BvFH = Fração hexânica de *Bauhinia variegata* var. *variegata*; BvFD = Fração diclorometanólica de *Bauhinia variegata* var. *variegata*; BvFHM = Fração hidrometanólica *Bauhinia variegata* var. *variegata*.

#### 4.3.2- Avaliação da atividade agonista em PPAR $\gamma$ do extrato etanólico de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata*

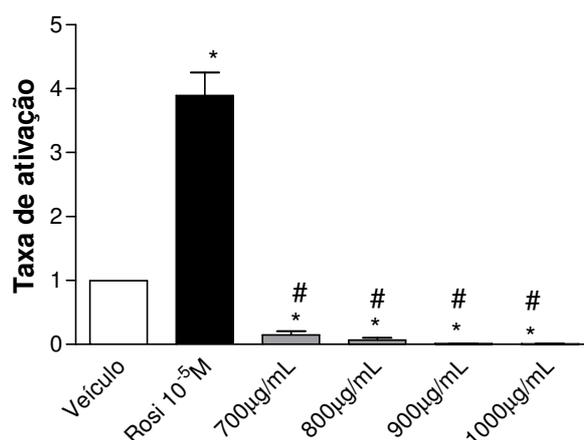
O extrato etanólico (BvEE) foi utilizado no tratamento das células U937 co-transfectadas com o plasmídeo de expressão CMV- PPAR $\gamma$  e com o plasmídeo repórter PPRE-Luc. Posteriormente, a atividade agonista foi analisada por ensaio de gene-repórter.

Primeiramente, BvEE foi testado em concentrações crescentes de 100  $\mu\text{g/mL}$  a 600  $\mu\text{g/mL}$ , apresentando ativação de 34,4% em relação ao controle positivo, rosiglitazona  $10^{-5}$  M (**Figura 42**). Portanto, outros testes foram realizados com concentrações maiores do extrato para verificar qual era a concentração de BvEE que conseguiria atingir o limite máximo de ativação do receptor PPAR $\gamma$ . A ativação do receptor de forma estatisticamente diferente do veículo foi obtida para todas as concentrações testadas, de 100 a 600  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 42 - Atividade agonista ao receptor PPAR $\gamma$  do extrato etanólico de folhas de *Bauhinia variegata var. variegata* nas concentração de 100 a 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .** As células foram co-transfectadas com 1,5  $\mu\text{g}$  do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO: EtOH, 2:3), com a rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M e com o extrato etanólico das folhas de *Bauhinia variegata var. variegata*.

Outros testes foram realizados BvEE nas concentrações de 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Figura 43**) a fim de verificar qual concentração máxima do extrato capaz de ativar o receptor PPAR $\gamma$ . No entanto nenhuma dessas concentrações apresentou ativação significativa.



**Figura 43 - Atividade agonista ao receptor PPAR $\gamma$  do extrato etanólico das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* nas concentração de 700 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ .** As células foram co-transfectadas com 1,5  $\mu\text{g}$  do plasmídeo CMV- PPAR $\gamma$  e 3  $\mu\text{g}$  do plasmídeo PPRE-Luc e tratadas com o veículo (DMSO: EtOH, 2:3), com a rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M e com o extrato aquoso. Nas concentrações de 70 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  a ativação do receptor de forma estatisticamente diferente do veículo foi obtida.

#### 4.3.3 – Identificação das substâncias presente nas frações do no extrato etanólico (BvEE) das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata*.

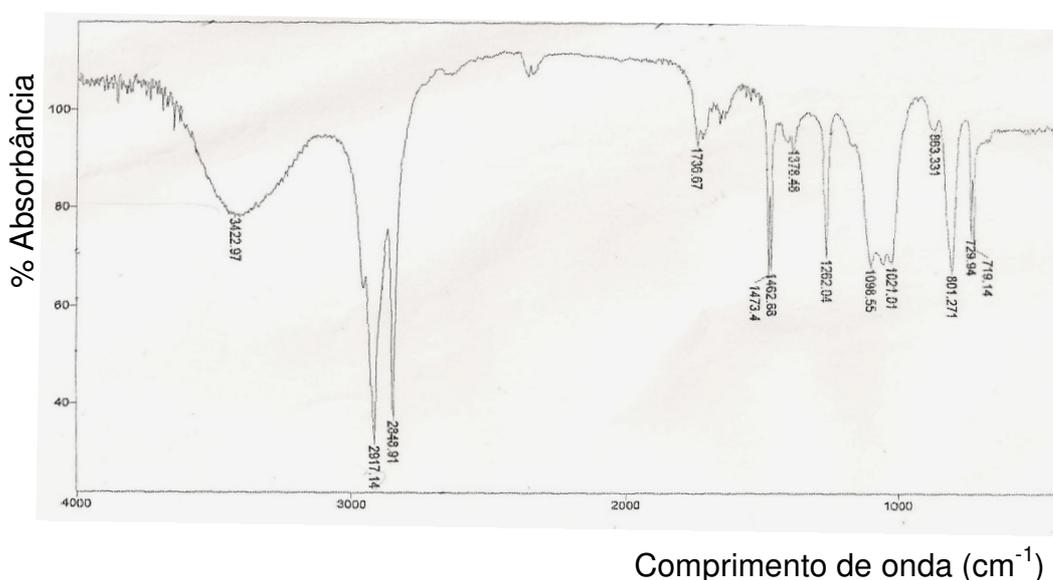
##### 4.3.3.1 - Análise fitoquímica da fração hexânica (BvFH)

A fração hexânica (BvFH, 3,4 g) resultante do processo de partição líquido-líquido realizado com o extrato etanólico bruto (BvEE) das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* foi submetida à cromatografia líquida em coluna (23 cm x 4,5 cm), usando sílica gel como fase estacionária e, como fase móvel, solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol. Frações de 50 mL foram coletadas, concentradas sob vácuo e analisadas por CCD. As frações com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas em grupos que, posteriormente, foram submetidos à lavagem com solvente, permitindo o isolamento de substâncias purificadas. A caracterização química foi feita por espectroscopia de por IV e RMN.

#### 4.3.3.1.1 – Mistura de ácidos graxos de cadeia longa (Bv03)

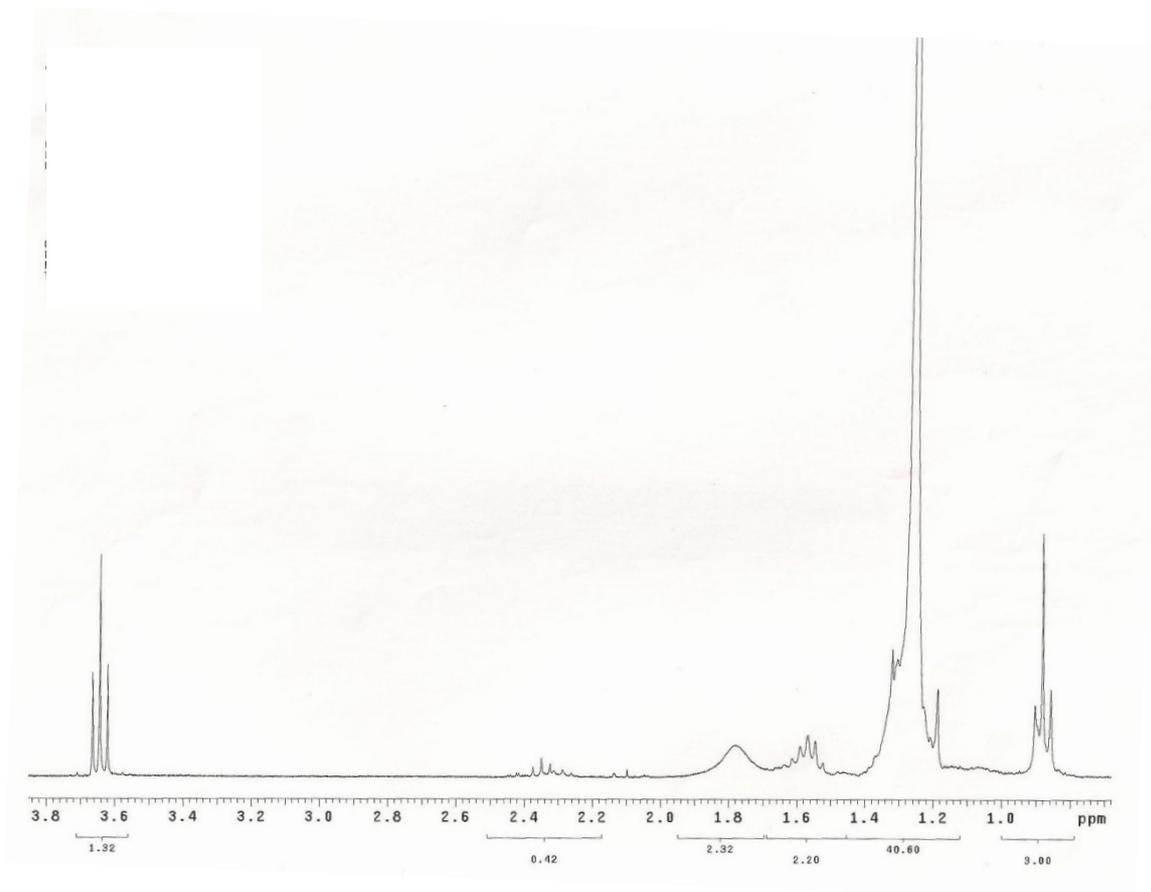
A amostra **Bv03** foi obtida a partir da reunião das frações 30 a 40 da coluna cromatográfica da fração hexânica, após purificação com acetona. Apresentou-se como um sólido branco (11,8 mg) solúvel em clorofórmio.

O espectro na região do infravermelho (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) da fração **Bv03** (**Figura 44**) apresentou duas bandas de absorção em 2917 e 2848 $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes a estiramento da ligação C-H em grupos metílicos e metilênicos. Apresentou também absorção em 1736  $\text{cm}^{-1}$ , característica de estiramento da ligação de C=O de éster e ainda uma banda larga em 3422  $\text{cm}^{-1}$ , característica de estiramento de ligação O-H de álcool (173, 174).



**Figura 44 – Espectro na região do Infravermelho de Bv03 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ).**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **Bv03** (**Figura 45**) mostrou um triplete em  $\delta 0,88$  ( $J = 3,3\text{Hz}$ ) atribuído a hidrogênio de grupo metila terminal. Sinais entre  $\delta 1,22$  e  $\delta 1,30$ , sugerindo a presença de hidrogênios de grupos metilênicos de cadeia alifática.



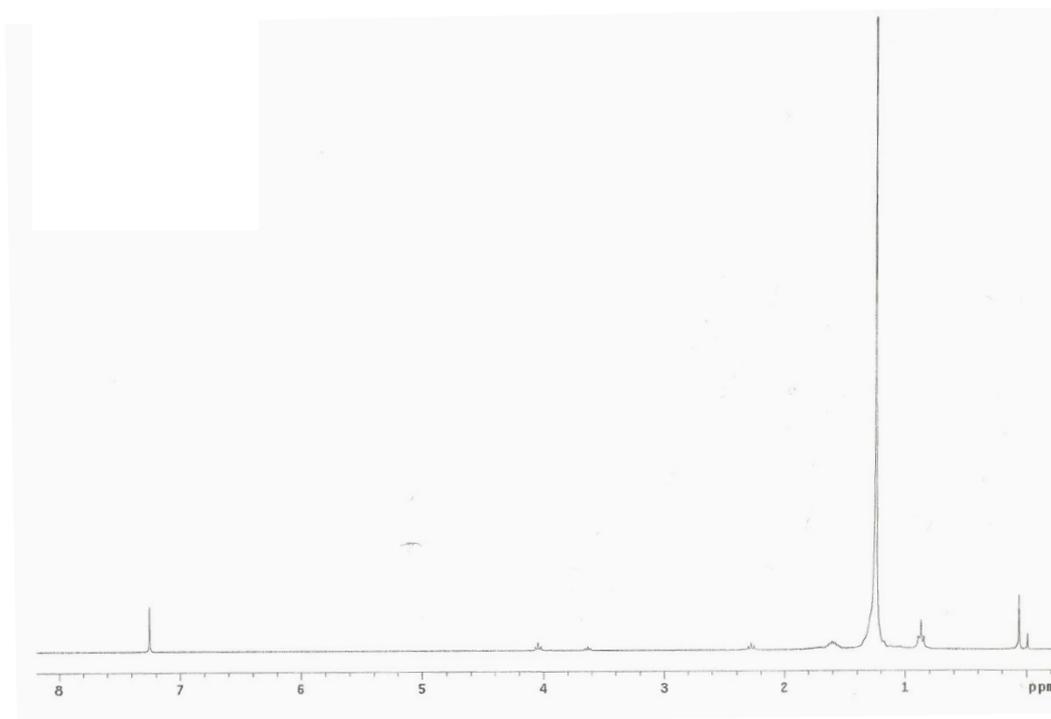
**Figura 45 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Bv03 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**

Os dados obtidos a partir das informações das análises espectrométricas no IV e de RMN de  $^1\text{H}$  sugeriram que **Bv03** é constituído de uma mistura de ácidos graxos.

#### **4.3.3.1.2 – Mistura de álcoois de cadeia longa (Bv04)**

**Bv04** foi obtida a partir da reunião das frações 16 a 25 da coluna cromatográfica da fração hexânica, após purificação com acetona. Apresentou-se como uma cera branca (15,1 mg), solúvel em clorofórmio.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **Bv04** (**Figura 46**), mostrou um tripleto em  $\delta 0,89$  ( $J = 1,5$  Hz) que pode ser atribuído a hidrogênio de grupo metila terminal e sinais entre  $\delta 1,21$  e  $\delta 1,30$ , sugerindo a presença de hidrogênios de grupos metilênicos de cadeia alifática.



**Figura 46 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Bv04 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**

A análise espectrométrica de RMN de  $^1\text{H}$  sugeriu que **Bv04** seja constituído de mistura de álcoois de cadeia longa.

#### **4.3.3.2 - Análise fitoquímica da fração diclorometanólica (FD)**

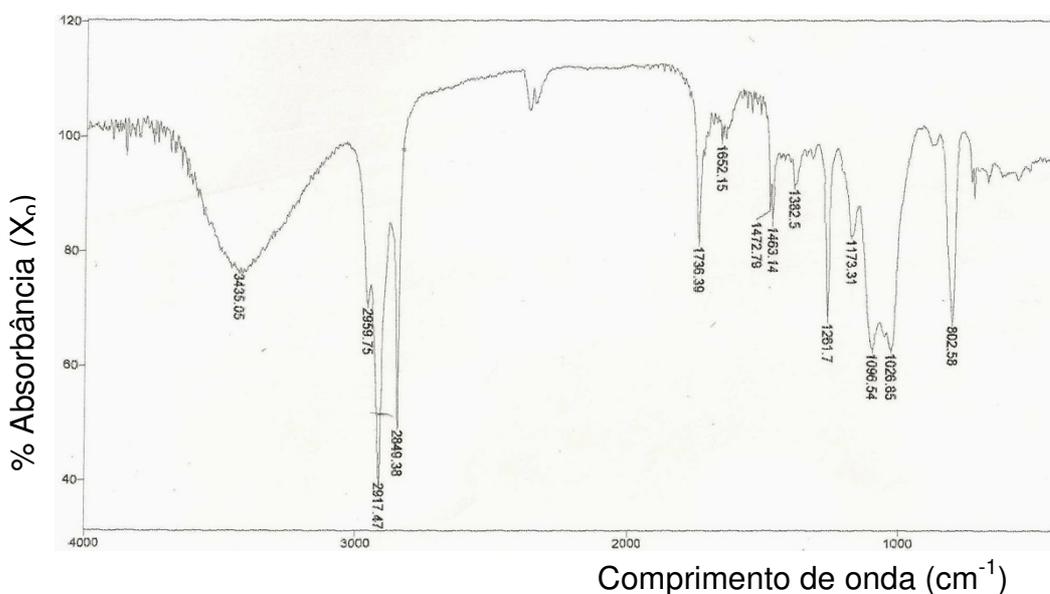
A fração diclorometanólica (FD, 3,0 g) resultante do processo de partição líquido-líquido realizado com o extrato etanólico bruto das folhas de *Bauhinia variegata var. variegata* foi submetida à cromatografia líquida em coluna (27 cm x 4,5 cm), usando sílica gel como fase estacionária e como fase móvel solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol.

Frações de 50 mL foram coletadas, concentradas sob vácuo e analisadas por CCD. As frações com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas em grupos que, posteriormente, foram submetidos à lavagem com solvente, permitindo o isolamento de substâncias purificadas. A caracterização química foi feita por espectrometria no infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

#### 4.3.3.2.1 – Mistura de éster e álcoois de cadeia longa (Bv05)

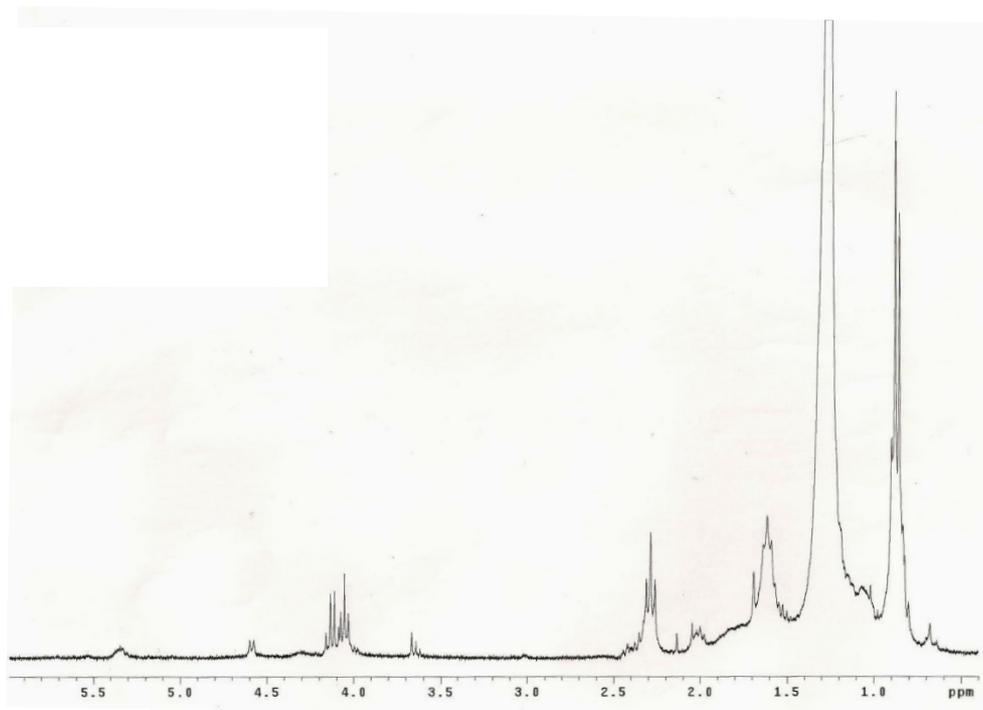
**Bv05** foi obtido a partir das frações 38 a 45 da coluna cromatográfica da fração diclorometanólica, eluídas pela fase móvel hexano: acetato de etila (9:1). Apresentou-se como um sólido branco (10,1mg) solúvel em clorofórmio.

No espectro na região do infravermelho (**Figura 47**) dessa fração (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) foram observadas duas bandas em 2917 e 2852 $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes a estiramento da ligação C-H em grupos metílicos e metilênicos. O espectro no infravermelho apresentou também uma banda de absorção em 1736  $\text{cm}^{-1}$ , região de absorção característica de estiramento da ligação de C=O de éster, e ainda, uma banda larga em 3435  $\text{cm}^{-1}$ , característica de estiramento de ligação O-H de álcool (173, 174).



**Figura 47 – Espectro na região do Infravermelho de Bv05 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ).**

O espectro de RMN DE  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **Bv05** (**Figura 48**) apresentou um tripleto deformado em  $\delta$ 0,88 ( $J = 7,2$  Hz, 2H) atribuído a hidrogênio de grupo metila terminal, um tripleto em  $\delta$ 2,3 ( $J = 5,4$  Hz, 2H) e um multipletto em  $\delta$ 4,1 atribuído a grupos metilênicos e metílicos.



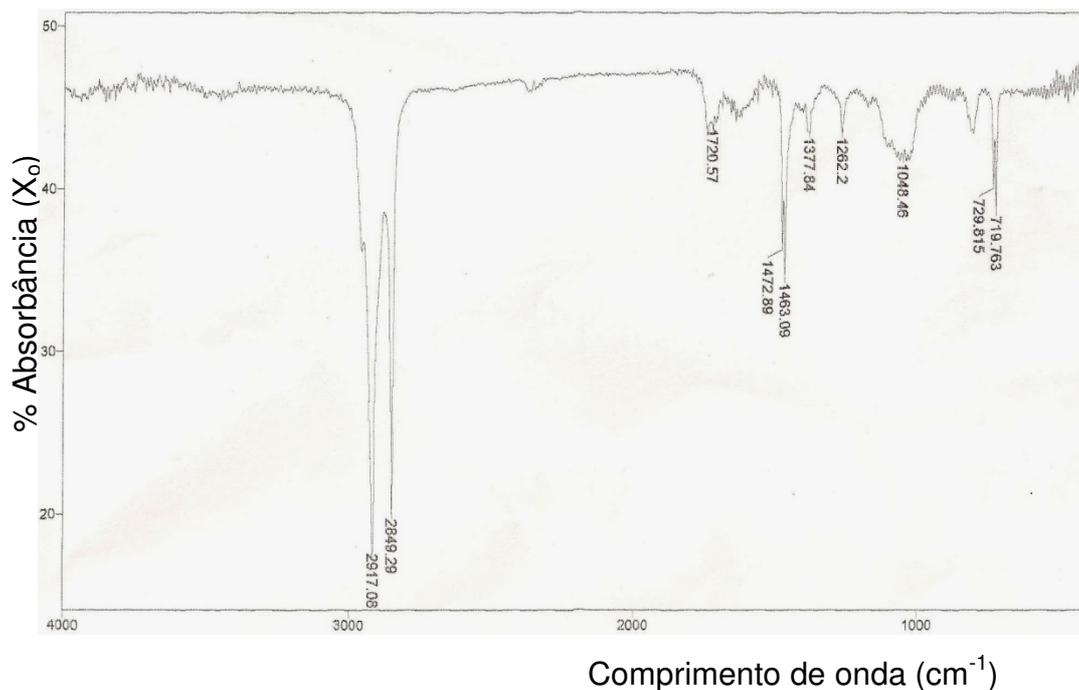
**FIGURA 48 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Bv05 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**

Os dados obtidos a partir das informações espectrométricas no IV e de RMN sugerem que **Bv05** seja constituído de mistura de ésteres e álcoois de cadeia longa.

#### **4.3.3.2.2 – Mistura de ésteres de cadeia longa (Bv06)**

**Bv06** foi obtida da reunião das frações 73 a 93 da coluna cromatográfica da fração diclorometanólica, eluídas pela fase móvel hexano:acetato de etila (8:2). Apresentou-se como um sólido branco (9,0 mg) solúvel em clorofórmio.

O espectro de IV de **Bv06** (**Figura 49**) apresentou bandas de absorção em 2917 e 2849  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a estiramento da ligação C-H em grupos metílicos e metilênicos, além de bandas de absorção em 1472  $\text{cm}^{-1}$  correspondente deformação angular de grupos metilênicos. Também foi observada a ausência de banda larga correspondente a estiramento da ligação de O-H de álcoois.



**Figura 49 - Espectro na região do Infravermelho de Bv06 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ).**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **Bv06** (**Figura 50**) apresentou um tripleto deformado em  $\delta 0,88$  ( $J = 7,2$  Hz, 2H) atribuído a hidrogênio de grupo metila terminal, um tripleto em  $\delta 3,6$  ( $J = 5,2$  Hz, 2H), atribuído a grupo metilênicos, além de um singlete em  $\delta 0,11$  correspondente a grupo metila.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **Bv06** (**Figura 51**) podem ser observados sinais em  $\delta 32,79$ ,  $\delta 31,92$ ,  $\delta 29,69$ ,  $\delta 39,36$ ,  $\delta 25,72$ ,  $\delta 22,69$ ,  $\delta 14,12$  que foram atribuídos a carbonos metilênicos e metílicos. O espectro apresentou ainda um sinal em  $\delta 63,11$ , atribuído carbono ligado a oxigênio.

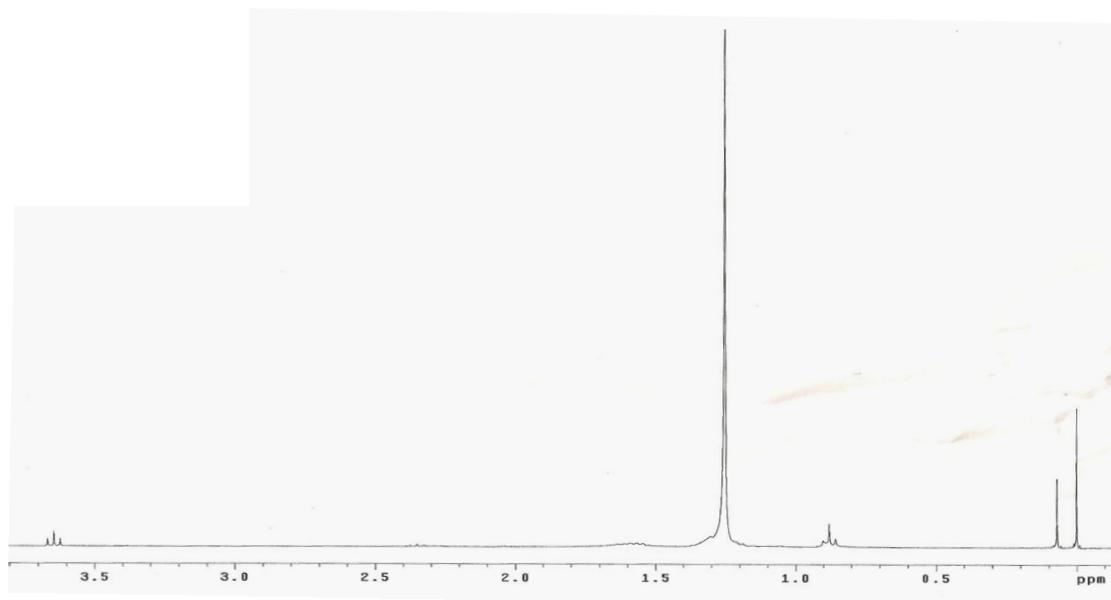


Figura 50 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de Bv06 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

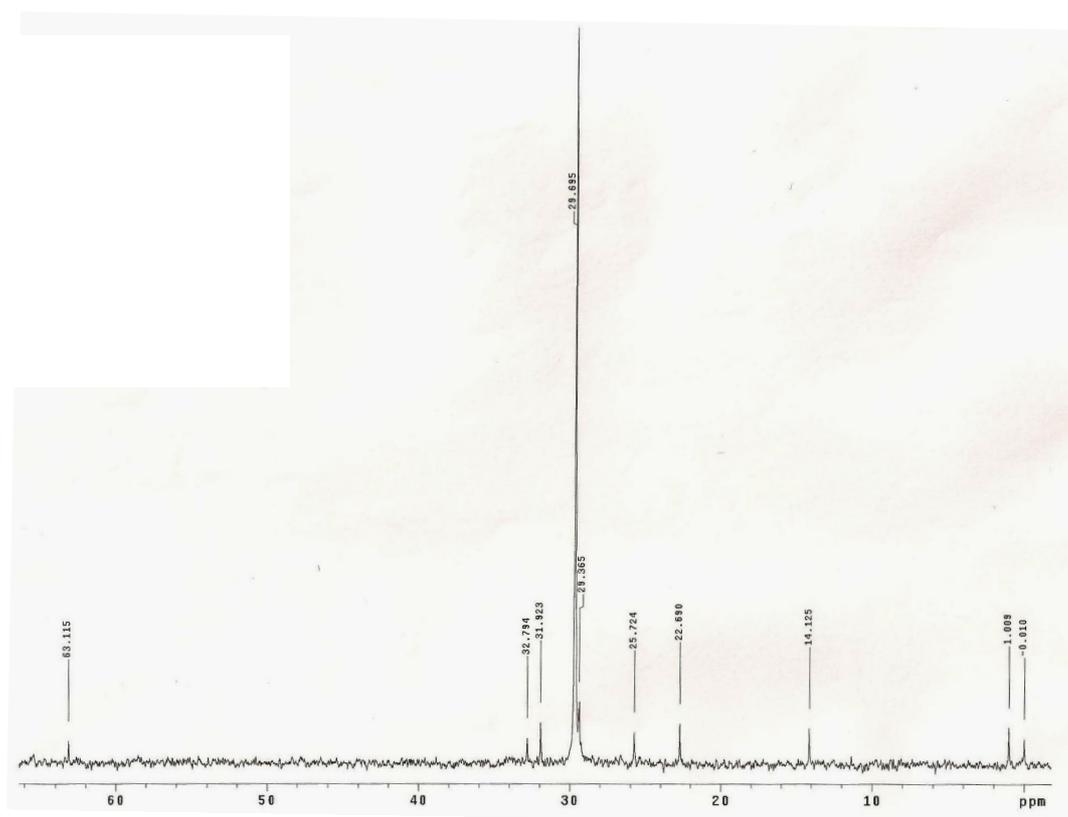


Figura 51 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de Bv06 (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Os dados obtidos a partir das informações espectrométricas de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  sugeriram que a **Bv06** seja uma mistura de compostos de cadeia longa contendo álcool esteárico (175).

#### 4.3.4 - Avaliação do potencial antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* pelo método de redução do complexo de fosfomolibdênio.

Este método de avaliação do potencial antioxidante, descrito por Prieto (1999), fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695 nm (176).

Foram utilizados, como referência, três diferentes padrões, ácido ascórbico, BHT e quercetina. De acordo com os resultados, o extrato etanólico e frações de folhas de *B. variegata* var. *variegata* apresentaram capacidade antioxidante. A fração diclorometanólica (1 mg) dessa amostra correspondeu a uma capacidade antioxidante em torno de  $300,7 \pm 27,8$  mg do ácido ascórbico, e  $5,834.8 \pm 462.6$  do BHT ou  $405.6 \pm 33.3$  de quercetina (**Tabela 18**).

**Tabela 18.** A atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC em comparação com quercetina, BHT e ácido ascórbico.

		Total da atividade antioxidante (mg/g do extrato)		
		Equivalentes de ácido ascórbico	Equivalentes de BHT	Equivalentes de Quercetina
Curva de Calibração	Curva $r^2$	$y = 2,645x + 0,1672$ 0,99	$y = 0,1588x + 0,0361$ 0,98	$y = 2,206x + 0,068$ 0,98
Amostras	BvEE	$143,3 \pm 52,7$	$3,213,1 \pm 878,5$	$216,8 \pm 63,2$
	BvHF	$221,9 \pm 60,9$	$4,520,8 \pm 1,013,9$	$311,0 \pm 73,0$
	BvFD	$300,7 \pm 27,8$	$5,834,8 \pm 462,6$	$405,6 \pm 33,3$
	BvFHM	$130,7 \pm 1,0$	$3,003,1 \pm 16,7$	$201,7 \pm 1,2$

BvEE = Extrato etanólico de *Bauhinia variegata* var. *variegata*; BvHF = Fração hexânica de *Bauhinia variegata* var. *variegata*; BvDF = Fração diclorometanólica de *Bauhinia variegata* var. *variegata*; BvHMF = Fração hidrometanólica de *Bauhinia variegata* var. *variegata*; BHT = 3,5-di-tert-4-butylhydroxytoluene.

#### 4.3.5 - Quantificação de polifenóis e flavonoides no extrato etanólico e frações de folhas *B. variegata* var. *variegata* DC.

Foi realizada a quantificação de polifenóis pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu e a quantificação de flavonoides pelo método de formação de complexos por cloreto de alumínio em extratos e frações das folhas de BvEE.

De acordo com os resultados, os polifenóis e, especificamente, os flavonoides presentes no extrato bruto (35,45 µg/mg), após a partição, ficaram distribuídos entre as frações. ( $p < 0.05$  – **Tabela 19**).

Não foi observada uma correlação entre quantidade de polifenóis e flavonoides de acordo com a correlação de Spearman

**Tabela 19.** Quantidade de polifenóis e flavonoides nos extratos e frações das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.

Frações	Quantidade de polifenóis ( $y = 0,0886x - 0,1028$ ) ( $r^2 = 0,9988$ )	Quantidade de Flavonoides ( $y = 0,0857x - 0,0437$ ) ( $r^2 = 0,9985$ )
	µg/mg	µg/mg
BvEE	35,45 ± 0,29	5,81 ± 0,344
BvFH	22,99 ± 1,15	2,55 ± 0,005
BvFD	29,85 ± 0,60	3,99 ± 0,190
BvFHM	26,21 ± 0,65	3,20 ± 0,121

BvEE = Extrato etanólico de *Bauhinia variegata*; BvFH = Fração hexânica de *Bauhinia variegata*; BvFD = Fração diclorometanólica de *Bauhinia variegata*; BvFHM = Fração hidrometanólica de *Bauhinia variegata*.

#### 4.4 - avaliação da atividade agonista de compostos presentes em *Bauhinia variegata* ao receptor PPAR $\gamma$ .

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a composição de *Bauhinia variegata* var. *variegata*. E mesmo a espécie *Bauhinia variegata* em comparação com outras espécies do mesmo gênero, ainda é relativamente pouco estudada. Porém, na literatura é possível encontrar relatos de estudos químicos, que citam vários compostos já isolados de partes dessa planta.

Devido à proximidade entre as duas espécies, *B. variegata* e *B. variegata* var. *variegata*, a avaliação da atividade agonista de alguns desses compostos, disponíveis comercialmente, foi realizada. Assim, representantes de triterpenos, ácidos graxos, flavonoides e outros polifenóis foram utilizados no tratamento de células mesangiais co-transfectadas com o plasmídeo contendo um receptor quimérico constituído pelo LBD do PPAR $\gamma$  fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 (LBD-PPAR $\gamma$ /DBD-GAL4) e o plasmídeo contendo o gene repórter da luciferase dirigido pelo promotor mínimo do adenovírus E1b e por uma sequência com cinco sítios de ligação do GAL4. Posteriormente, a atividade agonista foi analisada por ensaio de gene-repórter.

De acordo com os resultados apresentados no **Quadro 02**, os compostos testados não conseguiram ativar o receptor de PPAR $\gamma$ -gal de forma estatisticamente diferente do veículo.

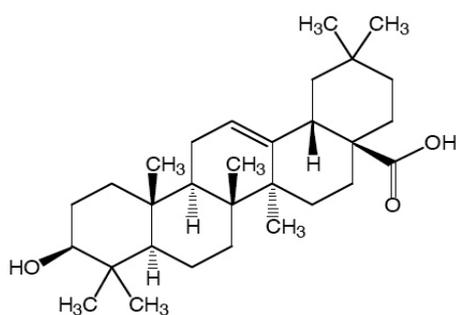
**Quadro 02:** Taxa de ativação no receptor de PPAR $\gamma$  dos compostos que são encontrados em *Bauhinia variegata*.

	Partes da planta	Ref. Bibliog..	Média teste 01	Média teste 02	Média teste 03	Média total
Veículo (EtOH: DMSO 3:2)			1,00	1,00	1,00	1,00 $\pm$ 0,00
Rosiglitazona			23,35	20,38	18,15	20,00 $\pm$ 2,47
<b>Luteolina 10-5M (33)</b>	Folhas	(84)	<b>1,31</b>	<b>2,7</b>	<b>3,26</b>	<b>2,55 <math>\pm</math> 0,85</b>
Luteolina 10-4M (33)			1,01	0,84	0,97	0,86 $\pm$ 0,18
<b>Kaempferol 10-5M (01)</b>	Partes aéreas	(74)	<b>1,14</b>	<b>1,82</b>	<b>2,08</b>	<b>1,50 <math>\pm</math> 0,53</b>
Kaempferol 10-4M (01)			0,43	0,75	0,81	0,62 $\pm$ 0,19
isoquercitrina 10-5M (35)	folhas	(84)	1,51	1,22	1,55	1,41 $\pm$ 0,15
Rutina 10-5M (33)		(84)	1,22	1,3	1,28	1,27 $\pm$ 0,04
Quercetina 10-5M (26)		(84)	0,95	1,5	1,2	1,22 $\pm$ 0,27
Isohamnetina 10-5M (09)		(84)	1,16	1,02	0,85	1,01 $\pm$ 0,15
Hesperidina 10-5M (05)	Partes aéreas	(74)	1,06	1,23	1,12	1,14 $\pm$ 0,08
Naringina 10_5M (25)	Casca da raiz	(80)	1,1	0,8	0,9	0,93 $\pm$ 0,15
<b>Ac palmítico 10-4M (20)</b>		(81)	<b>0,96</b>	<b>2,61</b>	<b>2,51</b>	<b>1,95 <math>\pm</math> 0,77</b>
<b>Ac palmítico 10-5M (26)</b>			<b>1</b>	<b>2,22</b>	<b>2,48</b>	<b>1,98 <math>\pm</math> 0,66</b>
<b>Ac oleanólico 10-5M (60)</b>			<b>1,1</b>	<b>2,19</b>	<b>2,35</b>	<b>1,89 <math>\pm</math> 0,55</b>
Ac. Cafeico 10-5M (61)			1,49	1	0,98	1,16 $\pm$ 0,28
Ac ferúlico 10-5M (62)			1,17	0,85	0,84	0,95 $\pm$ 0,18
Galato de Metila 10-5M (40)	folhas	(81)	1,03	1,55	0,9	1,16 $\pm$ 0,34

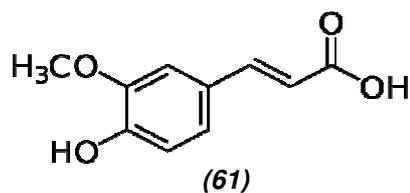
Ac clorogênico 10 <sup>-5</sup> M (63)			1,11	1,25	1,13	1,16 ± 0,07
Protocatecúico 10 <sup>-5</sup> M (38)	folhas	(81)	1,22	1,27	0,92	1,14 ± 0,18

As células foram co-transfectadas com 1,5 µg do plasmídeo LBD-PPAR $\gamma$ /DBD-GAL4 e 3 µg o plasmídeo GAL4 e tratadas com o Controle Negativo: DMSO:EtOH (2:3), com Controle Positivo: rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M e com **Compostos testados**. Teste em triplicata . n = 3. Todos os compostos testados foram adquiridos da SIGMA-ALDRICH.

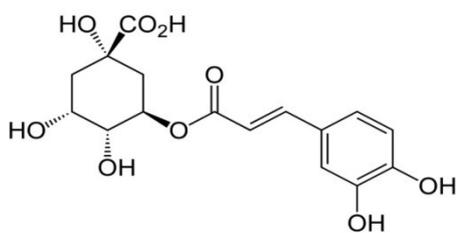
A avaliação da taxa de ativação dos compostos acima mencionados, na concentração de 10<sup>-5</sup>M e 10<sup>-4</sup>M, mostrou que luteolina 10<sup>-5</sup>M (2,93 ± 1,01), kaempferol 10<sup>-5</sup>M (1,95 ± 0,49), ácido palmítico 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup>M (2,51 ± 0,83 e 2,48 ± 0,70 respectivamente) e ácido oleanólico (2,35 ± 0,57) apresentaram taxas de ativação, porém não estatisticamente significativas quando comparadas ao controle rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M (20,00 ± 2,47) . (**Figura 52**)



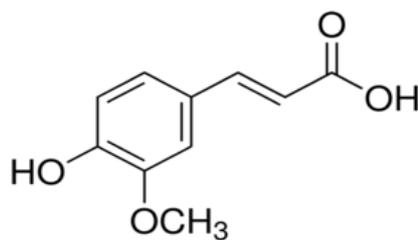
(60)



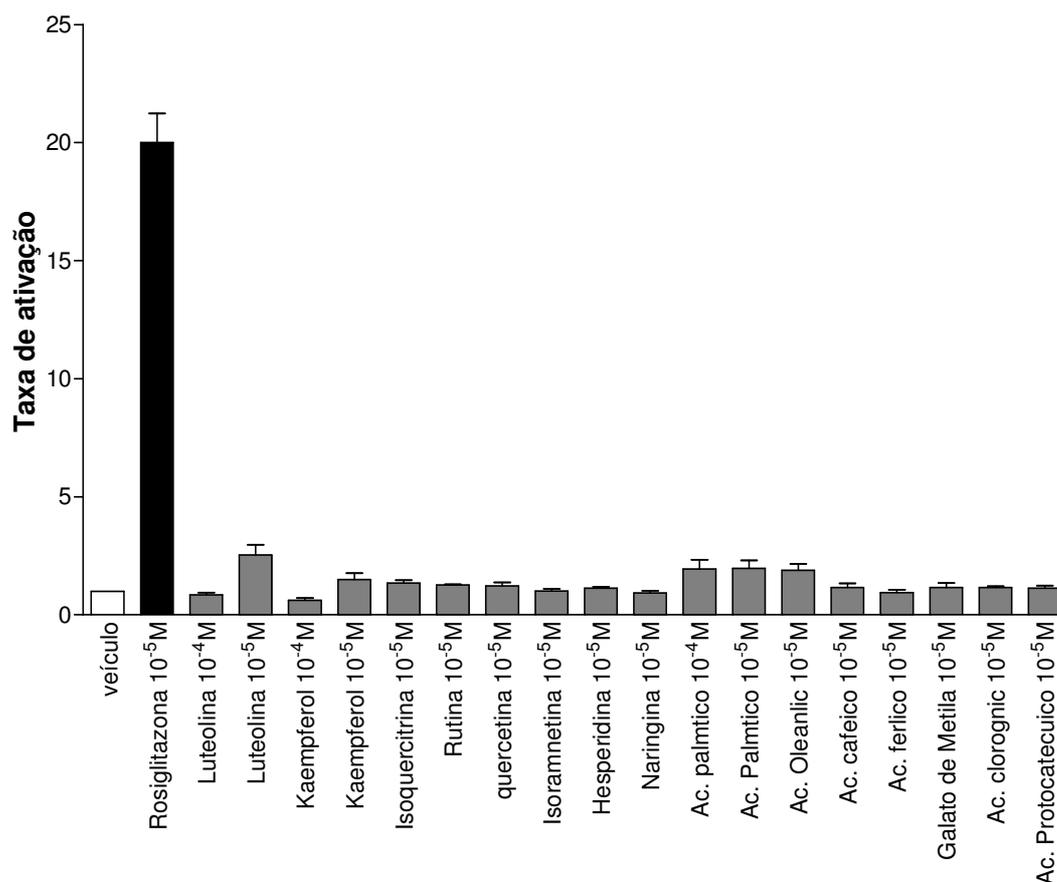
(61)



(62)



(62)



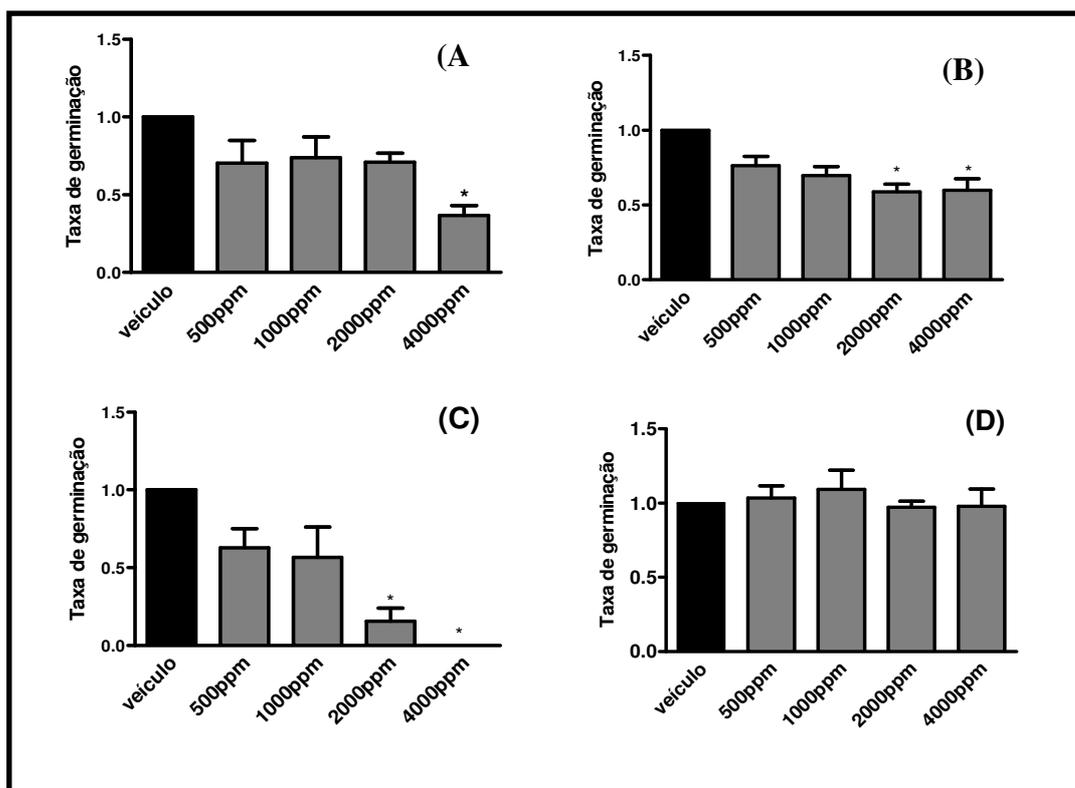
**Figura 52 - Atividade agonista ao receptor PPAR $\gamma$  de compostos presentes em *Bauhinia variegata* nas concentrações de 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup>M.** As células foram co-transfectadas com 1,5 $\mu$ g do plasmídeo contendo um receptor quimérico constituído pelo LBD do PPAR $\gamma$  fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 (LBD-PPAR $\gamma$ /DBD-GAL4) e o e 3 $\mu$ g do plasmídeo contendo o gene repórter da luciferase dirigido pelo promotor mínimo do adenovírus E1b e por uma sequência com cinco sítios de ligação do GAL4 e tratadas com o veículo (DMSO: EtOH 2:3), com a rosiglitazona 10<sup>-5</sup>M e com os compostos nas concentrações de 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> M. \*p<0,05 vs veículo. Testes realizados em triplicata. n = 4.

#### 4.5 – Avaliação do efeito alelopático (inibição de germinação) do extrato de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC. em *Lactuca sativa*.

Para a análise do efeito alelopático nas sementes de *Lactuca sativa*, o critério para germinação pode ser o surgimento da curvatura geotrópica da radícula ou uma radícula de tamanho maior que 50% do tamanho da semente. Esses critérios garantem a diferenciação da falsa germinação por expansão do embrião com a hidratação (160).

Foram feitas duas repetições do teste de germinação, sendo todos os cálculos estatísticos feitos a partir da média dos valores de ambos os testes, conforme descrito no item 3.7.3, página 27. As amostras foram analisadas quanto a alterações no percentual de sementes germinadas (germinabilidade) em relação aos grupos controle, onde foi assumida a germinação como 100% (Figuras 53).

Pela análise dos gráficos apresentados na Figura 54 é possível observar que o extrato etanólico e a fração hexânica só apresentaram atividade alelopática nas maiores concentrações avaliadas. O extrato etanólico, na concentração de 4000 ppm, reduziu a germinação de *L. sativa* em quase 60%. A fração hexânica, por sua vez, tanto na concentração de 2000 ppm, quanto em 4000 ppm reduziu a germinação de *L. sativa* também em cerca de 60%. Além disso, a fração diclorometanólica (Figura 54) inibiu de forma significativa a germinação de *Lactuca sativa* nas concentrações de 2000 e 4000 ppm, sendo que na concentração de 4000 ppm inibiu completamente a germinação.



**Figura 53 - Percentual de sementes germinadas expostas a diferentes concentrações de frações do extrato etanólico de folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* em relação aos grupos controle. (A) Extrato etanólico de *Bauhinia variegata* var. *variegata*; (B) Fração hexânica de *Bauhinia variegata* var. *variegata*;**

(C) Fração diclorometanólica de *Bauhinia variegata* var. *variegata* (D) Fração hidrometanólica de *Bauhinia variegata* var. *variegata*

Alelopatia é o efeito direto ou indireto de uma planta sobre outra, por meio da produção de compostos químicos liberados no ambiente. Os metabólitos secundários ou produtos naturais envolvidos em alelopatia são denominados aleloquímicos e estão presentes nos tecidos de diferentes partes das plantas (177).

Esses resultados indicam que tanto o extrato etanólico das folhas quanto as frações analisadas possuem uma atividade alelopática. As observadas inibições da germinação de sementes de *Lactuca sativa* por efeito alelopático dos extratos e frações testadas sugerem que estes possam servir como alternativas de controle de plantas daninhas, ou seja, substâncias presentes no extrato podem ter efeito herbicida.

A análise dos extratos de folhas de *B. variegata* var. *variegata* por métodos espectrométricos permitiu a identificação do composto presente majoritariamente como sendo um derivado de quercetina, mais provavelmente isoquercitrina (**35**), que pode ser oriundo da hidrólise de rutina (**33**), detectado por CLAE-DAD.

Contudo, esses compostos puros, quando testados em PPAR $\gamma$ , não o ativou de forma estatisticamente diferente do veículo, mostrando que, ao menos na forma isolada, isoquercetina e rutina não são responsáveis pela atividade agonista verificada. Parece que o composto responsável por essa ativação deva ter propriedade menos polares do que a isoquercitrina, uma vez que ligantes naturais dos receptores de PPAR $\gamma$  tendem a apresentar características similares a ácidos graxos (178). Além disso, se houve participação da isoquercitrina ou rutina na ativação do receptor de PPAR $\gamma$  nos testes realizados nesse trabalho, foi sinérgica com outro(s) composto(s), identificados ou não, e a busca pela(s) molécula(s) responsável pela ativação das folhas *B. variegata* var. *variegata* DC nos receptores de PPAR $\gamma$  ainda torna-se necessária. Para tanto, novos testes precisam ser realizados com quantidades maiores de amostra, para que a identificação do composto ativo seja facilitada.

Não foram encontrados trabalhos que relacionem a atividade de isoquercitrina no receptor de PPAR $\gamma$ , porém, Fang *et al.*(2008), mostraram em seu trabalho que os flavonoides quercetina e kaempferol, isolados de *Euonymus alatus*, possuem atividade agonista parcial fraca nos receptores de PPAR $\gamma$  e podem melhorar significativamente a absorção de glicose estimulada por insulina em células maduras de adipócitos 3T3-L1 (179).

Foi realizada uma avaliação da atividade agonista de PPAR $\gamma$  de compostos que já foram isolados de *Bauhinia variegata*, dentre eles kaempferol e quercetina. Contudo, nas condições experimentais (utilizando células mesangiais), os resultados diferiram daqueles obtidos por Fang *et al* (2008), mesmo que kaempferol ( $10^{-5}$  M) tenha apresentado um dos melhores resultados entre as substâncias testadas, ativando cerca de  $1,95 \pm 0,49$  vezes o receptor.

Outro trabalho na literatura mostrou que a luteolina pode desenvolver tanto um papel agonista quanto um papel antagonista do receptor de PPAR $\gamma$ . Esse composto apresentou uma fraca atividade agonista/antagonista e inibiu a formação de vários genes alvo em células 3T3-L1 (LPL, ORL1 e CEBR $\alpha$ ). Ainda, inibiu a adipogênese dependente de PPAR $\gamma$  (180). Contudo, quanto testado em células mesangiais também apresentou uma baixa atividade agonista no receptor de PPAR $\gamma$  ( $2,55 \pm 0,85$  vezes), corroborando os resultados encontrados na literatura.

Por outro lado, sabe-se que, *in vivo*, flavonoides O-glicosilados agem como pró-fármacos. Glicosídeos polifenólicos, incluindo flavonoides, são relativamente hidrofílicos e não difundem passivamente através de membranas biológicas. As agliconas podem ser absorvidas no estômago enquanto os respectivos glicosídeos não. Na planta, usualmente os flavonoides ocorrem como  $\beta$ -glicosídeos (181). A ligação  $\beta$  da porção glicídica da molécula é resistente à hidrólise promovida pelas enzimas pancreáticas. Contudo, no intestino delgado, esses flavonoides O-glicosilados são hidrolisados, liberando a aglicona correspondente [no caso da rutina e isoquercitrina, a aglicona é a quercetina (**28**)], devido à ação da microbiota intestinal e de  $\beta$ -glicosidases (caracterizadas no intestino delgado humano), que incluem lactase florizina hidrolase (LFH) e uma enzima citosólica inespecífica (182, 183).

Na revisão realizada por Xie *et al.*(2014) foram citados vários compostos oriundos de produtos naturais capazes de ativar o receptor de PPAR $\gamma$ , dentre eles alguns dos testados nesse trabalho, tais como o ácido palmítico que apresentou atividade agonista em PPAR $\gamma$  (184) e ácido oleanólico, mostrado como modelo farmacofórico capaz de ativar o receptor de PPAR $\gamma$ . (185).

Tanto o ácido oleanólico quanto o ácido palmítico apresentaram resultados significativos de ativação agonistas no receptor de PPAR $\gamma$  em células mesangiais, e os resultados mostraram que esses compostos foram capazes de ativar  $1,89 \pm 0,55$  e  $1,98 \pm 0,66$  vezes respectivamente, aproximando-se dos resultados encontrados na literatura.

É sabido que os ácidos graxos possuem efeitos capazes de afetar as funções de PPAR na célula. E os vários trabalhos na literatura mostram que os ácidos graxos são ligantes naturais dos receptores de PPAR $\gamma$  (186).

Extratos e frações de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC mostraram um efeito parcial agonista sobre PPAR $\gamma$ , que regula a sensibilidade à insulina. Quando comparados com a rosiglitazona, um agonista de PPAR completo que melhora a sensibilidade à insulina e diminui níveis de glicose em pacientes com diabetes tipo 2 e modelos animais, os extratos etanólicos de folhas dessa espécie foram capazes de ativar a transcrição de PPAR $\gamma$ , apresentando 34% da atividade apresentada pela rosiglitazona (controle positivo). Este resultado é muito interessante, uma vez que os agonistas parciais têm sido relacionados a um efeito menos prejudicial do que um agonista total, tal como a rosiglitazona e pioglitazona. Por exemplo, GQ-16 um agonista parcial de PPAR, melhora a sensibilidade à insulina e níveis de glicose de uma forma semelhante à rosiglitazona, sem aumentar o peso corporal e a retenção de líquidos, efeitos observados na terapia com rosiglitazona (187).

A literatura apresenta trabalhos que mostram que o extrato etanólico das folhas da espécie utilizada nesse trabalho possui atividade antidiabética em ratos (188, 189). Dessa forma, os resultados apresentados nesse trabalho, que descrevem a ativação do receptor de PPAR $\gamma$  pelos extratos etanólicos de *Bauhinia variegata* var. *variegata*, podem explicar o mecanismo envolvido na atividade hipoglicemiante relatadas anteriormente.

No estudo farmacognóstico realizado nos extratos etanólicos e frações das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC. foram detectadas classes de compostos já conhecidas no gênero *Bauhinia* (180), exceto alcaloides (190, 191). Em relação aos compostos identificados, relatos na literatura mostram atividades anti-inflamatória e antinociceptiva (compostos fenólicos e glicosídeos de sapogenina) e atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (triterpenos, lactonas e ácidos graxos de cadeia longa) (80, 192).

Os extratos foram testados quanto à sua capacidade antioxidante no ensaio de redução do fosfomolibdênio, e foi verificado que essas amostras apresentam alta capacidade antioxidante.

Prieto *et al.*(1999) mostraram que houve uma correlação entre o poder de redução das espécies testadas e a cinética da formação do complexo de coloração verde que ocorre com a redução do fosfomolibdênio. E compararam a capacidade do ácido ascórbico e BHT em promover a formação do complexo corado. Os autores descobriram que o BHT necessita de temperaturas mais elevadas para reduzir o fosfomolibdênio e promover a formação de um complexo verde, enquanto que o ácido ascórbico foi capaz de reduzir o fosfomolibdenio em baixas temperaturas. Os intervalos de linearidade para espécies redutoras podem variar de  $7 \times 10^{-5}$  a  $3 \times 10^{-4}$  para o ácido ascórbico e de  $2 \times 10^{-4}$  a  $2 \times 10^{-3}$  para o BHT, mostrando que o ácido ascórbico pode ter uma especificidade mais elevada para esse método do que o BHT corroborando com os resultados encontrados na Tabela 16 (193).

Compostos fenólicos, como flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, encontrados nas frutas e vegetais, têm tido bastante atenção por causa do sua atividade biológica potencial, incluindo anti-inflamatória, anticarcinogênica e atividade ateriosclerótica (49). Além disso, estudos epidemiológicos têm sugerido o efeito protetor da dieta com flavonoides contra doenças coronárias. A ingesta de flavonoides tem sido associada a efeitos de longo prazo sobre a mortalidade e é inversamente correlacionada com a mortalidade por doenças coronárias (194).

Os flavonoides são compostos bem conhecidos que atuam como antioxidantes. Flavonas e catequinas são descritas como as substâncias mais importantes dos flavonoides na defesa contra espécies reativas de oxigênio. As

células e diferentes tecidos são continuamente danificados por radicais livres e espécies de oxigênio, produzidos durante o metabolismo de oxigênio ou induzidas por processos de agressão (195).

Os mecanismos pelos quais os radicais livres danificam as funções celulares não estão completamente esclarecidos (182). Independente das atividades dos flavonoides antioxidantes, não foi encontrada uma correlação entre o teor flavonoídico do extrato etanólico das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC e o efeito antioxidante avaliado pela redução do fosfomolibdênio. A identificação futura dos flavonoides presentes nesse extrato poderá contribuir para melhor compreender este resultado.

Os flavonoides são capazes de impedir lesões promovidas por radicais livres, por meio da reação com esses compostos, estabilizando as espécies reativas de oxigênio em um radical menos reativo (196).

Foi realizado também um estudo que investigou a atividade tóxica das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata*. Os extratos e frações dessa planta foram utilizados para observar o efeito dessa espécie na germinação de *Lactuca sativa*. Os resultados indicaram que tanto o extrato etanólico quanto as frações hexânica e diclorometanólica diminuíram a germinação de alface. Na concentração de 4000 ppm, o extrato etanólico diminuiu em 50% a germinação das sementes e a fração diclorometanólica nessa concentração foi capaz de inibir totalmente a germinação. Porém esses resultados são bastante preliminares e necessitam de novos estudos para confirmação.

# CAPÍTULO 5: Conclusão

Com base nos resultados obtidos e nos relatos descritos na literatura, é possível concluir a respeito dos extratos aquosos e etanólicos e suas frações das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC que:

O extrato aquoso das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC (BvEA) possui atividade agonista no receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais Gama (PPAR $\gamma$ ). Esse pode ser o mecanismo que explica a atividade antidiabética promovida pelos extratos, bastante descrita na literatura, corroborando também a utilização dessas folhas em forma de chá, pela população para o controle do diabetes.

Essa atividade acontece de forma sazonal e parece estar correlacionada com dados meteorológicos do período de coleta, principalmente com índice pluviométrico, umidade do ar e tempo de exposição à insolação. Foi observado que a taxa de atividade no receptor tem melhores resultados para folhas coletadas em períodos de estiagem, baixa umidade do ar e maior período de insolação sofridos pela planta.

Na caracterização de BvEA, foi possível observar que existe uma variação significativa no teor de flavonoides e polifenóis nestes extratos, e essa variação também acontece de forma sazonal, porém, não está diretamente ligada a taxa de ativação no receptor de PPAR $\gamma$  e nem com as condições meteorológicas do período de coleta das folhas.

Também de forma sazonal, foi verificada a presença do derivados do flavonoide Rutina em BvEA pelo método de Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE-DAD), mas, a presença desse flavonoide em BvEA também não está relacionada à atividade desses extratos no receptor de PPAR $\gamma$ .

O fracionamento do extrato ativo em PPAR $\gamma$ , permitiu a observação da fração acetato de etila (FvAcEA) como ativa nesse receptor. Essa amostra foi fracionada em de Sephadex LH-20, fornecendo a fração semi-pura denominada Bv02. A identificação por Ressonância Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , permitiu a identificação do flavonoide Isoquercitrina como composto majoritário dessa amostra.

Porém, quando testada a isoquercitrina isolada (Sigma-Aldrich), não foi observada taxa de ativação no receptor, permitindo a conclusão de que esse

não é o composto responsável pela ativação em PPAR $\gamma$  promovida pelo extrato aquoso das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC.

O extrato etanólico também apresentou atividade no receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama. Os resultados indicaram que na concentração de 600  $\mu\text{g/mL}$ , o extrato foi capaz de ativar cerca de 34% do resultado que a rosiglitazona  $10^{-5}\text{M}$  (controle positivo) apresentou. Esse efeito tem bastante importância, uma vez que existe uma busca por compostos que ativem PPAR $\gamma$  sem, no entanto, causar os efeitos colaterais que os compostos existentes no mercado apresentam. E estudos vêm mostrando que agonistas parciais do receptor de PPAR $\gamma$ , têm apresentado a característica de ativar o receptor sem produzir os efeitos toxicológicos já conhecidos por outros ligantes utilizados no mercado.

Além disso, do extrato etanólico foram obtidas as frações hexânicas, diclorometanólica e hidrometanólica. Tanto extrato quanto frações foram submetidos a testes que avaliam o teor de polifenóis e flavonoides, testes antioxidantes e testes alelopáticos.

Os resultados indicaram que a fração diclorometanólica apresentou maior atividade antioxidante, em torno de  $300,7 \pm 27,8$  mg/g do ácido ascórbico,  $5.834,8 \pm 462,6$  mg/g do BHT e  $405,6 \pm 33,3$  mg/g da quercetina. Essa amostra também indicou um alto efeito alelopático reduzindo totalmente a germinação das sementes de *Lactuca sativa*.

# **CAPÍTULO 6 – Referências Bibliográficas**

1. Yadav R, Agarwala M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of phytology*. 2011;3(12):10-4.
2. Santos EB, Dantas GS, Santos HB, Diniz M, Sampaio FC. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19:321-4.
3. WHO. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. Geneve: World Health Organization; 2013.
4. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18(3):472-508.
5. Santos PV, Sebastiani R. Plantas medicinais utilizadas por uma comunidade universitária no Município de São Paulo, SP; Medicinal plants used for university students in São Paulo City, São Paulo State. *J Health Sci Inst*. 2011;29(1).
6. Corrêa APR, Rodrigues AG, Barbano DBA. Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. In: Saúde Md, editor. Brasília, DF2006.
7. Silva D. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela população rural no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí-Indaial-SC. *Revista Saúde e Ambiente*. 2010;10(2):54.
8. Carrazoni E. Plantas Medicinais de Uso Popular. Recife - PE: Pontifícia Universidade Católica; 2000.
9. Cardoso RL, Maboni F, Machado G, Alves SH, de Vargas AC. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase* positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Vet Microbiol*. 2010 May 19;142(3-4):432-4.
10. Ehrlich P, Wilson E. Biodiversity Studies: Science and Policy. *Science*. 1991;253:758-62.
11. Carvalho A. Plantas Medicinais e Fitoterápicos: regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil. Brasília - DF: Universidade de Brasília; 2011.
12. Castro A, Alvarenga A, Soares A, Young M, Purcino A. Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais em *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.: uma espécie medicinal do cerrado. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2005;7(3):45-55.
13. Carvalho APFd, Bustamante MMC, Kozovits AR, Asner GP. Variações sazonais nas concentrações de pigmentos e nutrientes em folhas de espécies de cerrado com diferentes estratégias fenológicas. *Revista Brasileira de Botânica*. 2007;30(1):19-27.
14. Meinzer F, Goldstein G, Franco A, Bustamante M, Iglar E, Jackson P, et al. Atmospheric and hydraulic limitations on transpiration in Brazilian cerrado woody species. *Functional Ecology*. 1999;13(2):273-82.
15. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. 2007;30(2):374.
16. Peixoto Sobrinho TJs, Cardoso Kd, Gomes TdL, Albuquerque UP, Amorim EL. Analysis of rainfall and edge-effects on flavonoid levels in *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., Fabaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009;19(3):740-5.
17. Yao L, Caffin N, D'arcy B, Jiang Y, Shi J, Singanusong R, et al. Seasonal variations of phenolic compounds in Australia-grown tea (*Camellia sinensis*). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(16):6477-83.
18. Machado H, Nagem TJ, Peters VM, Fonseca CS, Oliveira Ttd. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Bol Cent Biol Reprod*. 2008;26:37-44.
19. SILVA SLd. Modelagem molecular de derivados fenilpirazólicos e flavonóides inibidores da xantina oxidase. São Paulo - SP: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP; 2003.
20. Dewick PM. Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. LTD JWS, editor. England1997.

21. Alves ÂMP, Alves ÉPB, Buttow NC, Perles JVCM, Zanoni JN, Stabile SR. Aspectos gerais e abordagem terapêutica da quercetina sobre as complicações do diabetes causadas pelo estresse oxidativo; General aspects and therapeutic of quercetin on the complications of diabetes caused by oxidative stress. *Arq ciências saúde UNIPAR*. 2010;14(2).
22. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. 2004;24(10):851-74.
23. Bjeldanes L, Chang G. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science*. 1977;197(4303):577-8.
24. Dias AS. O antioxidante quercetina diminui o estresse oxidativo hepático em ratos diabéticos: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
25. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. *Pharmacological research*. 2005;51(2):117-23.
26. Coldiron AD, Sanders RA, Watkins JB. Effects of combined quercetin and coenzyme Q10 treatment on oxidative stress in normal and diabetic rats. *Journal of Biochemical and molecular Toxicology*. 2002;16(4):197-202.
27. Maciel R, Costa M, Martins D, França R, Schmatz R, Graça D, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of quercetin in functional and morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Research in Veterinary Science*. 2013;95(2):389-97.
28. Vessal M, Hemmati M, Vasei M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2003;135(3):357-64.
29. Mahmoud MF, Hassan NA, El Bassossy HM, Fahmy A. Quercetin Protects against Diabetes-Induced Exaggerated Vasoconstriction in Rats: Effect on Low Grade Inflammation. *PLoS one*. 2013;8(5):e63784.
30. Hussain S, Mahwi T, Aziz T. Quercetin Dampens Postprandial Hyperglycemia in Type 2 Diabetic Patients Challenged with Carbohydrates Load. *International Journal of Diabetes Research*. 2012;1(3):32-5.
31. Hussain SA, Ahmed ZA, Mahwi TO, Aziz TA. Effect of quercetin on postprandial glucose excursion after mono-and disaccharides challenge in normal and diabetic rats. *Journal of Diabetes Mellitus*. 2012;2:1, 82-87.
32. Dai X, Ding Y, Zhang Z, Cai X, Bao L, Li Y. Quercetin but not quercitrin ameliorates tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2013.
33. Eid H, Nachar A, Haddad P. The molecular basis of the antidiabetic activity of quercetin in skeletal muscle cells and hepatocytes in culture. *Planta medica*. 2012;78(11):PH2.
34. Dai X, Ding Y, Zhang Z, Cai X, Li Y. Quercetin and quercitrin protect against cytokine induced injuries in RINm5F  $\beta$ -cells via the mitochondrial pathway and NF- $\kappa$ B signaling. *International journal of molecular medicine*. 2013;31(1):265-71.
35. Jeong S-M, Kang M-J, Choi H-N, Kim J-H, Kim J-I. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. *Nutrition research and practice*. 2012;6(3):201-7.
36. Wein S, Schrader E, Rimbach G, Wolfram S. Oral Quercetin Supplementation Lowers Plasma sICAM-1 Concentrations in Female db/db Mice. *Pharmacology*. 2013;4.
37. Lee C-C, Hsu W-H, Shen S-R, Cheng Y-H, Wu S-C. *Fagopyrum tataricum* (buckwheat) improved high-glucose-induced insulin resistance in mouse hepatocytes and diabetes in fructose-rich diet-induced mice. *Experimental Diabetes Research*. 2012;2012:3-7.
38. Lai P-B, Zhang L, Yang L-Y. Quercetin ameliorates diabetic nephropathy by reducing the expressions of transforming growth factor- $\beta$ 1 and connective tissue growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Renal failure*. 2012;34(1):83-7.

39. Afshin Z, Behnam A, Arash K. Quercetin causes to decrease proximal tubules apoptotic cells in streptozotocin-induced diabetic rat. *Indonesian Journal of Pharmacy*. 2013;23(3).
40. Chougala MB, Bhaskar JJ, Rajan M, Salimath PV. Effect of curcumin and quercetin on lysosomal enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical Nutrition*, 31:5, 749-755. 2012.
41. Lopes CRP, Ferreira PEB, Zanoni JN, Alves AMP, Alves ÉPB, Buttow NC. Neuroprotective Effect of Quercetin on the Duodenum Enteric Nervous System of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 2012;57(12):3106-15.
42. Chen P, Chen J, Zheng Q, Chen W, Wang Y, Xu X. Pioglitazone, extract of compound Danshen dripping pill, and quercetin ameliorate diabetic nephropathy in diabetic rats. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2012.
43. Bournival J, Francoeur MA, Renaud J, Martinoli MG. Quercetin and sesamin protect neuronal PC12 cells from high-glucose-induced oxidation, nitrosative stress, and apoptosis. *Rejuvenation Research*. 2012;15(3):322-33.
44. Kandhare AD, Raygude KS, Shiva Kumar V, Rajmane AR, Visnagri A, Ghule AE, et al. Ameliorative effects quercetin against impaired motor nerve function, inflammatory mediators and apoptosis in neonatal streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. *Biomedicine & Aging Pathology*. 2012;2(4):173-86.
45. Sirovina D, Oršolić N, Končić M, Kovačević G, Benković V, Gregorović G. Quercetin vs chrysin Effect on liver histopathology in diabetic mice. *Human & experimental toxicology*. 2013;32(10):1056-66.
46. Bakhshaeshi M, Khaki A, Fathiazad F, Khaki AA, Ghadamkheir E. Anti-oxidative role of quercetin derived from *Allium cepa* on aldehyde oxidase (OX-LDL) and hepatocytes apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012;2(7):528-31.
47. Bakhshaeshi M, Khaki A, Fathiazad F, Imani S, Khaki AA, Ghadamkheir E. Modulating effects of quercetin on aldehyde oxidase (OX-LDL) and hepatocytes injury in Streptozotocin-induced diabetic rat. *Journal of Cell and Animal Biology*. 2012;6(3):41-5.
48. Camila Pereira B. Effects of Quercetin Administration on the Pregnancy Outcome of Diabetic Rats. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 3:2, 1-4. 2012.
49. Wang C, Pan Y, Zhang Q-Y, Wang F-M, Kong L-D. Quercetin and Allopurinol Ameliorate Kidney Injury in STZ-Treated Rats with Regulation of Renal NLRP3 Inflammasome Activation and Lipid Accumulation. *PloS One*. 2012;7(6):e38285.
50. Derakhshanian H. Quercetin improves postprandial hyperglycemia in rats treated with high-dose glucocorticoid, *Pharmacology Online*; 2, 93-97, Access: [http://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2012/vol2/PhOL\\_2012\\_2\\_A013\\_Javad.pdf](http://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2012/vol2/PhOL_2012_2_A013_Javad.pdf) em 02/01/2015
51. Seiva FR, Chuffa LGA, Pereira CB, Amorim JPA, Fernandes AAH. Quercetin ameliorates glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodium glutamate-induced metabolic alterations. *Food and Chemical Toxicology*. 2012.
52. Becho JRM, Machado H, de Oliveira Guerra M. Rutina-Estrutura, Metabolismo e Potencial Farmacológico. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies*. 2010;1(1).
53. Fernandes AAH, Novelli ELB, Okoshi K, Okoshi MP, Muzio BPD, Guimarães JFC, et al. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2010;64(3):214-9.
54. Kappel VD, Cazarolli LH, Pereira DF, Postal BG, Zamoner A, Reginatto FH, et al. Involvement of GLUT4 in the stimulatory effect of rutin on glucose uptake in rat soleus muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;65(8):1179-86.
55. Hunyadi A, Martins A, Hsieh T-J, Seres A, Zupkó I. Chlorogenic acid and rutin play a major role in the in vivo anti-diabetic activity of *Morus alba* leaf extract on type II diabetic rats. *PloS one*. 2012;7(11):e50619.

56. Sattanathan K, Dhanapal C, Umarani R, Manavalan R. Beneficial health effects of rutin supplementation in patients with diabetes mellitus. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011;1(08):227-31.
57. JADHAV R, PUCHCHAKAYALA G. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on Streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012;4(2):251-6.
58. Ahmed OM, Moneim AA, Yazid IA, Mahmoud AM. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects and the probable mechanisms of action of *Ruta graveolens* infusion and rutin in nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia Croatica*. 2010;39(1):15-35.
59. Jo S, Ka E, Lee H, Apostolidis E, Jang H, Kwon Y. Comparison of Antioxidant Potential and Rat intestinal  $\alpha$ -Glucosidases inhibitory Activities of Quercetin, Rutin, and Isoquercetin. *International Journal of Applied Research in Natural Products*. 2009;2(4):52-60.
60. Kamalakkannan N, Alnumair KS. Rutin alters fatty acid composition in diabetic tissues. *Nutrition & Food Science*. 2009;39(6):655-62.
61. Hao H-h, Shao Z-m, Tang D-q, Lu Q, Chen X, Yin X-x, et al. Preventive effects of rutin on the development of experimental diabetic nephropathy in rats. *Life Sciences*, 91:19-20, 959-967. 2012.
62. Golwala D, Patel L. Pharmacognostical studies of *Bauhinia variegata* linn root. *Journal of Young Pharmacists*. 2009;1(1):36.
63. Pinto L, Neto M, Bacarin M, Castellón R, Gadelha T, Gadelha C, et al. Chemical and biochemical characterization of *Bauhinia variegata* L. seeds. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 2005;9(3):385-90.
64. Lorenzi H, editor. *Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas*. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda; 2008.
65. Lusa M, Bona C. Análise morfoanatômica comparativa da folha de *Bauhinia forficata* Link e *B. variegata* Linn. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Acta bot bras*. 2009;23(1):196-211.
66. Costa M. Efeito do Extrato de *Bauhinia variegata* sobre a Atividade Transcricional Mediada pelo Receptor dos Proliferadores Peroxissomais-gama (PPAR $\gamma$ ). Brasília: Universidade de Brasília; 2005.
67. Menezes F, Minto A, Ruela H. Atividade hipoglicemiante de duas espécies de *Bauhinia* brasileira: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. *Rev bras farmacogn*. 2007;17(1):8-13.
68. De Los Ríos CG, H; Hidalgo Báez, D. Efecto inhibitorio de *Bauhinia variegata* L. sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina / Inhibitory effect of *Bauhinia variegata* L. on hemoglobin nonenzymatic glycation. *Rev Fac Farm (Merida)*. 2003;45(2).
69. Ojezele M, Abatan O. Hypoglycaemic and coronary risk index lowering effects of *Bauhinia thoningii* in alloxan induced diabetic rats. *African Health Sciences*. 2011;11(1).
70. Curcio S, Stefan L, Randi BA, Dias MA, da Silva RE, Caldeira EJ. Hypoglycemic effects of an aqueous extract of *Bauhinia forficata* on the salivary glands of diabetic mice. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;25(3):493.
71. Da Cunha A, Menon S, Menon R, Couto A, Bürger C, Biavatti M. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. *Phytomedicine*. 2010;17(1):37-41.
72. Manivannan R. Anti-hyperglycemic and anti-lipidemic activity of ethanolic extract of *Bauhinia tomentosa* (linn) flower in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Global Pharma Technology*. 2010;2(3).
73. Jatwa R, Kar A. Amelioration of metformin-induced hypothyroidism by *Withania somnifera* and *Bauhinia purpurea* extracts in Type 2 diabetic mice. *Phytotherapy Research*. 2009;23(8):1140-5.
74. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytotherapy Research*. 2008 Jul;22(7):957-62.

75. Zhao YC, C; Cai, B; Han, B; Sun, Q. . Study on the constituents with anticancer activities of alkaloids from *Bauhinia variegata* L. Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi 2004;14(3):169-71.
76. Zhao Y, Cui C-b, Cai B, Sun Q. Chemical constituents from *Bauhinia variegata* L. Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi 2005;15(5).
77. Yadava RN, Reddy VM. Anti-inflammatory activity of a novel flavonol glycoside from the *Bauhinia variegata* Linn. Nat Prod Res. 2003a Jun;17(3):165-9.
78. Reddy MV, Reddy MK, Gunasekar D, Caux C, Bodo B. A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. Phytochemistry. 2003 Oct;64(4):879-82.
79. Mak C, Cheung K, Yip P, Kwan H. Molecular evidence for the hybrid origin of *Bauhinia blakeana* (Caesalpinioideae). Journal of Integrative Plant Biology. 2008;50(1):111-8.
80. Jain R, Nagpal S. Chemical and biological evaluation of *Bauhinia* species. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences. 2004;26(1):48-50.
81. Zhao YY, Cui CB, Cai B, Han B, Sun QS. A new phenanthraquinone from the stems of *Bauhinia variegata* L. J Asian Nat Prod Res. 2005 Dec;7(6):835-8.
82. Mohamed M, Mammoud M, Hayen H. Evaluation of Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of a New Triterpene Saponin from *Bauhinia variegata* Leaves. Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of Biosciences. 2009;64(11-12):798.
83. Maheswara M, Rao YK, Siddaiah V, Rao CV. Isolation of new chalcone from the leaves of *Bauhinia variegata*. Asian Journal of Chemistry 2006;18(1):419-22.
84. El-Dondaity S, Mahdy M, El-Hamouly M, Ammar H. Chemical and/or biological studies of *Bauhinia variegata* L. and *Cleome droserifolia* (Forssk.) Del. growing in Egypt. Egyptian Journal of Biomedical Sciences. 2005;19:181-203.
85. Saha S, Subrahmanyam E, Kodangala C, Shastry SC. Isolation and characterization of triterpenoids and fatty acid ester of triterpenoid from leaves of *Bauhinia variegata*. Der Pharma Chemica. 2011;3(4):28-37.
86. Silva JA, Damico DC, Baldasso PA, Mattioli MA, Winck FV, Fraceto LF, et al. Isolation and biochemical characterization of a galactoside binding lectin from *Bauhinia variegata* candida (Bvcl) seeds. Protein J. 2007 Apr;26(3):193-201.
87. Lin P, Ng T. Preparation and biological properties of a melibiose binding lectin from *Bauhinia variegata* seeds. Journal of agricultural and food chemistry. 2008;56(22):10481-6.
88. Neto LGN, Pinto LS, Bastos RM, Evaristo FFV, Vasconcelos MA, Carneiro VA, et al. Effect of the Lectin of *Bauhinia variegata* and Its Recombinant Isoform on Surgically Induced Skin Wounds in a Murine Model. Molecules. 2011;16(11):9298-315.
89. Bodakhe SH, Ram A. Hepatoprotective properties of *Bauhinia variegata* bark extract. Yakugaku Zasshi. 2007. 127(9):1503-7.
90. Manoj AF, Kumar A, Yunus S. Screening of hepatoprotective activity of Ethanolic extract of stem bark of *Bauhinia variegata* in rats. Int J Pharm Pharm Sci. 2013;5:624-8.
91. Ghaisas M, Shaikh S, Deshpande A. Evaluation of the immunomodulatory activity of ethanolic extract of the stem bark of *Bauhinia variegata* Linn. International Journal of Green Pharmacy. 2010;3(1):70.
92. Agrawal R, Pandey S. Evaluation of Anticarcinogenic and Antimutagenic Potential of *Bauhinia variegata* Extract in Swiss Albino Mice. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2009;10:913-6.
93. Rajani G, Ashok P. In vitro antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. Indian J. Pharmacology. 2009. 41(5)227-232.
94. Pandey S, Agrawal R, Maheshwari S. In-Vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *Bauhinia Variegata* Linn. International Journal of Scientific and Research Publications. 2012:83.
95. Sharma N, Bhardwaj R, Kumar S, Kaur S. Evaluation of *Bauhinia variegata* L. bark fractions for in vitro antioxidant potential and protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage to pBR322 DNA. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011;5(12):1494-500.

96. Sharma R, Rajani G, Mandal S, Gupta N. In-vitro antioxidant and protective effect of *Bauhinia variegata* linn on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. International Journal. 2011;2.
97. Sharma RK, Rajani G, Sharma V, Komala N. Effect of Ethanolic and Aqueous Extracts of *Bauhinia Variegata* Linn. on Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. Ind J Pharm Edu Res. 2011;45(2):192.
98. Pani SR, Mishra S, Sahoo S, Panda PK. Nephroprotective effect of *Bauhinia variegata* (linn.) whole stem extract against cisplatin-induced nephropathy in rats. Indian Journal of Pharmacology. 2011;43(2):200.
99. Kumar D, Parcha V, Maithani A, Dhulia I. Effect and evaluation of antihyperlipidemic activity of fractions of total metha-nol extract of *Bauhinia variegata* (Linn.) leaves on Triton WR-1339 (Tyloxapol) induced hyperlipidemic rats. International Journal of Research in Pharmaceutical Science. 2011;2(4).
100. Mishra A, Sharma AK, Kumar S, Saxena AK, Pandey AK. *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. BioMed Research International. 2013;2013.
101. Parekh J, Chanda S. Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. African Journal of Biomedical Research. 2010;10(2).
102. Sharma A, Verma R, Ramteke P. Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants Used by Tribals Against Uti Causing Pathogens. World Applied Sciences Journal. 2009;7(3):332-9.
103. Singh KL, Singh D, Singh VK. Characterization of the molluscicidal activity of *Bauhinia variegata* and *Mimusops elengi* plant extracts against the Fasciola vector *Lymnaea acuminata*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 2012;54(3):135-40.
104. Gunalan G, Saraswathy A, Krishnamurthy V. Antimicrobial Activity Of Medicinal Plant *Bauhinia variegata* Linn. Int J Pharm Biological Sci. 2011;1(4):400-8.
105. Pahwa S, Mazumder R, Bhattacharya S. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of different parts of *auhinia variegata* Linn. Evaluation. 2011;3(4):1971-7.
106. Azevedo CR, Maciel FM, Silva LB, Ferreira AT, da Cunha M, Machado OL, et al. Isolation and intracellular localization of insulin-like proteins from leaves of *Bauhinia variegata*. Braz J Med Biol Res. 2006 Nov;39(11):1435-44.
107. Kumar P, Baraiya S, Gaidhani S, Gupta M, Wanjari MM. Antidiabetic activity of stem bark of *Bauhinia variegata* in alloxan-induced hyperglycemic rats. Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics. 2012;3(1):64.
108. Khot P, Agrawal S, Patole A, Tundulwar M, Tenpe C, Rathod S. Antidiabetic and antioxidant effect of ethanol extract of *Bauhinia variegata* leaves in streptozotocin induced diabetic rats. Inventi Rapid: Ethnopharmacology. 2012.
109. Frankish N, Sousa M, Mills C, Sheridan H. Enhancement of Insulin Release from the beta-Cell Line INS-1 by an Ethanolic Extract of *Bauhinia variegata* and Its Major Constituent Roseoside. Planta medica. 2010;76(10):995-7.
110. Balakrishnan SK, Bhat KI. Apoptosis and flowcymetric studies of *Bauhinia variegata* bark extract. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2014;7(1).
111. Saha S, Subrahmanyam E, Chandrashekar K, Shastry SC. In Vivo Study for Anti-inflammatory Activity of *Bauhinia variegata* L. Leaves. Pharmaceutical Crops. 2011;2:70-3.
112. Kumar YR, Rajani G. Extracts of Root of *Bauhinia variegata* Linn. International Journal of Pharmacology. 2011;7(5):616-22.
113. Martini N, Katerere D, Eloff J. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum*(Combretaceae). Journal of Ethnopharmacology. 2004;93(2):207-12.
114. Bodakhe SH, Ram A, Verma S, Pandey DP. Anticataract activity of rhamnocitrin isolated from *Bauhinia variegata* stem bark. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine. 2012:1-6.

115. Sharma RK, Sharma AK, Mohan G. Evaluation of Cardioprotective Activity of Aqueous and Ethanolic Extract of *Bauhinia Variegata* in Cacl2 Induced Arrhythmia in Albino Rats. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2013;3(7):169-73.
116. Klafke GB, Borsuk S, Gonçalves RA, Arruda FVS, Carneiro VA, Teixeira EH, et al. Inhibition of initial adhesion of oral bacteria through a lectin from *Bauhinia variegata* L. var. *variegata* expressed in *Escherichia coli*. Journal of applied microbiology. 2013;115(5):1222-30.
117. Araújo APU, Hansen D, Vieira DF, Oliveira Cd, Santana LA, Beltramini LM, et al. Kunitz-type *Bauhinia bauhinoides* inhibitors devoid of disulfide bridges: isolation of the cDNAs, heterologous expression and structural studies. Biological chemistry. 2005;386(6):561-8.
118. de Souza AF, Torquato RJ, Tanaka AS, Sampaio CA. Cloning, expression and characterization of *Bauhinia variegata* trypsin inhibitor BvTI. Biol Chem. 2005 Nov;386(11):1185-9.
119. Di Ciero L, Oliva ML, Torquato R, Köhler P, Weder JK, Novello JC, et al. The complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from *Bauhinia variegata* var. *candida* seeds. Journal of Protein Chemistry. 1998;17(8):827-34.
120. Fang EF, Wong JH, Bah CS, Lin P, Tsao SW, Ng TB. *Bauhinia variegata* var. *variegata* trypsin inhibitor: from isolation to potential medicinal applications. Biochem Biophys Res Commun. 2010. 396(4):806-11.
121. Fang EF, Wong JH, Bah CSF, Lin P, Tsao SW, Ng TB. *Bauhinia variegata* var. *variegata* trypsin inhibitor: From isolation to potential medicinal applications. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2010;396(4):806-11.
122. Mitri J, Muraru M, Pittas A. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. European Journal of Clinical Nutrition. 2011;65(9):1005-15.
123. Mohan V. Predicting type 2 diabetes mellitus and insulin resistance. International Journal of Diabetes in Developing Countries. 2012:1-3.
124. Fernandes APM, Pace AE, Zanetti ML, Foss MC, Donadi EA. Fatores imunogenéticos associados ao diabetes mellitus do tipo 1. Rev Latino-Am Enfermagem [online]. 2005;13(5):743-9.
125. Moreira D, Pais IP, Rebimbas S, Barbosa L, Rodrigues L, Costa C, et al. Diabetes Mellitus tipo 1 e hepatite autoimune como forma de apresentação precoce da síndrome poliglandular autoimune tipo II. Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. 2012;7(2):13-7.
126. Chawla A, Repa J, Evans R, Mangelsdorf D. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. Science. 2001;294(5548):1866.
127. Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Patel N, Di Paola R, et al. Rosiglitazone and 15-deoxy- 12, 14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor- (PPAR- ), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut. British journal of pharmacology. 2009;140(2):366-76.
128. Tavares V, Hirata M, Hirata RC. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR $\gamma$ ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. Arq Bras Endocrinol Metab. 2007;51(4):526-33.
129. Kota B, Huang T, Roufogalis B. An overview on biological mechanisms of PPARs. Pharmacological Research. 2005;51(2):85-94.
130. Shearer B, Billin A. The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them? Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2007;1771(8):1082-93.
131. Handschin C, Meyer U. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. Pharmacological reviews. 2003;55(4):649.
132. Sonoda J, Pei L, Evans R. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. FEBS letters. 2008;582(1):2-9.

133. Tavares V, Hirata M, Hirata R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2007;51:526-33.
134. Moras D. Structure of full-length PPARgamma-RXRalpha: a snapshot of a functional complex. *Cell Metabolism*. 2009;9(1):8-10.
135. Gonzalez F, Shah Y. PPAR [alpha]: Mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Toxicology*. 2008;246(1):2-8.
136. Rosenfeld M, Lunyak V, Glass C. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes & development*. 2006;20(11):1405.
137. Amato AA. Investigação da atividade farmacológica de Benzilideno-e-acridilidenediozotiazolidinedionas e isoflavonas nos receptores alfa, beta/delta e gama ativados por proliferadores peroxissomais. Brasília-DF: Universidade de Brasília; 2008.
138. Ricote M, Glass C. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2007;1771(8):926-35.
139. Glass C, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2005;6(1):44-55.
140. Bishop-Bailey D, Bystrom J. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-[beta]/[delta] in inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2009.
141. Pereira V. Atividade agonista do extrato de *Tabebuia heptaphylla* sobre os receptores proliferadores peroxissomais Alfa (PPAR  $\alpha$ ), Beta/Delta (PPAR  $\beta/d$ ) e Gama (PPAR  $\gamma$ ). Brasília/DF: Universidade de Brasília; 2008.
142. Cuzzocrea S. Peroxisome proliferator-activated receptors and acute lung injury. *Current opinion in pharmacology*. 2006;6(3):263-70.
143. Van der Meer D, Degenhardt T, Vaisanen S, de Groot P, Heinaniemi M, de Vries S, et al. Profiling of promoter occupancy by PPAR {alpha} in human hepatoma cells via ChIP-chip analysis. *Nucleic Acids Research*. 2010.
144. Moraes L, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006;110(3):371-85.
145. Stienstra R, Duval C, M ller M, Kersten S. PPARs, obesity, and inflammation. *PPAR Res*. 2007;95974:2007.
146. Rinke S, Caroline D, Michael M. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Research*. 2006;2007:1-10.
147. Berry D, Noy N. Is PPAR[beta]/[delta] a Retinoid Receptor?. *PPAR Research*. 2007;2007.
148. Peters J, Gonzalez F. Sorting out the functional role (s) of peroxisome proliferator-activated receptor-[beta]/[delta](PPAR [beta]/[delta]) in cell proliferation and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2009.
149. Leibowitz M, Fi vet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Berger J, et al. Activation of PPAR [delta] alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS letters*. 2000;473(3):333-6.
150. Lee C, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong L, Olefsky J, et al. PPAR regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(9):3444.
151. Inzucchi S, Leiter L, Rosenstock J. Diabetes de Tipo 2 y las TZD (Tiazolidinedionas) Fritz 9.24. 09. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009;94(11).
152. Araújo L, Britto M, Porto da Cruz T. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2000;44:509-18.
153. Vaz AMSF, Tozzi AMGA. Synopsis of *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) DC.(Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) in Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*. 2005;28(3):477-91.
154. Durigan G, Figliolia MB, Kawabata M, Garrido MAO, Baitello JB. Sementes e mudas de árvores tropicais. São Paulo: Páginas e letras; 1997.

155. Tropicos. Missouri Botanical Garden, Saint Louis, Missouri. . 2011 [cited 2012 8 de agosto]; Available from: <http://www.tropicos.org>.
156. Wagner H, Blatt S, *et al*. Plant drug analysis. Berlim: Springer Verlag.1984.
157. Roque L. Métodos Inferenciais para o Coeficiente de correlação  $\rho$ . Portugal: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2003.
158. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E\* 1. Analytical biochemistry. 1999;269(2):337-41.
159. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chemistry. 2004;84(3):329-39.
160. Ferreira A, Borguetti F. Germinação do Básico ao Aplicado. Porto Alegre - RS: artmed; 2004.
161. Bauer L. Estimação do coeficiente de correlação de spearman ponderado. Porto Alegre - RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. ; 2007.
162. Bora K, Miguel OG, Andrade CA, Oliveira AOT. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial. Visão Acadêmica. 2006;6(2).
163. Marcucci MC, Woisky RG, SALATINO A. Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. Mensagem Doce. 1998;46:3-8.
164. Christensen K, Minet A, Svenstrup H, Grevsen K, Zhang H, Schrader E, et al. Identification of plant extracts with potential antidiabetic properties: effect on human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), adipocyte differentiation and insulin-stimulated glucose uptake. Phytotherapy Research. 2009;23(9):1316-25.
165. Ding L, Jin D, Chen X. Luteolin enhances insulin sensitivity via activation of PPAR [gamma] transcriptional activity in adipocytes. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2009;21(10):941-7.
166. Salam NK, Huang THW, Kota BP, Kim MS, Li Y, Hibbs DE. Novel PPAR-gamma agonists identified from a natural product library: a virtual screening, induced-fit docking and biological assay study. Chemical biology & drug design. 2008;71(1):57-70.
167. Ibrahim M, Alaam M, El-Haes H, Jalbout AF, Leon A. Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. Eletica quimica. 2006;31(3):15-21.
168. Cazor A, Deborde C, Moing A, Rolin D, This H. Sucrose, Glucose, and Fructose Extraction in Aqueous Carrot Root Extracts Prepared at Different Temperatures by Means of Direct NMR Measurements. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006/06/01;54(13):4681-6.
169. Perlin AS, Casu B. Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-13C. Tetrahedron Letters. 1969;10(34):2921-4.
170. Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. Phytochemistry. 1992;31(10):3307-30.
171. Guvenalp Z, Demirezer LO. Flavonol glycosides from *Asperula arvensis* L. Turk J Chem. 2005;29:163-9.
172. Rosa EAd, Silva BC, Silva FMd, Tanaka C, Peralta RM, Oliveira C, et al. Flavonoids and antioxidant activity in *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2010;20(4):484-8.
173. Silverstein R, Bassler C, Morrill T. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6, editor. Rio de Janeiro: Nova Guanabara; 2000.
174. Silvério F, Luiz C, Gonmide J, Reis F, Piló-veloso D. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. Revista Árvore. 2006;30(6).
175. Bascetta E, Gunstone FD. 13C Chemical shifts of long-chain epoxides, alcohols and hydroperoxides. Chemistry and Physics of Lipids. 1985 1//;36(3):253-61.
176. Balestrin L, Dias J, Miguel O, Dall' Stella D, Miguel M. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2008;18(2):230-5.

177. Pires M, Prates H, Pereira-Filho I, Oliveira -Junior R, Faria T. Atividade Alelopática da *Leucena* sobre espécies de plantas daninhas Scientia Agricola. 2001;58(1):61-5.
178. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. Annual review of medicine. 2002;53(1):409-35.
179. Fang X-K, Gao J, Zhu D-N. Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. Life sciences. 2008;82(11):615-22.
180. Puhl AC, Bernardes A, Silveira RL, Yuan J, Campos JL, Saidemberg DM, et al. Mode of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation by luteolin. Molecular pharmacology. 2012;81(6):788-99.
181. Németh K, Plumb GW, Berrin J-G, Juge N, Jacob R, Naim HY, et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell  $\beta$ -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. European Journal of Nutrition. 2003;42(1):29-42.
182. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2002;13(10):572-84.
183. Chen Z, Zheng S, Li L, Jiang H. Metabolism of flavonoids in human: a comprehensive review. Current Drug Metabolism. 2014;15(1):48-61.
184. Xie L-W, Atanasov AG, Guo D-A, Malainer C, Zhang J-X, Zehl M, et al. Activity-guided isolation of NF- $\kappa$ B inhibitors and PPAR $\gamma$  agonists from the root bark of *Lycium chinense* Miller. Journal of Ethnopharmacology. 2014;152(3):470-7.
185. Petersen RK, Christensen KB, Assimopoulou AN, Fretté X, Papageorgiou VP, Kristiansen K, et al. Pharmacophore-driven identification of PPAR $\gamma$  agonists from natural sources. Journal of computer-aided molecular design. 2011;25(2):107-16.
186. Hihi A, Michalik L, Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 2002;59(5):790-8.
187. Amato AA, Rajagopalan S, Lin JZ, Carvalho BM, Figueira AC, Lu J, et al. GQ-16, a novel peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ligand, promotes insulin sensitization without weight gain. Journal of Biological Chemistry. 2012;287(33):28169-79.
188. Lino CdS, Diógenes JPL, Pereira BA, Faria RAPG, Andrade Neto M, Alves RS, et al. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2004;27(1):125-7.
189. Silva FR, Szpoganicz B, Pizzolatti MG, Willrich MA, de Sousa E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol. 2002 Nov;83(1-2):33-7.
190. Negi A, Sharma N, Singh MF. Spectrum of Pharmacological Activities from *Bauhinia variegata*: A Review Journal of Pharmacy Research. 2012;5(2):792-7.
191. Pinheiro EAA, Carvalho JM, dos Santos DCP, Feitosa AdO, Marinho PSB, Guilhon GMSP, et al. Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. Natural Product Research. 2013;27(18):1633-8.
192. Mohamed MA, Mammoud MR, Hayen H. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of a new triterpene saponin from *Bauhinia variegata* leaves. Zeitschrift für Naturforschung C, A Journal of Biosciences. 2009;19(11):798.
193. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical biochemistry. 1999;269(2):337-41.
194. Tangney CC, Rasmussen HE. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. Current atherosclerosis reports. 2013;15(5):1-10.

195. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001;74(4):418-25.
196. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011;82(4):513-23.