



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020020194-8 A2



(22) Data do Depósito: 01/10/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 12/04/2022

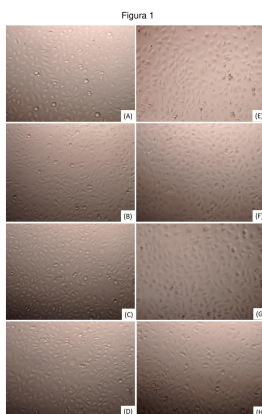
(54) **Título:** EXTRATO, PROCESSO DE EXTRAÇÃO, USO DO EXTRATO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/185; A61P 3/10; A61K 127/00; A61K 133/00.

(71) **Depositante(es):** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS.

(72) **Inventor(es):** GABRIELA CHILANTI; MIRIAN SALVADOR; CATIA DOS SANTOS BRANCO; MATHEUS PARMEGIANI JAHN; GIOVANA RECH; ALINE ZANETTI DOS SANTOS; SIMONE HICKMANN FLÔRES.

(57) **Resumo:** EXTRATO, PROCESSO DE EXTRAÇÃO, USO DO EXTRATO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. A presente invenção descreve a utilização do extrato de Begônia para a produção de medicamentos para o tratamento de condições hiperglicêmicas e como regulador de estresse oxidativo, mais especificamente para o tratamento de Diabetes Mellitus. Especificamente, a presente invenção compreende o uso da flor e/ou folha de Begonia semperflorens. A presente invenção se situa nos campos da Farmácia, Medicina e Bioquímica.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

EXTRATO, PROCESSO DE EXTRAÇÃO, USO DO EXTRATO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção trata-se da utilização do extrato de Begônia para a produção de medicamentos para o tratamento de condições hiperglicêmicas e como regulador de estresse oxidativo, mais especificamente para o tratamento de Diabetes Mellitus. O invento se situa no campo da Farmácia, Medicina e Bioquímica.

Antecedentes da Invenção

[0002] Atualmente, no mercado, há uma grande demanda pelos produtos derivados de plantas, tais como chás florais, decocção de ervas e flores, corantes alimentícios, aromas, bebidas, produtos de panificação, formulação de medicamentos e *in natura*. Nestes produtos podemos encontrar partes aéreas da planta, sementes, frutas, raízes e flores usadas em diversas aplicações comerciais, como chá, preparações gastronômicas, extratos e óleos essenciais (Voon *et al.*, 2012). Flor comestível são as flores inócuas e não tóxicas que fornecem nutrientes e apresentam benefícios à saúde humana quando consumidos (Alasalvar *et al.*, 2013; Lara-Cortés *et al.*, 2013). Há séculos as flores vêm desempenhando papel importante na alimentação humana, estas têm sido usadas na dieta humana desde 2000 anos atrás.

[0003] Antes do ano de 2000, pesquisas sobre flores comestíveis concentravam-se principalmente nos nutrientes, fragrância e óleos voláteis (Awad, 2000; Bouic, 2001). No entanto, estudos recentes estão focando maior atenção aos fitoquímicos, os principais compostos bioativos das flores comestíveis. Entre as atividades biológicas relatadas das flores comestíveis pode-se destacar a atividade antioxidante (Xiong, 2014), anti-inflamatória (Kang, 2010; Su, 2012), anti-tumoral (Lo, 2007; Chang, 2005), anti-obesidade

(Lo, 2007; Chang, 2005; Hou, 2005), efeito neuroprotetor (Lin, 2010), efeito de prevenção de lesões viscerais (Phani Kumar, 2014), atividade anti-colesterolemica (Wang, 2011; Oppliger, 2012), anti-diabética (Peng, 2011) e anti-convulsivo (Kasture, 2000).

[0004] A begônia é nativa de climas tropicais e subtropicais, ocorrendo em uma variedade de habitats, mas principalmente em florestas úmidas e sombrias, e são encontradas principalmente na Ásia, América e África (Clement *et al.* 2004; Hilinske, 2016). América do Sul e Ásia têm a mais rica diversidade de begônias, com muitas espécies novas ainda sendo descritas (Chen *et al.* 2018, Camfield e Hughes 2018).

[0005] O potencial medicinal de *Begonia sp.* foi avaliado em diferentes partes do mundo para o tratamento de várias doenças. Esse interesse é devido, principalmente, aos fitonutrientes presentes na planta, em especial os polifenóis. Diferentes partes da planta (folha, haste, raiz e flores) são empregados na medicina popular, principalmente como infusões ou tinturas. Em relação ao uso empírico da *Begonia sp.*, existem alguns relatos sobre o seu uso: realizado pela Entomology Research Institute, Chennai (Índia) mostrou que os caules da *Begonia malabarica* Lam. (Begoniaceae) foi utilizada para o tratamento da diabetes pela tribo Malasar, no distrito de Coimbatore (Pandikumar *et al.*, 2007). Um tradicional curandeiro de Khamptis “Chau ya” em Arunachal Himalaya, nordeste da Índia recomenda que um extrato de suco fresco da *Begonia roxburghii* (Miq.) DC deve ser diretamente consumido por via oral duas vezes por dia, durante o período de 15 a 20 dias para o tratamento do diabetes mellitus (Tag *et al.*, 2012).

[0006] Os polifenóis são produtos naturais largamente distribuídos em frutas e vegetais e são, portanto, parte integrante da dieta humana. Esses compostos são conhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas, dentre elas atividade antioxidante. Além disso, estudos recentes têm demonstrado que esses compostos podem ser úteis tanto na prevenção quanto no controle do diabetes (Bahadoran *et al.*, 2013).

[0007] Evidências sugerem que a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres está envolvida na fisiopatologia do diabetes. De fato, a hiperglicemia gera ERO, que por sua vez causam danos às células, levando a um estado de estresse oxidativo que, em última análise, resulta em complicações secundárias do diabetes mellitus (Blake et al, 2013). Além disso, estudos têm demonstrado a presença de disfunção mitocondrial como um processo acelerador da resistência à insulina através da superprodução de ERO. Embora existam, ainda, poucos estudos, aparentemente alguns polifenóis, incluindo o canferol, a quercetina e a cianidina-3-O-glicosídeo, são capazes de interagir com os complexos transportadores de elétrons mitocondriais, e, assim, reduzir os danos oxidativos (Suematsu *et al.*, 2011; Min *et al.*, 2011; Filomeni et al., 2012).

[0008] Apesar dos estudos já realizados, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais esses compostos interagem com a cadeia de transporte de elétrons e a sua relação com a fisiopatologia da diabetes. Desta forma, considerando este contexto, o estudo de seu efeito/mecanismo antioxidante e capacidade de evitar a hiperglicemia e suas consequências pode contribuir para o entendimento do mecanismo de ação destes compostos, podendo colaborar para a definição de novas estratégias terapêuticas para o tratamento dessa doença e de suas comorbidades.

[0009] O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença de importância crescente em saúde pública. Complicações associadas a DM comprometem a produtividade a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos, além disso, acarreta altos custos para seu controle metabólico e tratamento das complicações, o que traduz o impacto socioeconômico (Fuchs *et al.*, 2010).

[0010] Alimentos funcionais e dietas ricas em nutrientes benéficos têm mostrado eficácia na redução dos níveis de glicemia plasmática e controle do diabetes (Yang *et al.*, 2008). Uma ampla gama de estudos tem suportado o potencial dos compostos fenólicos para proteger contra os efeitos prejudiciais associados ao DM (Bahadoran *et al.*, 2013). Sua atividade antidiabética tem

sido demonstrada por sua capacidade de: i) regulação do metabolismo de carboidratos; ii) a melhoria da captação de glicose; iii) proteção das células beta pancreáticas; iv) reforço da ação da insulina e v) a regulação de vias de sinalização importantes para a homeostase celular (Bahadoran *et al.*, 2013). Estudos têm demonstrado a capacidade desses compostos como, por exemplo, o canferol, a quercetina e a cianidina-3-O-glicosídeo, em restaurar a função mitocondrial, evitando o desenvolvimento do estresse oxidativo e a morte celular (Suematsu *et al.*, 2011; Min *et al.*, 2011; Filomeni *et al.*, 2012). Apesar disso, os mecanismos subjacentes à interação dos polifenóis com a mitocôndria e os seus consequentes efeitos benéficos relacionados ao diabetes permanecem por ser elucidados.

[0011] O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica grave, de etiologia múltipla, caracterizada por um elevado nível de glicose no sangue (hiperglicemia), alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, resultantes de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou ambas (Blake *et al.*, 2013).

[0012] O estresse oxidativo causado pela hiperglicemia é um fator importante presente no DM (Pitocco *et al.*, 2013). Tecidos não sensíveis à insulina, tais como o rim, o sistema nervoso e o endotélio vascular estão constantemente expostos aos altos níveis de glicose e, portanto, são mais susceptíveis ao dano oxidativo (Blake *et al.*, 2013).

[0013] A formação de radicais livres no DM leva a danos a enzimas, a maquinaria celular e também o aumento da resistência à insulina devido ao estresse oxidativo. Além disso, acredita-se que as ERO têm um papel importante no início e progressão das complicações tardias do DM, devido à sua capacidade de danificar lipídios, proteínas e DNA. (Blake *et al.*, 2013).

[0014] Compostos fenólicos são metabólitos secundários encontrados em plantas que têm sido amplamente estudados em virtude das suas possíveis atividades biológicas e têm chamado atenção como possíveis agentes na prevenção e tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer, as doenças

neurodegenerativas e também o diabetes (Bahadoran et al., 2013; Li et al., 2014).

[0015] Uma ampla gama de estudos tem suportado o potencial dos compostos fenólicos para proteger contra os efeitos prejudiciais associados ao DM (Asgar, 2013; Bahadoran et al., 2013; Suganya et al., 2016). Entretanto, não existem estudos sobre atividade hipoglicemiante e reguladora de estresse oxidativo e de função mitocondrial utilizando a *Begonia semperflorens*. Desta forma, a caracterização, o estudo dos compostos fenólicos e seus efeitos/mecanismos antioxidantes e capacidade de minimizar as consequências da hiperglicemia podem colaborar para a definição de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da DM, melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

[0016] Assim, a presente invenção busca apresentar o potencial terapêutico de medicamentos utilizando extrato de begônias para pacientes com Diabetes Mellitus.

Sumário da Invenção

[0017] Em um primeiro objeto a presente invenção apresenta o extrato de Begônia para o tratamento de Diabetes Mellitus.

[0018] Em um segundo objeto a presente invenção apresenta o processo de extração a partir da flor vermelha e/ou a folha da Begônia.

[0019] Em um terceiro objeto a presente invenção apresenta o uso do extrato de Begônia, para preparar um medicamento para tratar a Diabetes Mellitus.

[0020] Em um quarto objeto a presente invenção apresenta a composição farmacêutica, que compreende um extrato obtido a partir de Begônia.

[0021] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e serão descritos detalhadamente a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0022] São apresentadas as seguintes figuras:

[0023] A Figura 1 mostra a avaliação da morfologia das células EA.hy926

tratadas com extrato de flor de Begônia na presença ou ausência de alta concentração de glicose por 24 h. (A) controle; (B) 1µg/mL; (C) 10 µg/mL; (D) 100 µg/mL; (E) glicose; (F) glicose + 1µg/mL; (G) glicose + 10 µg/mL; (H) glicose + 100µg/mL. As células foram cultivadas em frascos de cultura conforme descrito nas metodologias na seção de Exemplos e, então, fotografadas. (aumento de 10x).

[0024] A Figura 2 mostra a avaliação da morfologia das células EA.hy926 tratadas com extrato de flor de Begônia na presença ou ausência de alta concentração de glicose por 48 h. (A) controle; (B) 1µg/mL; (C) 10 µg/mL; (D) 100 µg/mL; (E) glicose; (F) glicose + 1µg/mL; (G) glicose + 10 µg/mL; (H) glicose + 100µg/mL. As células foram cultivadas em frascos de cultura conforme descrito nas metodologias na seção de Exemplos e, então, fotografadas (aumento de 10x).

[0025] A Figura 3 mostra a avaliação da morfologia das células EA.hy926 tratadas com extrato de flor de Begônia na presença ou ausência de alta concentração de glicose por 72 h. (A) controle; (B) 1µg/mL; (C) 10 µg/mL; (D) 100 µg/mL; (E) glicose; (F) glicose + 1µg/mL; (G) glicose + 10 µg/mL; (H) glicose + 100µg/mL. As células foram cultivadas em frascos de cultura conforme descrito nas metodologias na seção de Exemplos e, então, fotografadas (aumento de 10x).

[0026] A Figura 4 mostra a avaliação da morfologia das células EA.hy926 tratadas com extrato de folha de Begônia na presença ou ausência de alta concentração de glicose por 24 h. (A) controle; (B) 1µg/mL; (C) 10 µg/mL; (D) 100 µg/mL; (E) glicose; (F) glicose + 1µg/mL; (G) glicose + 10 µg/mL; (H) glicose + 100µg/mL. As células foram cultivadas em frascos de cultura conforme descrito nas metodologias na seção de Exemplos e, então, fotografadas (aumento de 10x).

[0027] A Figura 5 mostra a avaliação da morfologia das células EA.hy926 tratadas com extrato de folha de Begônia na presença ou ausência de alta concentração de glicose por 48 h. (A) controle; (B) 1µg/mL; (C) 10 µg/mL; (D)

100 µg/mL; (E) glicose; (F) glicose + 1µg/mL; (G) glicose + 10 µg/mL; (H) glicose + 100µg/mL. As células foram cultivadas em frascos de cultura conforme descrito nas metodologias na seção de Exemplos e, então, fotografadas (aumento de 10x).

[0028] A Figura 6 mostra a avaliação da morfologia das células EA.hy926 tratadas com extrato de folha de Begônia na presença ou ausência de alta concentração de glicose por 72 h. (A) controle; (B) 1µg/mL; (C) 10 µg/mL; (D) 100 µg/mL; (E) glicose; (F) glicose + 1µg/mL; (G) glicose + 10 µg/mL; (H) glicose + 100µg/mL. As células foram cultivadas em frascos de cultura conforme descrito nas metodologias na seção de Exemplos e, então, fotografadas (aumento de 10x).

[0029] A Figura 7 mostra os gráficos de viabilidade de células endoteliais EA.hy926 tratadas com extrato (1, 10 e 100 µg/mL) de flor de *Begonia semperflorens* na presença ou ausência de alta concentração de glicose (35 mM) em diferentes tempos de exposição (24 h, 48 h e 72 h). Diferentes letras indicam diferença estatística significativa pela análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0.05$).

[0030] A Figura 8 mostra os gráficos de viabilidade de células endoteliais EA.hy926 tratadas com extrato (1, 10 e 100 µg/mL) de folha de *Begonia semperflorens* na presença ou ausência de alta concentração de glicose (35 mM) em diferentes tempos de exposição (24 h, 48 h e 72 h). Diferentes letras indicam diferença estatística significativa pela análise de variância ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0.05$).

[0031] A Figura 9 mostra os gráficos de TBARS, NO e TAC (capacidade antioxidante total).

Descrição Detalhada da Invenção

[0032] Em um primeiro objeto a presente invenção apresenta o extrato de Begônia para o tratamento de Diabetes Mellitus.

[0033] Em uma concretização da presente invenção o extrato da Begônia é da

Begonia semperflorens.

[0034] Em um segundo objeto a presente invenção apresenta o processo de extração a partir da flor vermelha e/ou a folha da Begônia.

[0035] Em um terceiro objeto a presente invenção apresenta o uso do extrato de Begônia, para preparar um medicamento para tratar a Diabetes Mellitus.

[0036] Em um quarto objeto a presente invenção apresenta a composição farmacêutica, que compreende um extrato obtido a partir de Begônia.

Exemplos

[0037] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo 1

Preparo dos extratos de Begônia

[0038] Para obtenção dos extratos, foi definido o método de extração com condensador em sistema de refluxo utilizando água como solvente. Foram testadas diferentes concentrações de extratos, sendo definida a concentração de 5% (p/v). Para a filtração do extrato usou-se papel filtro quantitativo (Unifil, 125 mm). Após preparação, o extrato foi liofilizado para melhor conservação e foi armazenado à -20°C até os ensaios biológicos.

Determinação do conteúdo fenólico total dos extratos

[0039] A quantificação de polifenóis totais foi determinada pela metodologia de Folin-Ciocalteu modificada por Singleton *et al.* (1999), onde 0,2 mL do extrato foram adicionados a 1 mL do reagente Folin–Ciocalteu e 0,8 mL de carbonato de sódio (7,5 %, p/v). Após 30 minutos ao abrigo da luz, as amostras foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de 765 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina (ECAT)/100g (Tabela 1).

Tabela 1. Conteúdo fenólico de extrato (10% p/v) de flores e folhas de Begônia (vermelha, rosa e branca) *in natura* em água (maceração 10 min).

				mgECAT/100ml		mgECAT/ml	mgECAT/g		mgECAT/100g
				MD	DP		MD	DP	
FVSM	12,645	12,626	12,608	12,626	6,313	0,126	1,263	0,0189	126,26
FVCM	13,702	13,532	13,589	13,608	6,804	0,136	1,361	0,0865	136,08
FB	10,098	9,909	9,608	9,872	4,940	0,099	0,987	0,2475	98,72
FR	9,740	9,626	9,513	9,626	4,814	0,096	0,963	0,1132	96,26
Folha vermelha	10,551	10,589	9,023	10,054	5,080	0,101	1,005	0,8935	100,54
Folha branca	7,947	8,079	7,891	7,972	3,987	0,080	0,797	0,0968	79,72
Folha rosa	7,664	7,758	8,117	7,847	3,928	0,078	0,785	0,2389	78,47
Comparação com extratos de outras flores:									
	mg/ml								
Camomila	0,13								
Hibisco	0,144								

Legenda:

FVSM flor vermelha sem miolo

FVCM flor vermelha com miolo

FB flor branca

FR flor rosa

ECAT Equivalentes de catequina

Metodologia de análise de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

[0040] As análises foram realizadas em equipamento HPLC marca HP modelo 1100, coluna Lichrospher RP18 (5µm) equipado com detector UV a 210nm e sistema quaternário de bombas. A análise em fase reversa foi constituída de: solvente A – água Milli-Q com 1% de ácido fosfórico e solvente B – Acetonitrila. O sistema de bombeamento da fase móvel foi gradiente, com 90% do solvente A de 0 a 5min, 60% de A de 5 a 40min e 90% de A de 45 a 50min. O fluxo padrão foi mantido a 0,5 mL/min de acordo com Morelli (2010). As amostras foram filtradas em membranas de Nylon de 0,45µm de diâmetro de poro. Os compostos fenólicos foram identificados de acordo com sua ordem de eluição e por comparação de seu tempo de retenção com aqueles de seus padrões puros. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa, através da correlação da área (mAU*s) do pico do composto à curva padrão realizada com cada padrão avaliado (ácido gálico, epigallocatequina, catequina, epicatequina, epigallocatequina galato, rutina, ácido ferulico, naringina, hesperidina, miricetina, resveratrol, quercetina, apigenina e canferol). O resultado é expresso em µg/mL de extrato.

[0041] Resultados de identificação (possível composto) e quantificação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Tabela 2: Concentração de compostos fenólicos (duplicata)

[] Compostos	Extrato (µg/mL)	
	Flor de begônia	Folha de begônia
Ácido gálico	7,359	0
	7,233	0
Epigallocatequina	0,421	2,580
	0,402	2,641

Catequina	5,917	0
	6,104	0
Epicatequina	2,004	0
	2,008	0
Epigallocatequina galato	2,766	0
	2,695	0
Rutina	0,599	0
	0,556	0
Miricetina	0	0,724
	0	0,732

Determinação da atividade antioxidante do extrato

[0042] A atividade antioxidante *in vitro* do extrato foi medida através da capacidade de varredura do radical livre 2,2-difenil,1-picrilhidrazil (DPPH•) de acordo com Yamaguchi *et al.* (1998). Foi utilizado 100 µL de extrato aquoso adicionado a 400 µL de tampão Tris – HCl (pH 7,0) e a 500 µL de solução etanólica de DPPH•. Após 20 minutos ao abrigo da luz, a solução foi lida em espectrofotômetro a 517 nm. Além do ensaio de DPPH, realizou-se a determinação da atividade antioxidante por meio da varredura do radical ABTS (Re *et al.*, 1999). Os resultados foram expressos em IC50 (concentração de extrato de Begônia (mg/mL) necessário para neutralizar o radical DPPH• ou ABTS em 50%).

Tabela 3. Atividade antioxidante pelo ensaio de varredura do radical DPPH[·] de extrato (10% p/v) de flores e folhas de Begônia (vermelha, rosa e branca) *in natura* em água (maceração 10 min).

	ABS1	ABS2	ABS3	Diluição	ABS1	ABS2	ABS3	Média	%Inibição
Padrão	0,505	0,502	0,5	10	5,05	5,02	5,00	5,02	0
FVSM	0,482	0,485	0,483	5	2,41	2,43	2,42	2,42	51,89
FVCM	0,369	0,374	0,371	5	1,85	1,87	1,86	1,86	63,04
FB	0,45	0,453	0,444	5	2,25	2,27	2,22	2,25	55,31
FR	0,463	0,467	0,401	5	2,32	2,34	2,01	2,22	55,84
Folha V	0,44	0,453	0,453	5	2,20	2,27	2,27	2,24	55,34
Folha B	0,461	0,467	0,458	5	2,31	2,34	2,29	2,31	54,01
Folha R	0,45	0,456	0,455	5	2,25	2,28	2,28	2,27	54,84

[0043] A partir dos ensaios realizados, definiu-se que a espécie vermelha, por apresentar maior de fenólicos e AA, seguiria para os próximos experimentos.

[0044] Optou-se por extração com água utilizando condensador em refluxo para obter-se melhores resultados. Condição de extração empregada: 15 minutos fervura. Extrato a 5% (p/v). Filtração em bomba de vácuo com membrana filtrante de 0,20 mm. Após liofilização do extrato à vácuo a -55°C. Rendimento final do extrato após liofilização entre 8 e 10% (p/v).

Tabela 4. Atividade antioxidante pelo ensaio de varredura do radical DPPH[·] e ABTS⁺ de extrato liofilizado de flores e folhas de Begonia (vermelha) 5%.

		AMOSTRA	RES 1	RES 2	RES 3	MD	DP
Ensaio	DPPH	FLOR	1,82	1,91	1,87	1,87	0,043
		FOLHA	1,61	1,62	1,59	1,61	0,017
	ABTS	FLOR	2,432	2,437	2,438	2,44	0,003
		FOLHA	3,678	2,753	2,755	3,06	0,534

Linhagem celular – desenho experimental

[0045] Os estudos serão realizados utilizando-se como modelo cultura de células de mamíferos EA.hy926 (endotelial; ATTC) em condição normoglicêmica e hiperglicêmica (35mM de glicose) tratadas ou não com extrato de folhas e flores de *Begonia semperflores*.

Determinação da viabilidade celular

[0046] A viabilidade celular será avaliada através da determinação da capacidade das células em reduzir o composto MTT (3-[4,5-dimetiltiazol 2-il]-2,5 difenil brometo de tetrazolina) de acordo com metodologia descrita por Denizot & Lang (1986). Para isso, as células serão lavadas com tampão PBS e então semeadas em 0,1mL de meio de cultura contendo MTT. Após, as células serão incubadas por 3 horas. A solução de MTT será então retirada e os

cristais formados serão dissolvidos em 0,1mL de dimetil sulfóxido (DMSO).

Análise da morfologia celular

[0047] Análises morfológicas das células tratadas e não tratadas foram realizadas com o microscópio invertido OPTIPHASE, por contraste de fase. As imagens foram adquiridas com câmera colorida CMOS 10.0 MP BIOCAM. As Figuras 1 a 6 mostram os resultados obtidos.

Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

[0048] Será realizada a quantificação dos produtos finais da peroxidação lipídica, os quais são capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico, formando um produto de coloração rosa, que será lido espectrofotometricamente a 530nm, segundo metodologia de Wills et al. (1966). Os resultados serão expressos em nmol de TBARS/mg de proteínas. Os níveis de NO serão determinados através da reação de Griess, de acordo com metodologia descrita por Green (1981). Os resultados serão expressos como nmol de nitritos por mg de proteína. O conteúdo de proteínas totais será quantificado através do método de Bradford (1976) e os resultados serão expressos em mg de proteína/mL (Figura 9).

Atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase

[0049] A atividade da superóxido dismutase (SOD) será determinada de acordo com Bannister & Calabrese (1987), onde as células serão adicionadas ao tampão glicina 50uM. Após é adicionado à adrenalina e medida a inibição da taxa de formação de adenocromo a 480nm, por um período de 3 min. Os resultados serão expressos como unidade de SOD (USOD/mg de proteína). Uma unidade de SOD é definida como a concentração de enzima presente na amostra capaz de inibir a formação de adenocromo em 50%.

[0050] A atividade da enzima catalase (CAT) será determinada através da medida da decomposição do peróxido de hidrogênio, segundo Aebi (1984).

Para isto a amostra será adicionada ao tampão fosfato (pH 7,0). Após 2 min. será acrescentado o peróxido de hidrogênio e a leitura será realizada em 240 nm. Os valores serão expressos em μmol de H_2O_2 $\text{minuto}^{-1}\text{mg}$ de proteína (Figura 9).

Análise da atividade do complexo I da cadeia de transporte de elétrons (CTE)

[0051] Para verificar os efeitos do extrato de Begônia na regulação da CTE mitocondrial, a atividade do complexo I, principal complexo envolvido na geração das espécies reativas de oxigênio (EROs), foi medida usando a metodologia proposta por Spinazzi et al. (2012). A atividade do complexo I será medida a 340 nm por 2 minutos, e o controle positivo será obtido com lisado celular exposto a rotenona (1 mM). Os resultados foram expressos em percentual do controle (Figura 9).

Resultados

[0052] O modelo de hiperglicemia demonstrou níveis diminuídos de ON. A enzima óxido nítrico sintase é uma enzima importante para as células endoteliais e regula a biodisponibilidade de ON para as células. O ON está diminuído no diabetes. Os extratos aumentam os níveis de ON, ficando semelhante ao controle. O Complexo I (CI) fica superestimulado na Diabetes, e essa superestimulação causa disfunção mitocondrial e eleva a produção de ROS. Para compensar as enzimas SOD e CAT ficam depletadas e não fazem a varredura dos radicais, levando à lipoperoxidação das membranas, comprometendo a viabilidade celular. De forma geral, os extratos não foram citotóxicos às células endoteliais e evitaram os danos causados pela condição de hiperglicemia.

Análise estatística

[0053] Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os dados foram comparados por análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey, considerando nível de

significância inferior a 5 % ($p < 0,05$), utilizando o software PrismGraphPad® (versão 5.0.1.334).

[0054] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes e alternativas, abrangidas pelo escopo das reivindicações a seguir.

Reivindicações

1. Extrato **caracterizado por** ser de Begônia para o tratamento de Diabetes Mellitus.

2. Extrato de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado pela** Begônia ser *Begonia semperflorens*.

3. Processo de extração **caracterizado por** ser a partir da flor vermelha e/ou a folha da Begônia.

4. Uso do extrato, conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado por** ser para preparar um medicamento para tratar a Diabetes Mellitus.

5. Composição farmacêutica, **caracterizada por** compreender um extrato obtido a partir de Begônia conforme definido na reivindicação 1.

FIGURAS

Figura 1

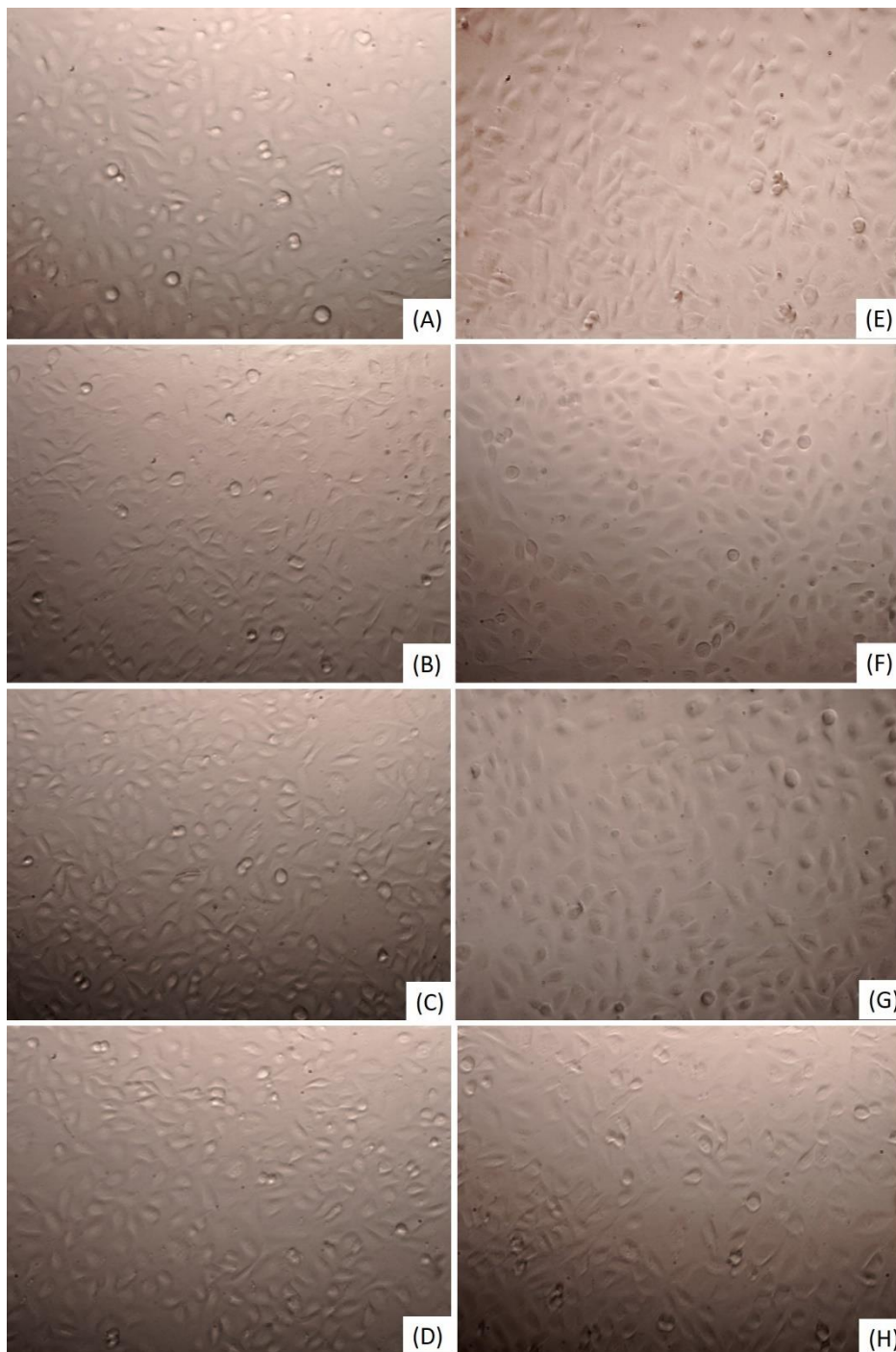


Figura 2

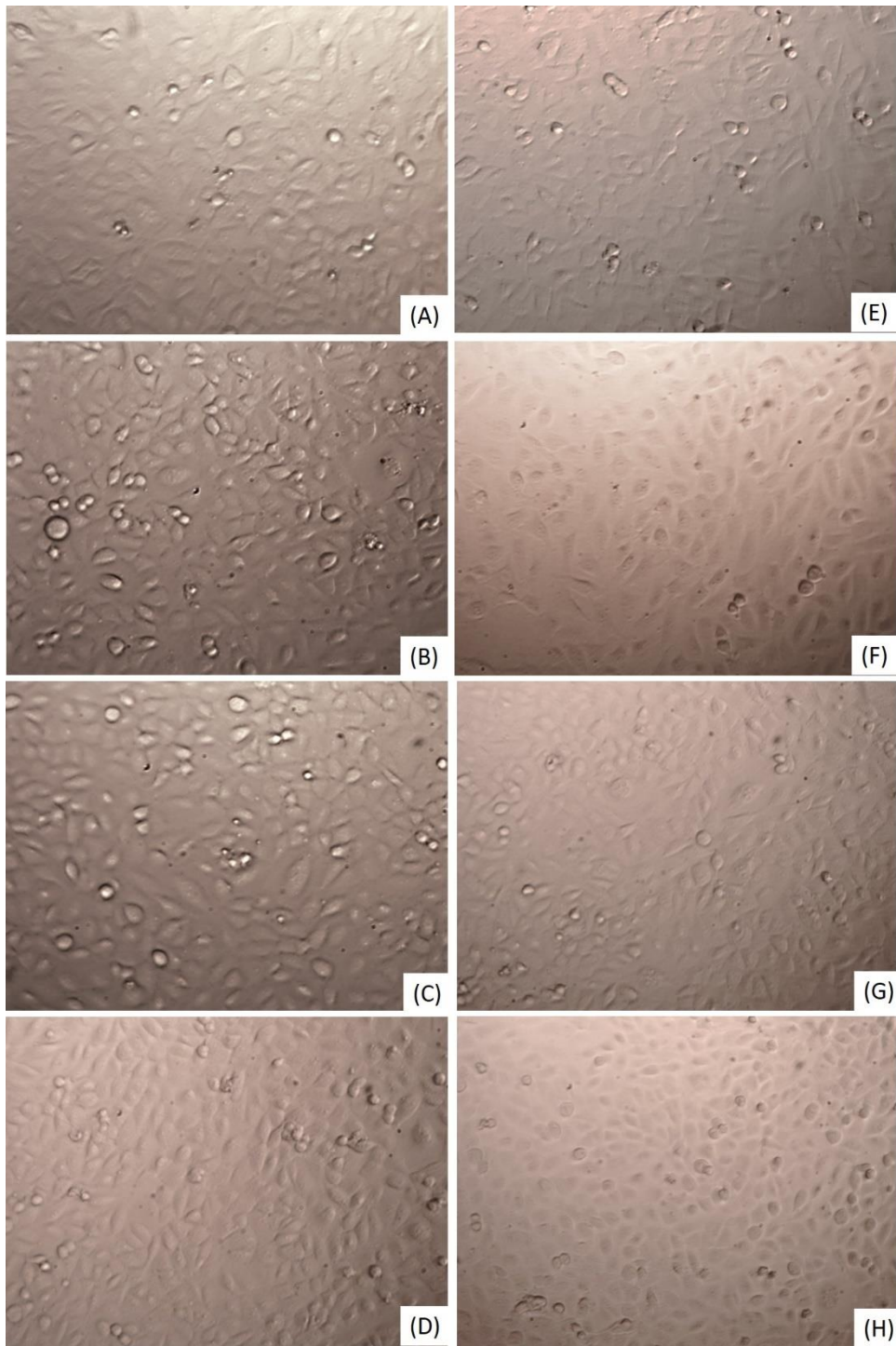


Figura 3

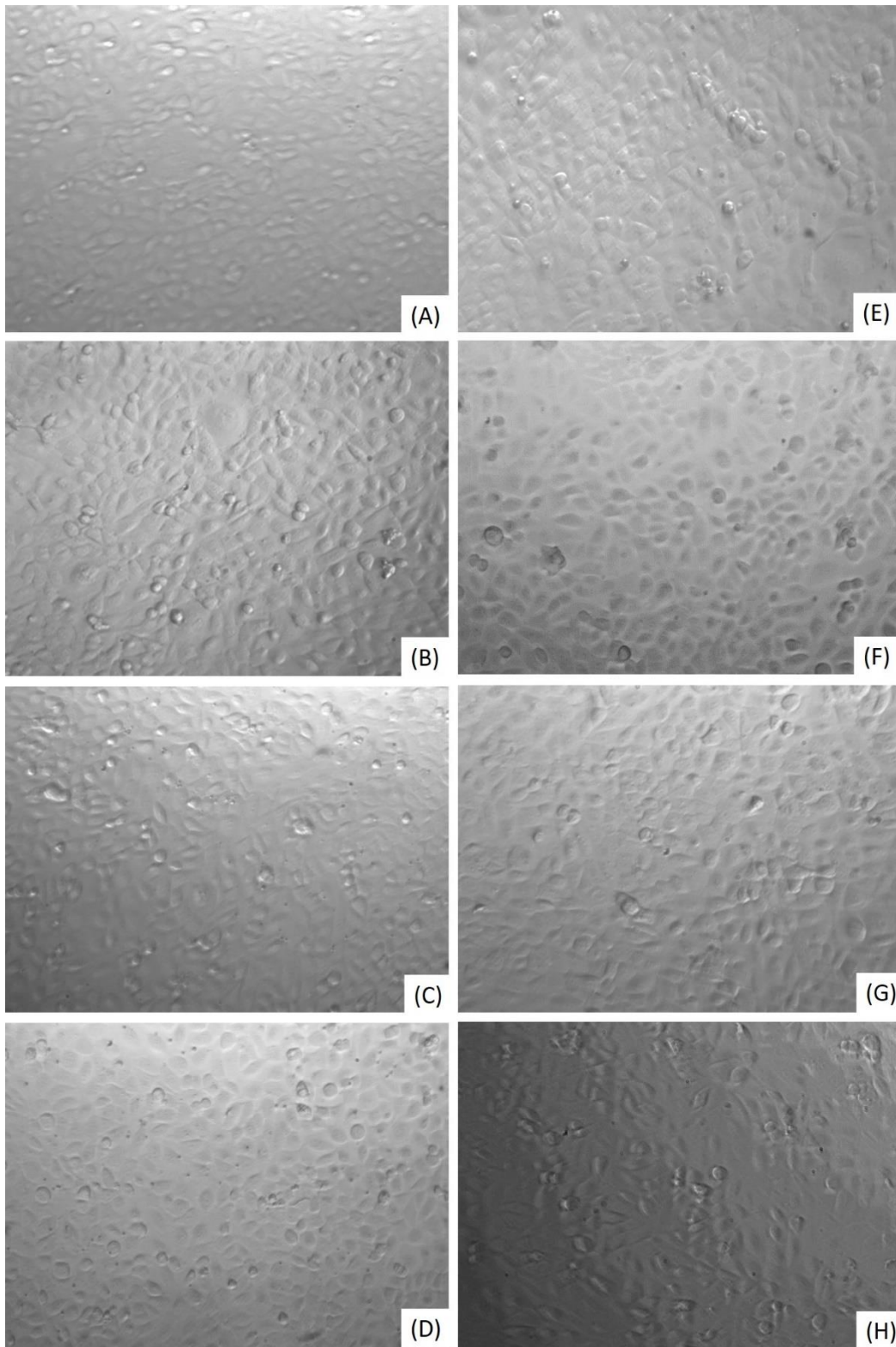


Figura 4

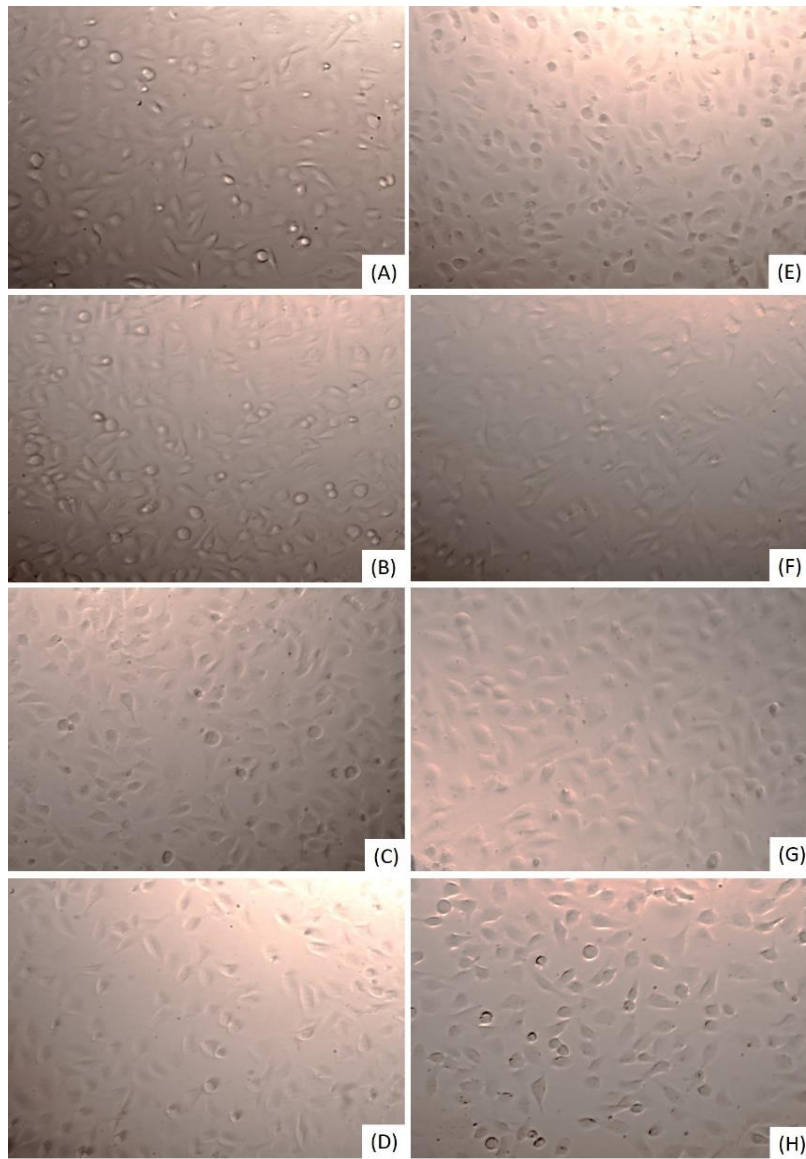


Figura 5

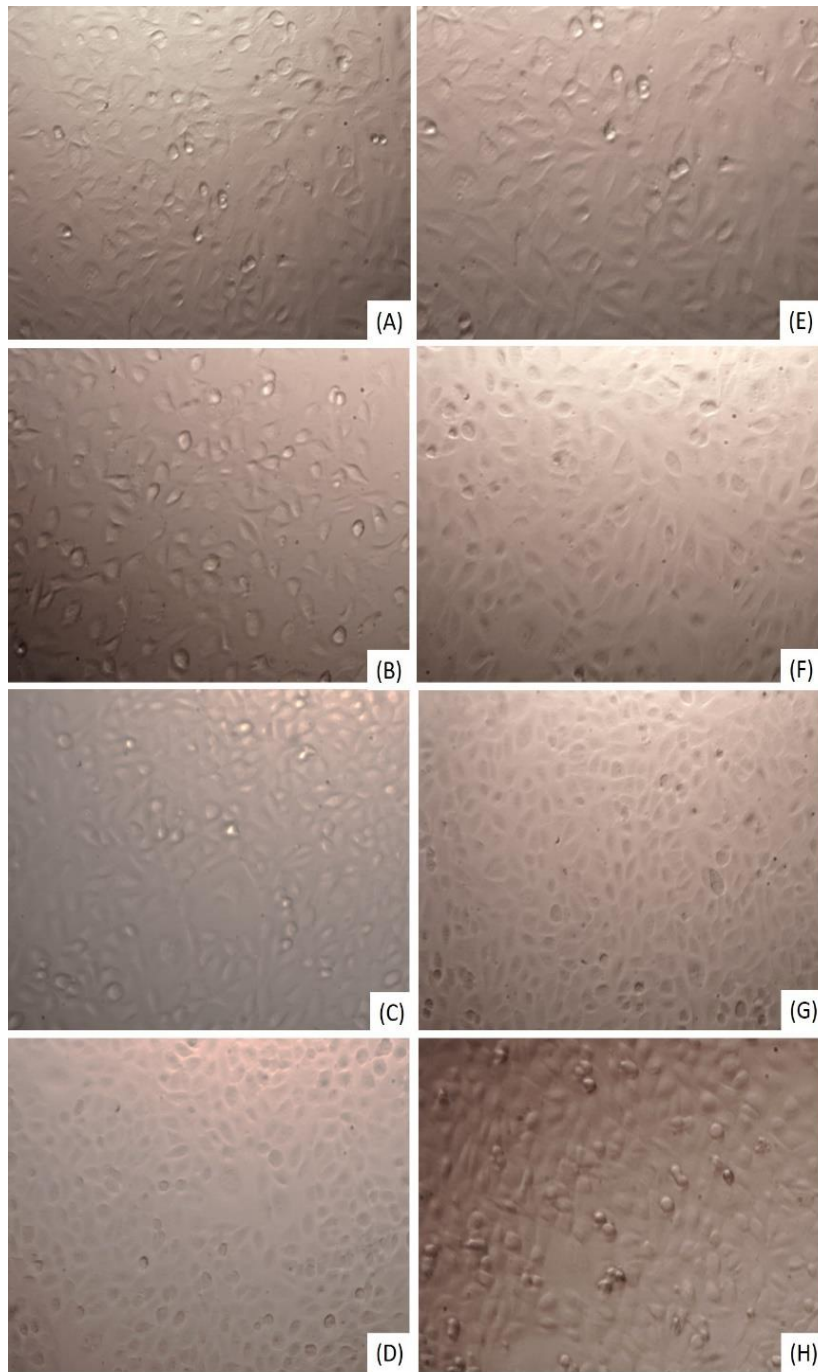


Figura 6

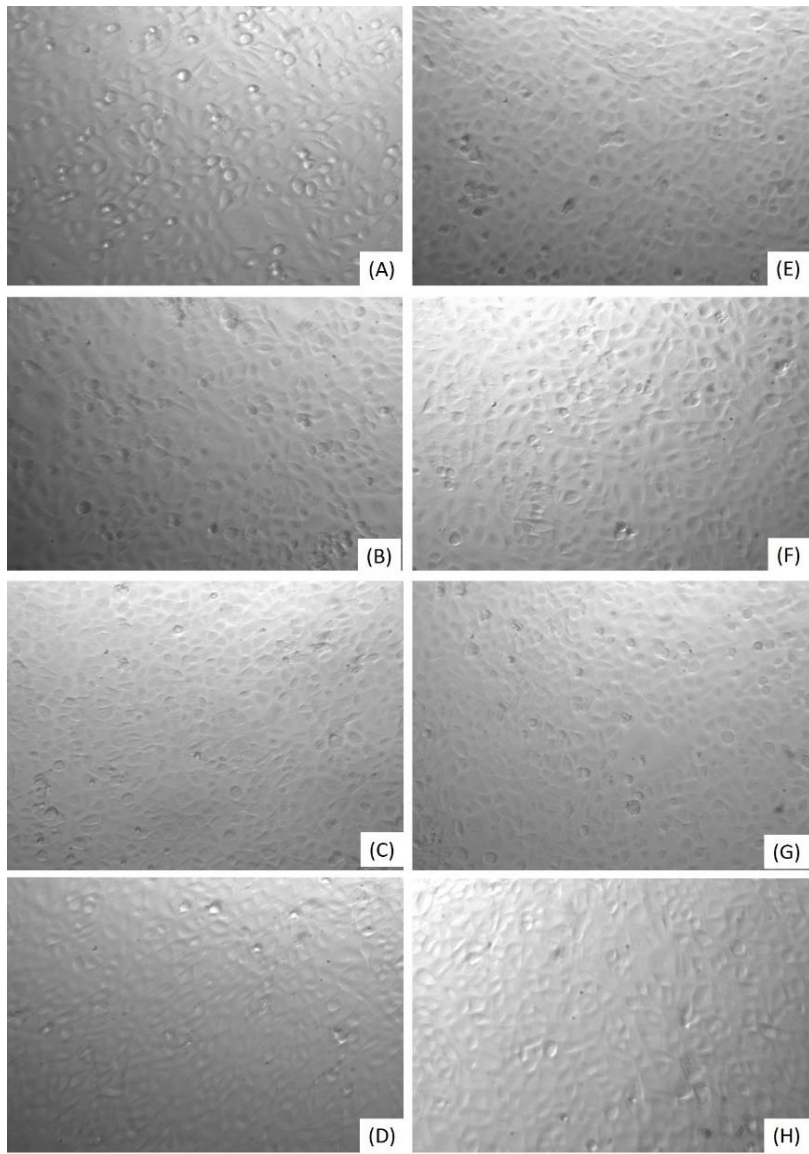


Figura 7

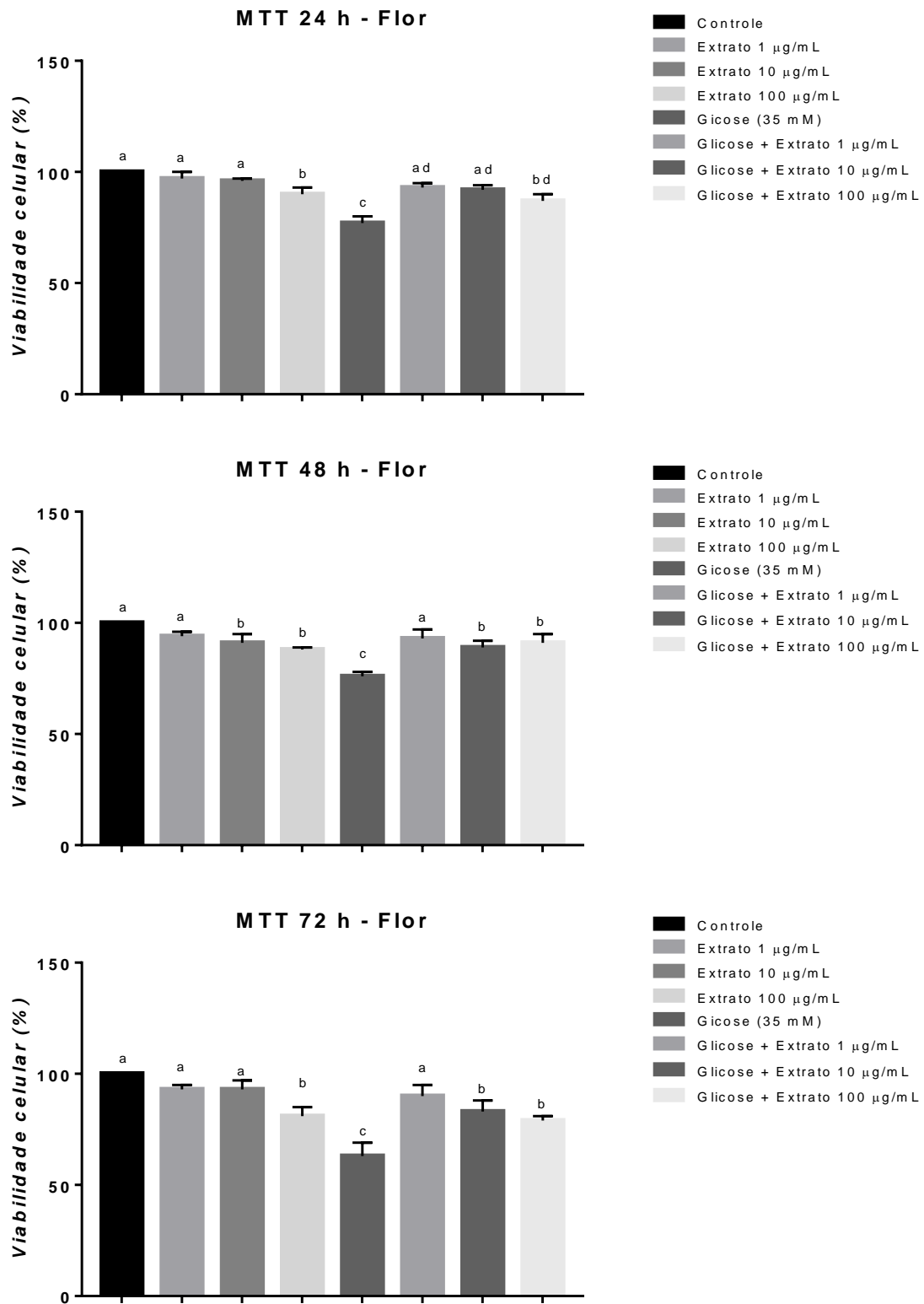


Figura 8

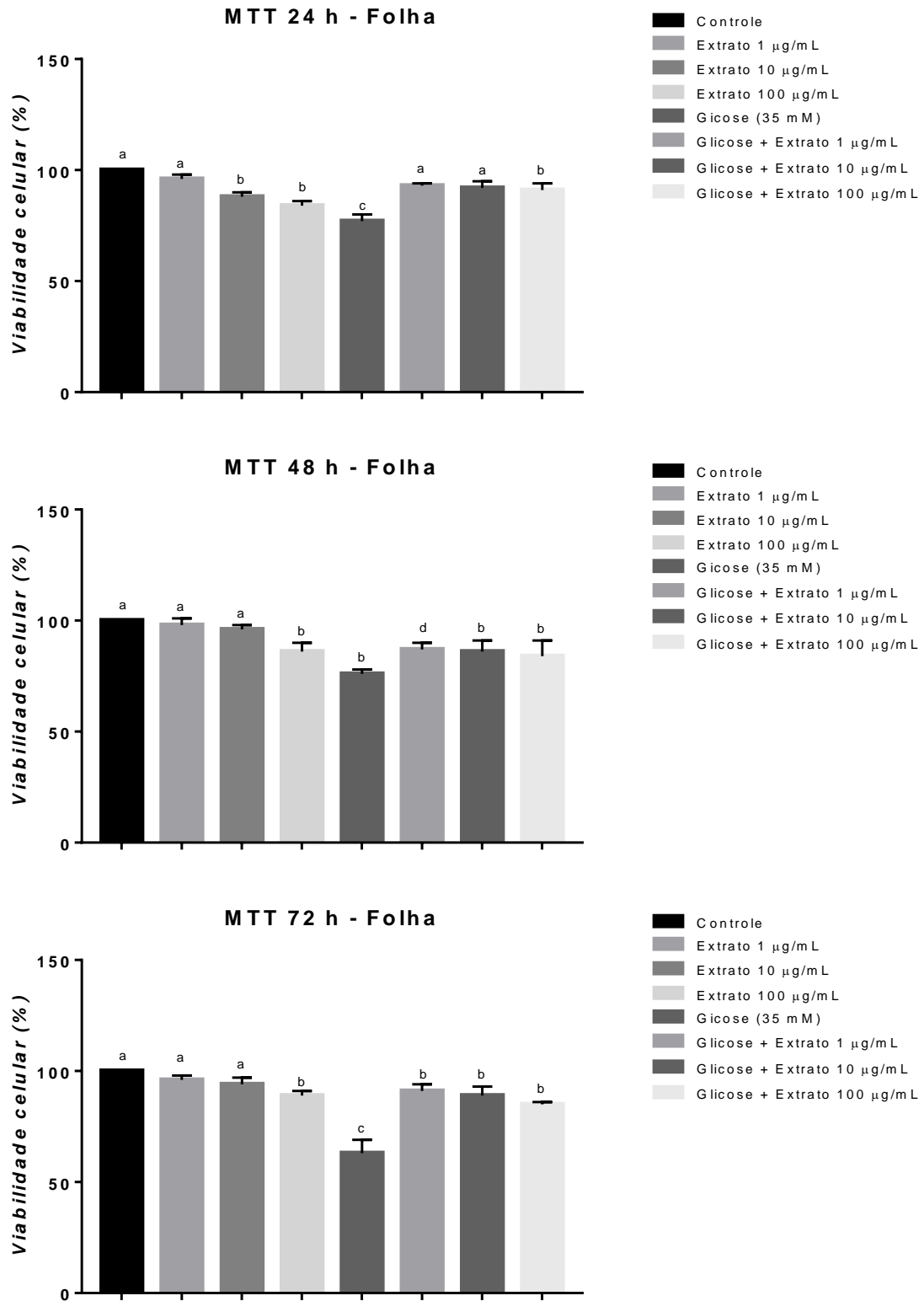
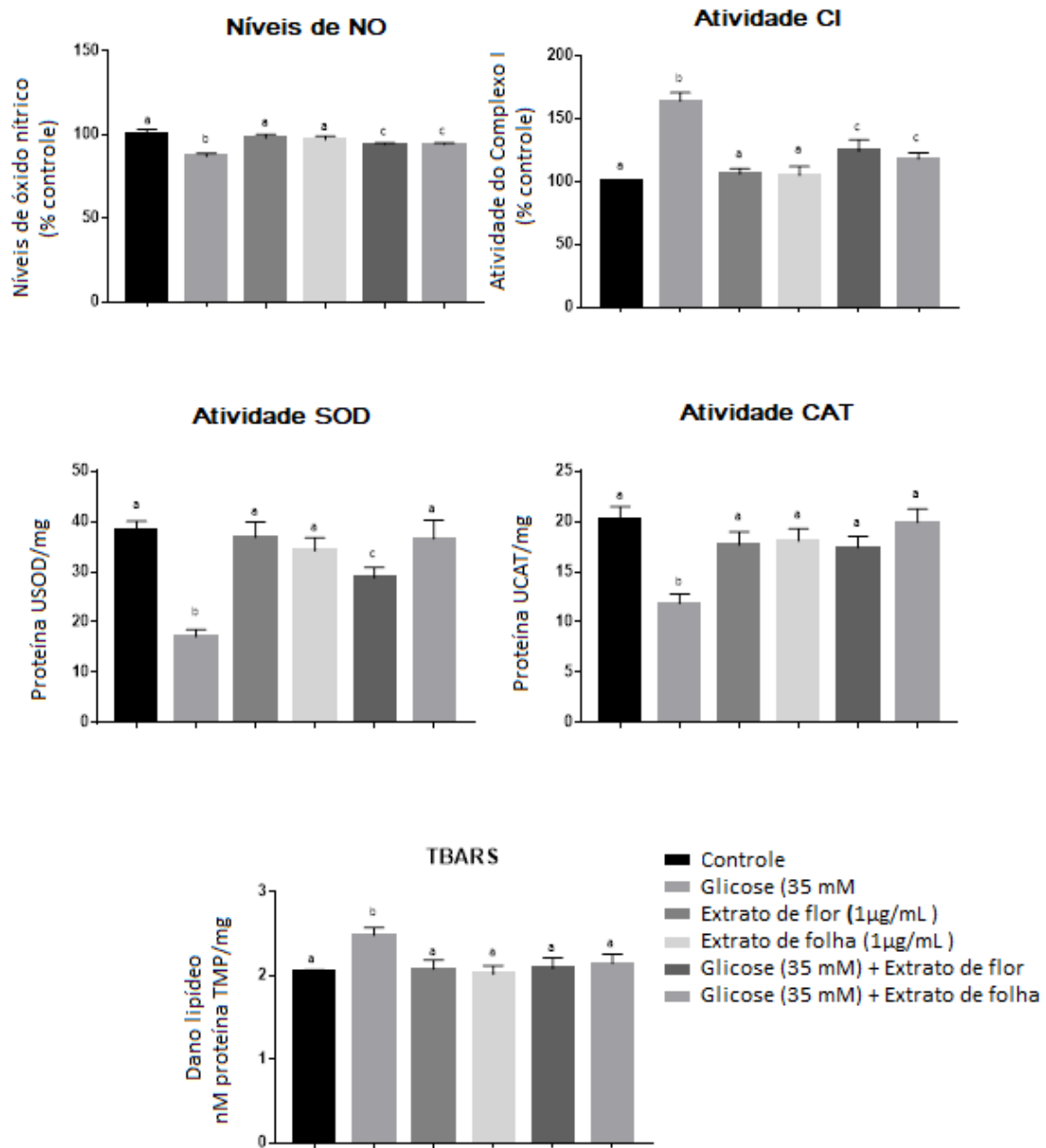


Figura 9



ResumoEXTRATO, PROCESSO DE EXTRAÇÃO, USO DO EXTRATO, COMPOSIÇÃO
FARMACÊUTICA

A presente invenção descreve a utilização do extrato de Begônia para a produção de medicamentos para o tratamento de condições hiperglicêmicas e como regulador de estresse oxidativo, mais especificamente para o tratamento de Diabetes Mellitus. Especificamente, a presente invenção compreende o uso da flor e/ou folha de *Begonia semperflorens*. A presente invenção se situa nos campos da Farmácia, Medicina e Bioquímica.