

CÉLIA CRISTINA MALAGUTTI FIGUEIREDO

**Atividade antioxidante, antiglicante e microencapsulação de extrato e saponinas
obtidas de *Tribulus terrestris***

**ARARAQUARA
2018**

CÉLIA CRISTINA MALAGUTTI FIGUEIREDO

**Atividade antioxidante, antiglicante e microencapsulação de extrato e saponinas
obtidas de *Tribulus terrestris***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química - Câmpus de Araraquara da
Universidade Estadual Paulista - UNESP,
como requisito parcial para a obtenção do
Título de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Regildo Marcio Gonçalves da Silva

**ARARAQUARA
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

F475a Figueiredo, Célia Cristina Malaguti
Atividade antioxidante, antiglicante e microencapsulação
de extrato e saponinas obtidas de *Tribulus terrestris* / Célia
Cristina Malaguti Figueiredo. – Araraquara : [s.n.], 2018
81 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Regildo Márcio Gonçalves da Silva

1. Antioxidantes. 2. Produtos finais de glicosilação.
3. Microencapsulação. 4. Saponinas. 5. Flavonóides. I. Título.

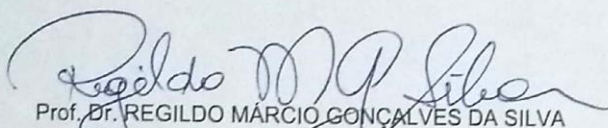
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Atividade antioxidante, antiglicante e microencapsulação de extrato e saponinas obtidas de *Tribulus terrestris*"

AUTORA: CELIA CRISTINA MALAGUTI FIGUEIREDO

ORIENTADOR: REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA

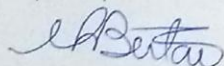
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis



Prof.ª. Dr.ª. PATRÍCIA SOARES SANTIAGO
Campus Experimental de Registro / Universidade Estadual Paulista - UNESP - Registro



Prof.ª. Dr.ª. MONICA ROSA BERTÃO
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis

Araraquara, 21 de agosto de 2018

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família pelo apoio incondicional, pois estive sempre ao meu lado, sobretudo em meio às dificuldades.

"Combati o bom combate, acabei a corrida, guardei a fé. Desde agora, a coroa da justiça me está guardada, a qual o Senhor, justo juiz, me dará naquele Dia; e não somente a mim, mas também a todos os que amarem a sua vinda".

2 Timóteo 4:7-8

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva, pela dedicação e empenho na orientação, ao longo desse trabalho e de outros, e, ainda, pela amizade, pelos conselhos e por acreditar em mim e me auxiliar na realização do sonho de me tornar mestre. Sou muito grata por tudo e levarei esse conhecimento para toda a minha vida.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Amanda Gomes, Amanda Viel, Janine, Pamela, Gustavo, Kamille e Anderson pelas conversas, dividindo momentos de felicidade e dificuldade, compartilhando conhecimento e, o mais importante, pela amizade. Em especial à minha amiga Amanda Gomes, que se manteve sempre ao meu lado, encorajando-me e, de prontidão, em todos os momentos, ajudando-me sem pedir nada em troca, somente pela amizade.

Aos funcionários da UNESP/Assis, Gilberto, Alam e Amábile.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

À Prof^a. Dra. Maysa Furlan, do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, pela gentil liberação de seu laboratório para utilização.

Ao João, técnico de Laboratório do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, pelo auxílio durante as análises fitoquímicas de meu projeto.

Ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP, pela grande oportunidade, e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

A todos os funcionários da Seção Técnica de Pós-graduação do Instituto de Química de Araraquara, sempre atenciosos, solícitos em todas as circunstâncias, durante esses dois anos de pesquisa.

A toda minha família, especialmente à minha mãe, Albertina, e ao meu esposo, Vandeir, por estarem sempre ao meu lado. Minha eterna gratidão.

RESUMO

O *Tribulus terrestris* é uma erva amplamente utilizada na medicina popular chinesa com a finalidade de tratar reumatismo, edema, hipertensão, cálculos renais, diabetes, desordens cardiovasculares, disfunção erétil, além de servir ao rejuvenescimento físico. É adstringente, anti-helmíntico, anti-inflamatório, antiespasmódico, anticarcinogênico, diurético, imunomodulador. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver um sistema de liberação controlada de saponinas esteroidais do extrato padronizado e enriquecido com saponinas de *Tribulus terrestris*, por meio da técnica de microencapsulação, com possível aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Nesse contexto, avaliou-se o potencial antioxidante do extrato padronizado e enriquecido com saponinas das microcápsulas por meio dos testes *in vitro* de sequestro de radical livre estável DPPH, do íon Fe⁺³ (FRAP), do radical óxido nítrico (NO), peroxidação lipídica (TBARS) e método hemolítico. Com essa pesquisa, realizou-se a avaliação da atividade antiglicante pelo método da mobilidade proteica em eletroforese e determinação de grupamento amino; fez-se também a quantificação dos fenóis, flavonoides e saponinas totais, por meio de técnicas espectrofotométricas e de análise em HPLC do extrato padronizado, enriquecido e dos compostos liberados pelas microcápsulas.

Palavras-chaves: Produtos finais de glicosilação; Antioxidante; Flavonoides; Microencapsulação.

ABSTRACT

Tribulus terrestris is widely used in Chinese folk medicine for the treatment of rheumatism, edema, hypertension, kidney stones, astringent, antihelmintic, anti-inflammatory, antispasmodic, anticarcinogenic, diuretic, immunomodulatory, diabetes, cardiovascular disorders and for physical rejuvenation and erectile dysfunction. Therefore, the aim of this work was to develop a controlled release system of steroidal saponins from the extract standardized and enriched with *Tribulus terrestris* saponins by means of the microencapsulation technique, with possible application in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. The antioxidant potential of the standardized and saponin-enriched extract of the microcapsules was evaluated by in vitro tests of stable free radical DPPH, Fe + 3 ion (FRAP), nitric oxide (NO) radical, lipid peroxidation (TBARS) and hemolytic method. The evaluation of the antiglycan activity by the protein mobility method in electrophoresis and amino group determination was performed. Quantification of total phenolics, flavonoids and saponins was also performed by means of spectrophotometric and HPLC analysis of the standardized enriched extract and the compounds released by the microcapsules.

Keywords: Glycosylation end products; Antioxidant; Flavonoids; Microencapsulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de Maillard (glicação), entre glicose e proteína.....	17
Figura 2 - <i>Tribulus terrestris</i> L., planta e seu correspondente fruto.....	19
Figura 3 - Estrutura básica de uma Diosgenina.....	23
Figura 4 - Estrutura básica de uma Protodioscina.....	25
Figura 5 - Estrutura básica de um Furostanol.....	26
Figura 6 - Estrutura básica de um Espirostanol.....	27
Figura 7 - Microcápsulas e microesferas.....	30
Figura 8 - Estrutura básica da Maltodextrina.....	32
Figura 9 - Perfil cromatográfico de extratos hidroetanólicos dos frutos obtidos por HPLC-PAD.....	43
Figura 10 - Resultado da varredura das microcápsulas obtidas com extrato padronizado de <i>T. terrestris</i> diluídas em água em diferentes diluições em proporção de extrato com maltodextrina.....	46
Figura 11 - Resultado da varredura das microcápsulas obtidas com extrato padronizado de <i>T. terrestris</i> diluídas em etanol em diferentes diluições em proporção de extrato com maltodextrina	47
Figura 12 - Microscopia Eletrônica de Varredura.....	48
Figura 13 - Atividade antioxidante pelo método de hemólise do extrato padronizado de <i>T. terrestris</i> durante 6 horas de incubação nas concentrações de 500 µg/mL e 1000 µg/mL, mensurada a 540nm em espectrofotômetro.....	52
Figuras 14 e 15 - Resultado de Mobilidade Relativa em Eletroforese para os extratos padronizado e enriquecido (MRE e OPA e Determinação de amina livres.....	58
Figuras 16 e 17 - Resultados da Determinação de amins livres e valores da inibição da formação de AGEs.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação do conteúdo polifenólico e flavonoides totais nos extratos padronizado e enriquecido com saponinas de <i>T. terrestris</i>	42
Tabela 2 - Determinação da porcentagem de eficiência de encapsulação do extrato padronizado de <i>T. terrestris</i> , obtida por meio da dosagem dos compostos polifenólicos totais, antes de encapsular, encapsulado e após a liberação das microcápsulas, em diferentes diluições de extrato e maltodextrina.....	45
Tabela 3 - Determinação da porcentagem de eficiência de encapsulação do extrato enriquecido com saponinas de <i>T. terrestris</i> , obtida por meio da dosagem dos compostos polifenólicos totais, antes de encapsular, encapsulado e após a liberação das microcápsulas, em duas diluições de extrato e maltodextrina.....	45
Tabela 4 - Atividade antioxidante do extrato padronizado de <i>T. terrestris</i> e controle positivo ácido gálico e Trolox por meio dos testes DPPH, FRAP, TBARS e NO.....	49
Tabela 5 - Atividade antioxidante do extrato enriquecido com saponinas de <i>T. terrestris</i> e controle positivo Ácido Gálico e Trolox por meio dos testes DPPH, FRAP, TBARS e NO.....	50
Tabela 6 - Atividade antioxidante de microcápsulas de maltodextrina contendo extrato padronizado de <i>T. terrestris</i> (10000 µg/mL), em diferentes diluições e solventes (água e etanol PA).....	54
Tabela 7 - Atividade antioxidante de microcápsulas de maltodextrina (MD20) contendo extrato enriquecido com saponinas de <i>T. terrestris</i> (10000 µg/mL), em diferentes diluições e solventes (água e etanol PA).....	54
Tabela 8 - Atividade antioxidante do produto de liberação de microcápsulas de maltodextrina contendo extrato padronizado de <i>T. terrestris</i> (10000 µg/mL), em diferentes diluições.....	56
Tabela 9 - Atividade antioxidante do produto de liberação de microcápsulas de maltodextrina contendo extrato enriquecido com saponinas de <i>T. terrestris</i> (10000 µg/mL), em diferentes diluições e solventes (água e etanol PA).....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

λ_{max}	Comprimento de onda máxima
A _{max}	Absorbância máxima
AGE	Produtos de glicação avançada
AAPH	2,2'-Azobis (2- amidinopropano) dicloridrato
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária Comissão Nacional de Normas e Padrões para
CNNPA	Alimentos
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DNS	Ácido 3 5-dinitrosalicílico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
HCl	Ácido clorídrico
FeCl ₃	Cloreto de ferro
K	Potássio
Na	Sódio
NaNO ₂	Nitrato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salino
P/v	Peso por volume
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RL	Radicais livres
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNP	Nitruprussiato de sódio
TBARS	Substâncias reativas a ácido tiobarbitúrico
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
OPA	Ortoftaldeído

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
Σ	Somatória
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
mM	Milimolar
M	Molar
μ g	Micrograma
pH	Potencial hidrogeniônico
x	Vezez

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Estresse Oxidativo	15
2.1.1 Danos oxidativos no organismo	15
2.1.2 Espécies reativas.....	15
2.1.3 Glicação proteica.....	16
2.2 Espécies vegetais com potencial antioxidante	17
2.3 <i>Tribulus terrestris</i>	19
2.4 Saponinas	21
2.4.1 Distribuição de origem vegetal.....	21
2.4.2 Caracterização e classificação.....	21
2.4.3 Diosgenina.....	23
2.4.4 Protodioscina.....	25
2.4.5 Furostanol.....	26
2.4.6 Espirostanol.....	27
2.5 Microencapsulação	28
3 Objetivo Geral	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Obtenção do extrato seco padronizado de <i>T. terrestris</i>	33
4.2 Obtenção do extrato enriquecido com saponinas de <i>T. terrestris</i>	33
4.3 Determinação de polifenóis, flavonoides e saponinas totais	33
4.3.1 Determinação de polifenóis totais.....	33
4.3.2 Determinação de flavonoides totais.....	33
4.3.3 Determinação de saponinas totais e preparo do extrato e padrões para análise em HPLC-DAD/MS	34
4.4 Microencapsulação	35
4.4.1 Microencapsulação dos extratos em Maltodextrina.....	35
4.4.2 Avaliação das microcápsulas.....	35
4.4.2.1 Eficiência da encapsulação de acordo com compostos fenólicos (%)	36
4.4.2.2 Ruptura das micropartículas para liberação dos compostos	36
4.4.2.3 Análise das microcápsulas por diferencial de varredura em espectrofotometria.....	36
4.4.2.4 Análise estrutural das microcápsulas em microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
4.5 Avaliação da Atividade Antioxidante para os extratos (padronizado e enriquecido),	

microcápsulas contendo os extratos e produto da liberação das microcápsulas	37
4.5.1 Atividade sequestradora do radical DPPH.....	37
4.5.2 Poder de redução do Ferro (FRAP).....	37
4.5.3 Inibição da peroxidação lipídica (TBARS).....	38
4.5.4 Atividade sequestradora de Óxido Nítrico (NO).....	38
4.5.5 Método hemolítico.....	39
4.5.5.1 Obtenção de Eritrócitos.....	39
4.5.5.2 Ensaio de hemólise oxidativa.....	39
4.6 Avaliação da atividade antiglicante	40
4.6.1 Mobilidade relativa em eletroforese (MRE).....	40
4.6.2 Determinação de grupos de amina livres.....	40
4.7 Análise estatística	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Rendimento de compostos saponínicos do extrato enriquecido	41
5.2 Determinação de polifenóis, flavonoides e saponinas totais	41
5.3 Eficiência da encapsulação de acordo com compostos polifenólicos totais	44
5.4 Análise das microcápsulas por diferencial de varredura em espectrofotometria	45
5.5 Análise estrutural das microcápsulas em microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	47
5.6 Atividade antioxidante para os extratos padronizado e enriquecido (DPPH, FRAP, TBARS e NO).....	48
5.7 Atividade antioxidante para os extratos padronizado e enriquecido (Método Hemolítico).....	52
5.8 Atividade antioxidante das microcápsulas contendo os extratos padronizado e enriquecido (DPPH e FRAP).....	53
5.9 Atividade antioxidante do produto da liberação das microcápsulas (DPPH e FRAP).....	55
5.10 Atividade antiglicante para os extratos padronizado e enriquecido (MRE e OPA).....	57
CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Ocorre um desequilíbrio entre os processos antioxidantes e oxidativos em reações químicas biológicas durante o estresse oxidativo, que se caracteriza por um aumento significativo do potencial de redução no organismo pela presença de compostos químicos com elevado grau de reatividade e, concomitantemente, pela insuficiência da contenção desses por compostos antioxidantes, o que acarreta danos moleculares e celulares ao organismo (BERRA et al., 2006; SIES, 2015). No curso desse estresse, os principais promotores são representados por duas classes de radicais livres, quais sejam, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (ERN). O desequilíbrio tanto contribui para o processo de envelhecimento, para o das inflamações crônicas, o das doenças neurodegenerativas e até mesmo o do diabetes e o do câncer quanto os provoca (ROESLER et al., 2007; SILVA e GONÇALVES, 2010).

Outro processo ligado ao estresse oxidativo que gera complicações para saúde é a glicação. Esta é provocada por açúcares redutores que reagem com componentes celulares, principalmente proteínas, por meio de complexas reações, conhecidas como reações de Maillard (BOEL et al., 1995; MUHOZA et al., 2018). O resultado final da glicação é uma classe de compostos modificados denominados produtos de glicação avançada (AGEs). Esses compostos e as reações nesse contexto estão relacionados a alterações do nível de citocinas, hormônios e radicais livres, além de complicações mais sérias como cataratas, retinopatia, nefropatias e, especialmente, doenças vasculares (RAMKISSOON et al., 2013; ADISAKWATTANA et al., 2017).

Quanto à origem dos radicais livres, sua fonte pode ser endógena, o que os leva a ser produzidos pelo metabolismo normal, ou exógena, gerada, principalmente, por ingestão alimentar, inalação e radiações, especialmente as solares (ROESLER et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2014; VALENTE, 2014).

Diante do exposto, pesquisas vêm demonstrando que antioxidantes de origem vegetal têm importância nesse contexto, com destaque para compostos fenólicos, que podem evitar, reduzir ou até mesmo eliminar os efeitos deletérios dos processos oxidativos, sendo considerados como uma importante fonte de compostos ativos (KHANAM et al., 2012; SHAHIDI, AMBIGAIPALAN, 2017; KIM et al., 2018).

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver um sistema de liberação controlada de saponinas esteroidais do extrato e saponinas obtidas da espécie *Tribulus terrestris*, por meio da técnica de microencapsulação, com possível aplicação na indústria alimentícia, medicamentosa e de cosméticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estresse oxidativo

2.1.1 Danos oxidativos no organismo

O desequilíbrio entre a produção de radicais livres (RL) e as defesas do organismo, quando estas não são suficientes, gera condições favoráveis à desordens que não só contribuem para o processo de envelhecimento como provoca-o (LOBO et al., 2010). Além do envelhecimento, este desequilíbrio põe em execução complicações biológicas que incluem alterações na expressão gênica cuja manifestação pode culminar em doenças como câncer, aterosclerose, hipertensão, diabetes, síndrome de dificuldade respiratória aguda, fibrose pulmonar e até nefropatias (LOBO et al., 2010; BIRBEN et al., 2012). Pode ocasionar, ainda, mutações gênicas que se acumulam no material genético, fator desencadeador de uma redução dos reparos genômicos, promovendo o aumento do número de biomoléculas oxidadas como proteínas, carboidratos e lipídeos essenciais no funcionamento do organismo. Estes danos são cumulativos e ocorrem lentamente; porém, mostram-se extremamente nocivos, com a possibilidade de lhes sobrevirem doenças degenerativas graves e até a morte (ROESLER et al., 2007; LOBO et al., 2010; SOSA et al. 2013).

2.1.2 Espécies reativas

Os radicais livres (RL) são principalmente representados por duas classes, espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (ERN), caracterizando-se por átomos ou moléculas que apresentam elétrons não pareados. Os principais representantes do grupo dos ROS são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a lipoperoxila (LOO^{\cdot}) e a hidroxila ($\cdot OH$). O grupo dos ERN é constituído pelo óxido nítrico (NO^{\cdot}) e pelo ânion peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (ZANDALINAS, MITTLER, 2017). Há outras formas de radicais livres, compostos ou elementos com instabilidade eletrônica, como os metais de transição. Estes são capazes de gerar lesões celulares, ou media-las, como a peroxidação de lipídeos e a oxidação de proteínas, o que, nesse caso, conseqüentemente, pode gerar a inutilização de enzimas essenciais ao metabolismo, ativar excessivamente os genes pró-inflamatórios, como as interleucinas, e causar danos ao DNA, desse modo produzindo um aumento do risco de câncer (GONÇALVES, 2014; OZSOY et al., 2018).

2.1.3 Glicação proteica

A glicação proteica é um processo promovido por açúcares redutores que se ligam em proteínas por meio de reações complexas, conhecidas como reações de Maillard. O resultado final da glicação é uma classe de compostos modificados, sob a denominação de produtos de glicação avançada (AGE). Tais compostos estão relacionados às alterações no âmbito de citocinas, hormônios e radicais livres, contribuindo com a formação de cataratas, retinopatia, nefropatias e, especialmente, doenças vasculares (GOLDIN et al., 2006; STÉPHANE JAISSON, PHILIPPE GILLERY, 2018).

Esta reação altera a estrutura das proteínas e pode ser prejudicial; contudo, em certos casos são reações funcionais do organismo, pois estão relacionadas ao sistema imune, sobretudo, e à conformação da estrutura quaternária de proteínas, como enzimas, importante para adesão entre as células do organismo. Quase todas as moléculas envolvidas na resposta imune inata e adaptativa são glicoproteínas. Sem as reações de glicação, a manutenção da vida de qualquer organismo seria inviável (WAUTIER et al., 2017).

A reação de Maillard é influenciada por uma série de fatores, como o pH básico, temperaturas acima de 40°C, e a presença de metais de transição, como Cu^{2+} e Fe^{2+} , pois catalisam o processo (HODGE, 1953; FINOT, 2005). Esta reação pode ser didaticamente separada em três fases: inicial, intermediária e final. Na fase inicial ocorre a combinação de um grupamento carbonila do açúcar redutor com a amina de uma proteína, os chamados produtos de Amadori, o primeiro produto estável, mas incolor (Figura 1). Na fase intermediária, os produtos de Amadori originam uma série de reações de desidratação, enolização e retroaldolização, o que resulta em compostos dicarbonílicos, redutonas, derivados do furfural e produtos da degradação de aminoácidos. Com isso, é possível verificar a presença de fluorescência e de absorção de radiação na região do ultravioleta. Já na última fase, compostos muito reativos, os dicarbonílicos, reagem com resíduos da degradação da proteína, como o aminoácido lisina, e formam compostos estáveis, com coloração marrom, degradação, polimerização e *cross-linking* proteico. Sendo irreversíveis, esses compostos absorvem luz na região UV e são capazes de emitir fluorescência, o que auxilia na detecção (HODGE, 1953, e NURSTEN, 2005; SHIBAO e BASTOS, 2011). Esse processo, além de ser considerado oxidativo, também contribui para a geração de espécies reativas, como o ânion-radical superóxido (O_2^-) (NURSTEN, 2005; SHIBAO e BASTOS, 2011; TROISE et al., 2018).

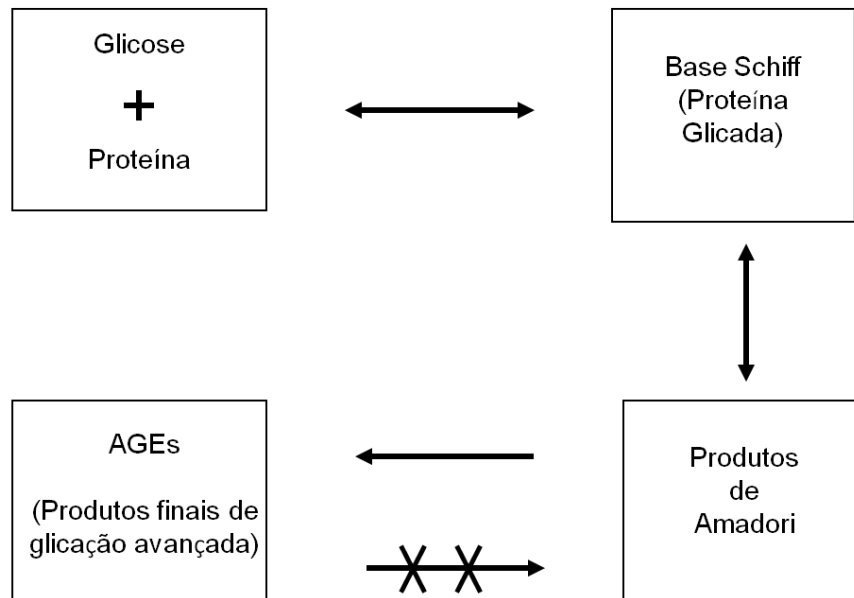


Figura 1 - Reação de Maillard (glicação), entre glicose e proteína. **Fonte:** Autor

Pesquisas vêm demonstrando que antioxidantes de origem vegetal têm muita importância para combater o estresse oxidativo e a glicação, com destaque para sua composição em compostos fenólicos, reduzindo ou até mesmo eliminando os efeitos deletérios dos processos oxidativos, podendo, assim, ser intensivamente empregados na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica (ROESLER et al., 2007; FRANCO et al., 2018).

2.2 Espécies vegetais com potencial antioxidante

Estudos epidemiológicos têm demonstrado a relação do consumo de vegetais com a redução do risco de doenças cardiovasculares, degenerativas e até de câncer. Partes vegetais como raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes representam importantes fontes de antioxidantes naturais, pois apresentam moléculas passíveis de serem liberadas durante o processo de alimentação, digestão e absorção (DEL RÉ, JORGE, 2012; TARCITANO, MESQUITA, 2016). Estas moléculas geralmente são disponibilizadas em pequenas quantidades e são capazes de interromper e/ou prevenir os danos causados pelo estresse oxidativo, principalmente por apresentar propriedades de sequestro de radicais livres (VASCONCELOS et al., 2014).

Antioxidantes, como a vitamina C, a vitamina E, os carotenoides e flavonoides, estão presentes como constituintes dietéticos. Várias plantas conhecidas vêm se destacando por seu poder antioxidante e anti-inflamatório, na perspectiva de uma melhoria geral da saúde e no retardo no processo de envelhecimento, benefícios que têm

atraído a atenção de muitos pesquisadores e grandes indústrias, voltados à sua forma natural ou sintética.

Algumas dessas plantas, como o açafrão (cúrcuma), aveia, linhaça, azeite de oliva, alguns chás, como cavalinha, centelha asiática e dente-de-leão, frutas cítricas e vermelhas, agem diretamente sobre radicais livres e em quelantes de metais, promovendo, assim, o tratamento e/ou a prevenção de diversas patologias associadas ao estresse oxidativo (BRUSHAN et al., 2015; MERINO et al., 2015; LOKANATHAN et al., 2017; FANCELLO et al., 2018; HAMED et al., 2018; KERLEY, 2018).

Dentro deste contexto, a espécie vegetal *Tribulus terrestris* vem despertando o interesse de pesquisadores, inclusive brasileiros, devido à sua utilização e indicações farmacológicas. Esta planta é comercializada no Brasil na forma de cápsulas ou em extrato em pó para ser utilizada como suplemento alimentar e para tratamento de diferentes patologias ligadas ao déficit hormonal e debilidade muscular (MA et al., 2015).

Na medicina tradicional e folclórica de diferentes países, esta espécie é empregada também no tratamento de doenças associadas ao fígado, rins, do trato geniturinário e de todos os tipos de problemas cutâneos, sendo ultimamente destacada pelo seu elevado potencial antioxidante (PEREIRA et al., 2017).

De acordo com estudos recentes, foi demonstrado que a *T. terrestris* possui metabólitos importantes como fitoesteroides, flavonoides, alcaloides, glicosídeos e saponinas, que podem estar diretamente correlacionados com sua ação sequestradora de radicais livres e reguladora do estresse oxidativo (QASIM et al., 2017; PEREIRA et al., 2018).

Em plantas ricas em saponinas, sabe-se que estes compostos apresentam diferentes funções, como regulação do crescimento, defesa contra insetos e patógenos. Essas funções revelam a importância desses compostos na adaptação e sobrevivência do vegetal em seu meio (LOPES, 2017). Já quanto aos seus efeitos no organismo humano, destaca-se a atividade antioxidante; elas podem também se ligar a sais biliares e colesterol no tubo digestivo, impedindo sua absorção e agindo como hipocolesterolêmica; além disso, possuem ação citotóxica (pró-oxidativa), atuando contra células tumorais (SCHENKEL et al., 2007; PEREIRA CARDOSO, 2012; SARVIN et al., 2018).

Semelhantemente à *T. terrestris*, os principais alimentos onde também são encontradas saponinas são a soja e seus alimentos derivados, alfafa, espinafre, beterraba, aspargos, açafrão, amendoim, nozes e folhas de diferentes chás. Estes se caracterizam por apresentar importante potencial nutricional, farmacológico, medicinal e

cosmetológico, sendo utilizados como alimentos funcionais, medicamentos e cosméticos (SPARG et al., 2004; NAVARRO DEL HIERRO et al., 2018).

2.3 *Tribulus terrestris*

Tribulus terrestris é uma planta de origem indiana, da família *Zygophyllaceae*, considerada uma planta daninha, nativa de regiões quentes, temperadas e tropicais do Velho Mundo, como o sul da Europa, sul da Ásia, ao longo da África e da Austrália. Considerada afrodisíaca e conhecida pelos europeus desde o século 17, tem sido utilizada para tratamento de insuficiência hormonal em homens e mulheres (VESILADA et al., 1995; ZHU et al., 2017). É uma herbácea rasteira, cujos troncos irradiam da coroa, por um diâmetro de cerca de 1 cm a mais de um metro, com muitas ramificações, geralmente prostradas, formando arbustos planos, embora possam crescer mais verticalmente em sombras ou entre plantas mais altas. As folhas são compostas por folíolos com 7 mm, em média, de comprimento. A flor é de 4-10 mm de largura, com cinco pétalas de cor amarela. Uma semana depois da floração, origina-se o fruto que libera as sementes, que são duras e possuem dois espinhos afiados, com 10 mm de comprimento e 4-6 mm entre eles (Figura 2).



Figura 2 - Planta e fruto de *Tribulus terrestris*.

Fonte: <https://herbariovaa.org/taxa/index.php?taxon=37035>

Na medicina popular chinesa, a *T. terrestris* é amplamente utilizada para o tratamento de reumatismo, edema, hipertensão, cálculos renais. Além de possuir ação adstringente, é anti-helmíntica; anti-inflamatória; antiespasmódica; anticarcinogênica; diurética; imunomoduladora; antidiabética. Atua favoravelmente em distúrbios cardiovasculares, no rejuvenescimento físico e na disfunção erétil. Atualmente o fitoterápico obtido desta espécie vem sendo utilizado como anabolizante natural (ROSS, 2005; AKRAM et al, 2011; SINGH et al., 2013).

No que diz respeito a estudos científicos, estes vêm demonstrando que a *T. terrestris* possui compostos ativos capazes de inibir a acetilcolinesterase. Ainda se caracteriza por apresentar um alto potencial antioxidante no tecido nervoso, a possibilitar, assim, sua utilização tanto para o tratamento como para a prevenção das doenças de Alzheimer e Parkinson, e mesmo de alguns tipos de cânceres (ORHAN et al., 2004; CHAVES e AVERSE-FERREIRA, 2008; HAMMODA et al., 2013; SU et al., 2014).

O fitoterápico à base de *T. terrestris* apresenta diferentes efeitos farmacológicos e fisiológicos, pois pode estimular a liberação de hormônio luteinizante (LH) da hipófise e a produção do hormônio do crescimento (GH), além de influenciar na síntese de neurotransmissores importantes para a contração muscular (MANIKANDASELVI et al., 2013; CHHATRE et al., 2014).

A utilização do fitoterápico de *T. terrestris* pode afetar a função do sêmen, causando comprometimento da morfologia, motilidade e vitalidade dos espermatozoides humanos. Componentes do extrato tem capacidade de aumentar a liberação de óxido nítrico, e isto pode estar correlacionado ao tratamento da disfunção erétil (AZADMOBINI et al., 2017).

Diferentes fitoterápicos à base de extrato de *T. terrestris* vêm sendo comercializados. Além do Tribestan[®] e do Androsten[®], que têm sido prescritos para tratar a disfunção erétil e a fragilidade muscular, há o Tribusaponins[®] e o Xin-nao-Shu-Tong[®], prescritos para o tratamento de doenças cardiovasculares (JOSEPH; KOSTOVA e DINCHEV, 2005; LI e YANG, 2006; LACOMO et al., 2011).

Quanto à composição fitoquímica do extrato de *T. terrestris*, estudos científicos demonstram que neste são encontrados compostos fenólicos (NAZ et al., 2017), saponinas (KOSTOVA e DINCHEV, 2005), esteróis (LIU et al., 2003) e alcaloides (CHHATRE et al., 2014). Entretanto, sabe-se que o valor medicinal e farmacológico desta planta reside na presença de saponinas esteroidais, tanto em quantidade quanto em qualidade (MATEOS et al., 2017). Algumas saponinas esteroidais isoladas desta espécie correspondem ao principal componente ativo de formulações fitoterápicas e suplementos alimentares comercializadas no mundo e no Brasil (SEN; CHAKRABORTY et al., 2017).

As principais saponinas esteroidais presentes nos extratos de *T. terrestris* são diosgenina, espirostanol, furostanol e protodioscina (HASHIM et al., 2014). Inúmeros efeitos e ações medicinais e farmacológicas são atribuídos a este grupo particular de saponinas, como atividades antioxidante, antibiótica, anticancerígena, anticarcinogênica, anti-helmíntica, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante e no tratamento de doenças cardíacas (MATSUURA, 2001; NEYCHEV, 2016). De modo geral, as saponinas também

apresentam uma ampla utilização na indústria de alimentos e cosméticos, por possuírem propriedades surfactantes, flavorizantes e por serem agentes espumantes (FUJIWARA, 2012).

Diante da diversidade e aplicabilidade do extrato e das saponinas presentes na espécie *T. terrestris*, além de suas ações farmacológicas e nutricionais, tanto como fitoterápico quanto suplemento alimentar, esta espécie vegetal tornou-se alvo de inúmeros estudos científicos que validam tais atividades e potenciais (MATSUURA, 2001; CONRAD et al., 2004; SISTO et al., 2006; CHU et al., 2012; YAZDI et al., 2014). Porém, a investigação do ponto de vista de potencialização e liberação de seus compostos ativos por meio de sistemas de liberação controlada ainda é insipiente ou mesmo ausente na literatura científica.

2.4 Saponinas

2.4.1 Distribuição de origem vegetal

As saponinas esteroidais e triterpênicas, apresentam distribuição diferenciada no reino vegetal. As saponinas esteroidais neutras são encontradas exclusivamente em monocotiledôneas, principalmente nas famílias *Liliaceae*, *Dioscoreácea* e *Agavaceae* e os gêneros *Smilax*, *Dioscorea*, *Agave*, *Yucca* são especialmente ricos nessas saponinas (CASTEJON, 2011).

Na alimentação humana, saponinas esteroidais são encontradas na aveia, pimenta, berinjela, semente de tomate, aspargos, inhame, feno-grego e ginseng (FRANCIS et al., 2002). As saponinas esteroidais básicas ou alcaloídicas são encontradas principalmente no gênero *Solanum*, pertencente à família *Solanaceae*.

As saponinas triterpênicas são encontradas predominantemente em dicotiledôneas, principalmente nas famílias *Sapindaceae*, *Hippocastanaceae*, *Sapotaceae*, *Polygalaceae*, *Caryophyllaceae*, *Primulaceae* e *Araliaceae* (WALLACE et al., 2017). Saponinas triterpênicas têm sido encontradas e estudadas em muitas leguminosas, como soja, feijões, ervilhas e também na acelga, alcaçuz, quinoa, girassol e ginseng. O grupo de triterpenóides mais estudado é obtido a partir da *Quillaja saponaria*, uma árvore nativa da região dos Andes, no Chile (ELEKOFEHINTI, 2015).

2.4.2 Caracterização e classificação

As saponinas são substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas, relacionadas, principalmente, com o sistema de defesa. São observadas nos tecidos que são mais vulneráveis ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório dos insetos (WINA et

al., 2005), considerando-se parte do sistema da defesa das plantas e indicadas como “fito protetoras” (PIZARRO, 1999). Essa atividade seria devido à interação com os esteróis da membrana (FRANCIS et al., 2002).

As saponinas são classificadas em triterpenos e esteroides, com base em seus esqueletos de carbono. São comuns em uma variedade de plantas superiores e possuem uma ampla gama de propriedades benéficas à saúde (YAN et al., 2015). Estes compostos são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos. É uma estrutura com caráter anfifílico, sendo parte da estrutura com característica lipofílica (triterpeno ou esteroide) e outra hidrofílica (açúcares). Essa característica determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergentes e emulsificantes que encontram inúmeras aplicações importantes em diversas áreas (alimentícias, farmacêuticas, cosméticas, entre outras) (SCHENKEL et al., 2001; PAGUREVA et al., 2016).

A classificação varia de acordo com o número fundamental da aglicona, e também conforme seu caráter ácido, básico ou neutro. Assim, quanto à aglicona, denominam-se saponinas esteroidais e saponinas triterpênicas. O caráter ácido ocorre pela presença de grupamento carboxila na aglicona ou na cadeia de açúcares. O caráter básico decorre da presença de nitrogênio, em geral sob forma de uma amina secundária ou terciária, como nos glicosídeos nitrogenados esteroidais (SCHENKEL et al., 2001).

Outra classificação refere-se ao número de cadeias de açúcares ligado na aglicona. Assim, saponinas monodesmosídicas possuem uma cadeia de açúcares, enquanto as saponinas bidesmosídicas possuem duas, a maioria com ligação éter na hidroxila em C-3, e a outra com ligação éster (WINA et al., 2005).

As atividades superficiais responsáveis pelas propriedades espumantes, bem como algumas outras funções biológicas, incluindo atividade hemolítica, são atribuídas a características estruturais das saponinas e a sua natureza anfifílica, que resulta da presença de uma porção de açúcar hidrofílico e uma genina hidrofóbica (chamada sapogenina). As saponinas podem possuir de um a três cadeias de açúcar linear ou ramificada, frequentemente compostas de d -glucose, l -rhamnose, d-galactose, d-ácido glucurônico, l -arabinose, d -xylose ou d -fucose. A cadeia de açúcar pode conter de um a vários resíduos de monossacarídeos e é geralmente anexada em C-3 (VINCKEN et al., 2007). O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolipídios de membranas possibilitam ações biológicas variadas (NAVARRO DEL HIERRO et al., 2018).

2.4.3 Diosgenina

A diosgenina, primeiramente descoberta por Fuji e Matsukawa, em uma *Dioscorea Tokoro Makino*, em 1935, é uma sapogenina esteroidal natural que ocorre predominantemente em inhame, feno-grego e *T. terrestris* (Figura 3). Na indústria farmacêutica, a diosgenina é o principal composto precursor na fabricação de esteroides sintéticos. Estudos nas últimas décadas demonstraram que a diosgenina tem efeitos preventivos / terapêuticos não apenas contra vários tipos de câncer, mas também contra outras doenças, como distúrbios cardiovasculares, diabetes tipo 2, distúrbios neurodegenerativos, doenças alérgicas, sintomas da menopausa e envelhecimento da pele. (DJERASSI et al., 1958; RAJU et al., 2008; YUE et al., 2010).

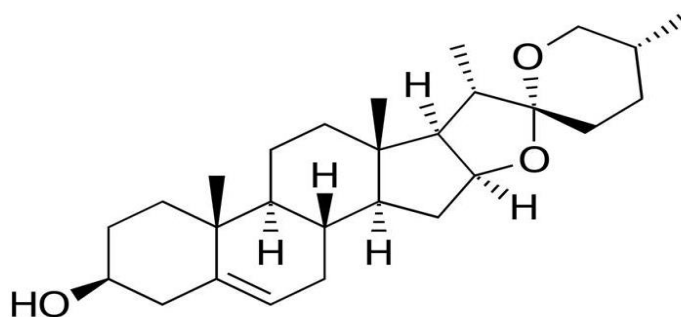


Figura 3. Estrutura química da diosgenina. **Fonte:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

A diosgenina é originada da hidrólise da saponina dioscina; possui uma cadeia lateral espirocetal ligada nas posições 16 e 17 do esterano e tem uma dupla ligação em 5-6, e tem um grupo hidroxila na 3ª posição. Grupos hidroxila são encontrados principalmente combinados com açúcares, tornando os compostos solúveis em água e altamente saponáceos (JESUS, et al., 2016). Refere-se a uma sapogenina esteroide isolada das plantas e estruturalmente semelhante ao colesterol (SHANMUGAM et al., 2017). Pode ser obtida inteiramente de fontes naturais (inhame), embora a síntese total de alguns fármacos esteroides tenha sido alcançada, até recentemente nenhum deles poderia competir com o método economicamente viável de isolamento da diosgenina a partir de compostos naturais (REBELO, 2011).

Esta saponina é uma precursora de hormônios sexuais (progesterona), corticosteroides (cortisona) e contraceptivos (MEDIGOVIC et al., 2014). Mais de 50 espécies foram cultivadas até agora para a extração comercial do composto. A diosgenina está entre as dez fontes mais importantes de esteroides e é também o medicamento de origem vegetal mais frequentemente prescrito. Outra ação deste composto é a indução de apoptose em células cancerígenas, por regulação positiva da ciclooxigenase, e em

células HeLa, pela via da caspase (SARKAR; MAHATO, 1984; HUO et al., 2004; CHEN et al., 2015).

Ainda possui propriedades antioxidantes e atividade anticolesterolêmica, além de estar envolvida na produção da Desidroepiandrosterona (DHEA), que é responsável pela formação de 50 hormônios no organismo, ajudando, assim, a prevenir o envelhecimento precoce das células e aumentar o nível do colesterol HDL do sangue (SHANMUGAM et al., 2017).

Vários estudos pré-clínicos investigaram os efeitos da diosgenina como agente quimiopreventivo/terapêutico contra diferentes tipos de câncer e isso demonstrou o alto interesse dessa molécula como potencial agente antitumoral (LÓPEZ et al., 2017; CHIANG et al., 2018).

O efeito anticancerígeno da diosgenina tem sido estudado em várias linhagens de células tumorais e foi evidenciado que esta bioatividade depende tanto do tipo celular quanto da concentração. Assim, por exemplo, a diosgenina tem atividade antiproliferativa, nomeadamente, no câncer da próstata (células PC-3 e DU-145); no carcinoma do cólon (células HCT-116 e HT-29); na eritroleucemia (células HEL); no carcinoma escamoso (células A431, Hep2, e RPMI 2650); no carcinoma hepatocelular (células HepG2 e HCC); no câncer gástrico (células BGC-823); no câncer de pulmão (células A549); no câncer de mama (MCF -7); e na leucemia mielóide crônica (LMC) humana (células K562) (LEPAGE et al., 2011; CHEN, TANG, 2015).

No que diz respeito a diabetes, a diosgenina pode ser útil no tratamento, promovendo a diferenciação dos adipócitos e inibindo a inflamação nos tecidos adiposos. Portanto, pode ser útil para melhorar a condição do paciente com desordem metabólica da glicose associada à obesidade (UEMURA, MIZOGUCHI, 2010).

A diosgenina livre de açúcar é utilizada para a síntese de cortisona, pregnenolona e progesterona. A diosgenina é uma precursora de vários hormônios, começando com o processo de degradação do marcador, e isso inclui a progesterona, que, por sua vez foi utilizada em pílulas contraceptivas orais combinadas precocemente (SATO et al., 2016). O esteroide não modificado tem atividade estrogênica e pode reduzir o nível de colesterol sérico. A diosgenina pode se comportar como pró-fármaco à progesterona (PABÓN et al., 2013; SHANMUGAM et al., 2017).

2.4.4 Protodioscina

A protodioscina é encontrada em várias espécies de plantas, principalmente nas dos gêneros *Tribulus*, *Trigonella* e *Dioscorea* (Figura 4). É considerada o composto ativo da *T. terrestris* com atividade afrodisíaca, pois atua sobre células de sertoli (produção de espermatozoides), proliferação de células germinativas e crescimento de túbulos seminíferos (GAUTHAMAN et al., 2002). Libera também óxido nítrico no tecido do corpo cavernoso (DINCHEV et al., 2008; SALGADO et al., 2016). Somados a isso, estudos com extratos padronizados contendo protodioscina demonstraram produzir efeitos pró-eréteis em tecidos isolados e ação afrodisíaca em várias espécies animais (WEST; KRYCHMAN, 2015). Esta atividade também pode estar associada à capacidade desta saponina em causar um aumento na imunorreatividade do receptor de androgênio, o que significa que aumenta a concentração de receptores androgênicos nas células, tornando o organismo mais sensível a andrógenos como a testosterona e a DHT (SALGADO et al., 2016).

A protodioscina foi sintetizada pela primeira vez a partir de diosgenina, o que garantiu o material para futuras pesquisas e aplicações em medicina, principalmente devido à eficácia deste composto na manutenção da pressão sanguínea saudável, melhorando, assim, o fluxo de sangue oxigenado aos órgãos sexuais, além de demonstrar também atividade anti-hiperlipidêmica, anticâncer e ação reparadora e protetora sobre lesão renal (WANG et al., 2010; ZHANG et al., 2016). Em estudos que avaliaram esta saponina para a atividade anticâncer *in vitro*, foi observada uma ação citotóxica em células de tumores sólidos, como as de cólon e mama. No entanto, este composto apresentou uma moderada citotoxicidade em células de leucemia (NING et al., 2015; SHEN et al., 2016).

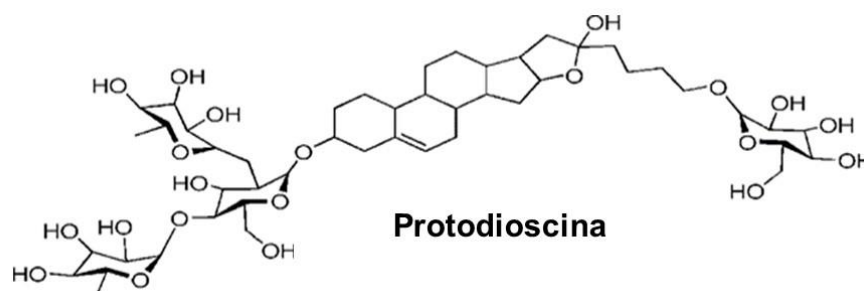


Figura 4: Estrutura química da protodioscina. **Fonte:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2.4.5 Furostanol

Estudos realizados com furostanol demonstraram efeitos anabólicos combinados com o controle dos níveis de colesterol por reduzir a concentração de colesterol plasmático, particularmente útil para atletas e pessoas submetidas a treinamento de força (SAUVAIRE et al., 1991, HASHIM et al., 2014; MOTAAL et al., 2015). O furostanol possui propriedades imunoestimulante, luteinizante e é capaz de aumentar os níveis de testosterona e espermatogênese, sem apresentar toxicidade hepática, renal e hematológica (MAJEED; PRAKASH, 2007; ZHOU et al., 2017). Esta saponina pode ser utilizada na indústria de alimentos, pois não é tóxica para os seres humanos, mesmo quando ingerida após isolamento das suas fontes naturais (SKHIRTLADZE et al., 2011; MOTAAL et al., 2015).

Na nutrição esportiva, os efeitos anabólicos das saponinas furostanólicas podem aumentar os níveis de testosterona, refletindo diretamente na deposição de proteína nos músculos, levando ao aumento da massa e força muscular (FARO e RUSSO, 2017). Esta saponina age sobre o comportamento alimentar e pode alterar funções endócrinas e metabólicas em ratos diabéticos levando a um ganho de massa muscular (PRAKASH; MAJEED, 2007; MOTAAL et al., 2015).

As saponinas furostanol podem ser definidas como saponinas bidesmosídicas que possuem duas cadeias de açúcares, sendo uma ligada em C3 e outra ligada através de uma ligação éter em C26 com uma D-glucose3 (Figura 5). Esta é precursora biogenética de seus análogos de espiros; as porções de açúcar das saponinas delas isoladas são oligossacarídeos, que contêm de 2 a 4 tipos diferentes de açúcares, a saber, glicose, rhamnose, galactose e xilose, dependendo da origem da planta (HASHIM et al., 2014).

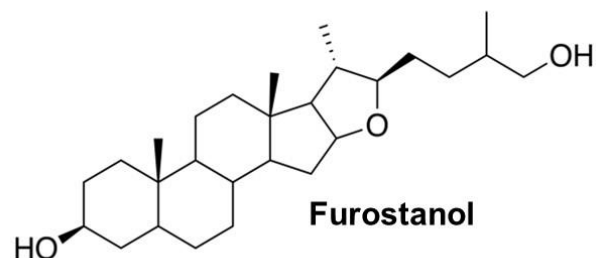


Figura 5: Chemical Structure of Furostanol Saponins. **Fonte:** <https://glosarios.servidor-alicante.com/quimica/saponina-esteroidal>

2.4.6 Espirostanol

Várias atividades biológicas são atribuídas aos espirostanos, derivadas de sua capacidade de complexação com esteroides, proteínas e fosfolipídios. Dentre as atividades biológicas apresentadas por estes metabólitos secundários destacam-se as atividades hemolítica, molusquicida, anti-helmíntica, espermicida, hipocolesteremiante e anti-inflamatória. Estas saponinas podem ser encontradas em diferentes espécies vegetais, como o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), o ginseng (*Panax ginseng*) e a calêndula (*Calendula officinalis*) (SCHENKEL et al., 2007; ZHU et al., 2015). A espécie *T. terrestris* é rica em saponinas esteroidais espirostanol, úteis na indústria de esteroides como matéria-prima para síntese de corticosteroides (NETO et al., 2006; HASHIM et al., 2014).

Trabalhos científicos têm demonstrado que a saponina espirostanol guarda associação com análogos da vitamina D e que também apresenta efeito citotóxico sobre culturas de células cancerígenas, principalmente devido à sinalização no processo de apoptose (QUAN et al., 2005; WANG et al., 2013). Além disso, características estruturais desta saponina vêm revelando uma atividade antifúngica significativa e de amplo espectro (CONRAD et al., 2003; SADEGHI et al., 2013). Em razão de suas semelhanças estruturais com esteroides animais, são usados na síntese de hormônios.

Os espirostanos têm uma estrutura com 27 átomos de carbono dispostos em seis anéis (A, B, C, D, E e F) e 4 metilações localizadas em átomos de carbono 10, 13, 20 e 25. A junção entre os anéis A e B pode ser *cis* ou *trans* (5 β ou 5 α), e os metilos nos carbonos 10 e 13 estão sempre na posição *p* (Figura 6). A junção entre os anéis A e B pode ser *cis* ou *trans* (5 β ou 5 α) e os metilos nos carbonos 10 e 13 estão sempre na posição *p*. Também apresentam um hidróxido de carbono em 3, onde eles estão ligados a carboidratos em saponinas.

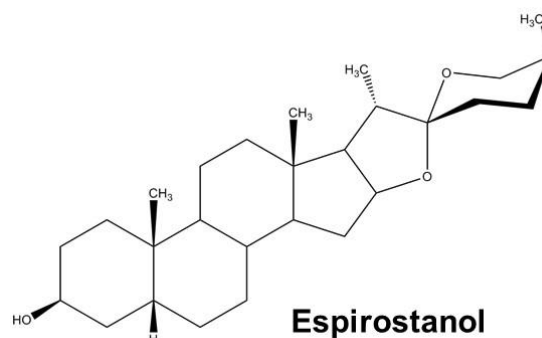


Figura 6: Estrutura geral dos espirostanos. **Fonte:** <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sarsasapogenina.png>.

2.5 Microencapsulação

Entre as tecnologias possíveis para o estudo da potencialização e da liberação de compostos ativos, a microencapsulação destaca-se, pois este processo resulta em maior proteção, melhora a especificidade do produto final, e otimiza a ação destes compostos em sítios alvo, devido ao fato, por exemplo, de alguns princípios ativos apresentarem comportamento instável na presença de outros compostos medicinais, alimentícios ou cosmetológico (VEN et al., 2012; FUJIWARA, 2012; SIMEONI et al., 2014).

A microencapsulação pode prolongar a estabilidade do composto e, conseqüentemente, o "*shelflife*" do produto, permitindo que seu valor medicinal e / ou nutricional não seja significativamente diminuído entre as datas de produção e de consumo (AZEREDO, 2005; KUANG et al., 2010).

Na indústria farmacêutica, a microencapsulação proporciona o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, cuja substância ativa protegida é liberada gradativamente por meio de estímulos adequados, tais como mudança de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução, entre outros (FREIBERG; ZHU, 2004; STORPIRTIS et al., 2009). Essa liberação controlada é um processo que está relacionado às formas farmacêuticas com liberação modificada, a qual pode ser retardada ou prolongada (SUAVE et al., 2009; STORPIRTIS et al., 2009). O controle da liberação do material encapsulado está diretamente relacionado ao material encapsulante, estrutura química, espessura, porosidade, solubilidade, tamanho e a distribuição dos poros nas micropartículas (CORRÊA, 2008).

Na indústria de alimentos, a microencapsulação permite a proteção de compostos voláteis responsáveis pelo aroma e sabor, corantes, acidulantes, enzimas, vitaminas, microorganismos probióticos e agentes antifúngicos (SANTOS et al., 2008; CORRÊA, 2008). No setor agroquímico, o processo permite a liberação controlada dos defensivos agrícolas, importante para evitar a sua utilização excessiva (SUAVE et al., 2006). (KRIS-ETHERTON et al., 2002; SECOLIN, 2014).

Atualmente, o desenvolvimento de alimentos funcionais por meio da adição de compostos bioativos detém muitos desafios tecnológicos. Muitos compostos bioativos são altamente lipofílicos e, conseqüentemente, apresentam baixa solubilidade em água, o que faz com que sua adição na maioria dos alimentos seja dificultada (SILVA et al., 2015; VIALTA e MADI et al., 2017). Além disso, a baixa solubilidade também significa menor absorção no trato gastrointestinal e, por conseguinte, sua biodisponibilidade torna-se limitada. Assim, na indústria alimentícia, tornou-se evidente a necessidade imediata do desenvolvimento de sistemas para proteger e liberar os compostos bioativos presentes

nos alimentos funcionais (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; DONSI et al., 2011; SILVA et al, 2015).

A microencapsulação é uma técnica relativamente recente. Trata-se de uma tecnologia que permite o revestimento fino de partículas sólidas, líquidas e dispersões, com um filme protetor. No entanto, vem ganhando espaço em aplicações nas mais diversas áreas, tais como a farmacêutica, alimentar e cosmética (SUAVE et al., 2006). Seu conceito tem como base a idealização do modelo celular, no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semipermeável que o protege do meio externo e, ao mesmo tempo, controla a entrada e saída de substâncias na célula (RÉ, 2006).

Assim, a microencapsulação compreende um processo em que ocorre a incorporação de substâncias de interesse (núcleo ou material ativo) em um sistema de revestimento (material de parede, carreador ou agente encapsulante), obtendo-se microcápsulas com um diâmetro que varia entre 1 e 1000 micrômetro (MADENE et al., 2006; OBEIDAT, 2009; TIWARI, et al., 2010).

As substâncias que serão encapsuladas se apresentam, geralmente, no estado líquido ou sólido, podendo também ser gasosas (TRINDADE et al., 2008). A tecnologia associada à modificação da liberação de princípios ativos, como fármacos e pesticidas, corantes, aromatizantes entre outros, é vasta. Entre essas tecnologias, os sistemas matriciais poliméricos são amplamente aplicados na forma de micropartículas (ARIYARATHNA et a., 2016; XIA et al., 2017).

As micropartículas são subdivididas em microesferas e microcápsulas, segundo a sua estrutura. São denominadas microesferas as partículas compactas constituídas por uma rede polimérica, na qual a substância ativa se encontra distribuída no seu estado sólido ou molecular. Já as microcápsulas são as partículas constituídas por um núcleo interno contendo o agente ativo recoberto por uma camada de polímero de espessura variável. A Figura 7 representa a estrutura de uma microesfera e de uma microcápsula (MATTÉ e ROSA, 2013; VESPERINI et al., 2017).

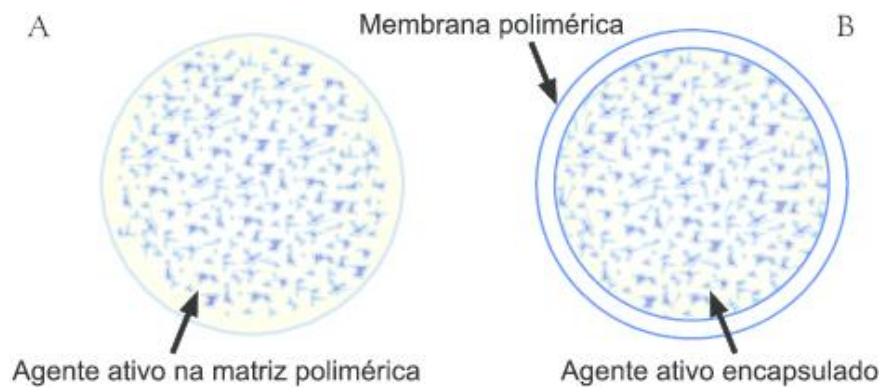


Figura 7 - Estrutura de micropartículas: (A) microesfera: o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica; (B) Microcápsula, o agente ativo está envolvido pelo agente encapsulante. **Fonte:** <https://www.researchgate.net/publication/228663357>.

Contudo, para que o processo de microencapsulação seja vantajoso para uma indústria, um dos cinco objetivos principais, quais sejam, imobilização ou aprisionamento de substâncias, proteção, liberação controlada, estruturação e funcionalização, deve ser atingido (PONCELET, 2006; YE et al., 2018).

Na indústria alimentícia, essa técnica tem solucionado limitações no emprego de ingredientes, visto que pode suprimir ou atenuar "*flavors*" indesejáveis, reduzir a volatilidade e a reatividade e aumentar a estabilidade destes em condições ambientais adversas, como na presença de luz, oxigênio e pH extremos (SILVA et al., 2015).

Diversos métodos químicos, físicos ou físico-químicos, podem ser utilizados na realização do processo de microencapsulação. A diferença entre eles está no envolvimento ou aprisionamento do material a ser encapsulado pelo agente encapsulante. Dessa forma, devem ser consideradas as propriedades físico-químicas do material a encapsular e do agente encapsulante, a aplicação e a finalidade, o tamanho, a textura e a forma das microcápsulas, bem como o mecanismo de liberação do material a ser encapsulado (BANSODE et al., 2013). Deste modo, o método de microencapsulação deve ser simples, reproduzível, rápido e fácil de transportar em escala industrial (SILVA et al., 2003).

No processo de microencapsulação tem se utilizado uma diversidade de agentes encapsulantes, responsáveis pelo revestimento dos compostos ativos e por conferir forma à microcápsula (AZEREDO, 2005; NUNES e MENEZES, 2015). Os agentes encapsulantes podem ser de origem natural, semissintética ou sintética, incluindo materiais poliméricos, hidrófilos, hidrófobos ou uma associação de ambos. Os agentes encapsulantes têm por função proporcionar proteção durante o armazenamento

prolongado, evitando que ocorram alterações químicas e sensoriais no material encapsulado (SOUZA et al., 2005; ANSON, 2005; ARPAGAUS et al., 2018).

Dentre os muitos agentes encapsulantes, as maltodextrinas são os materiais de parede predominantemente utilizados. São carboidratos provenientes da conversão enzimática do amido do milho e estão disponíveis em diferentes níveis de dextrose equivalente (DE), indicando o nível de hidrólise do polímero de amido. Possuem várias propriedades funcionais, como doçura, solubilidade e viscosidade (Figura 8) (GHARSALLAOUI et al., 2007).

A dextrose equivalente (DE) é uma medida que caracteriza a extensão da hidrólise do amido e também indica uma média do peso molecular. Conforme se aumenta o grau de hidrólise, a média do peso molecular diminui e a DE aumenta. Esta é uma medida essencialmente empírica da quantidade de açúcar redutor presente no produto (ARAUJO-DÍAZ et al., 2017). A dextrose usada como padrão é o amido (DE=0) e a glicose (DE=100), que nada mais é do que açúcares simples. Então, a definição de maltodextrina pode ser a de todo material que tenha um DE entre 3 e 20. A DE reflete, simplesmente, o poder de redução, e indica sua estabilidade e sua funcionalidade (PYCIA et al., 2017).

A maltodextrina consiste de uma mistura de sacarídeos com uma ampla distribuição do peso molecular entre polissacarídeos e oligossacarídeos e está disponível no mercado na forma de pó, podendo também ser encontrada como solução concentrada (CAMPELO et al., 2017).

O material microencapsulado é coberto por um filme que protege o núcleo. As maltodextrina de alta DE (15 a 20) protegem o aroma contra a oxidação, sugerindo a importância da DE na funcionalidade dos sistemas de encapsulamento, e pertencem às matrizes mais comumente utilizadas como agente microencapsulante na área de alimentos (OGASAVARA, 2004). Observa-se, também, que o material de parede, contendo maltodextrina, gema de ovo, gelatina e caseína, mostra ótima proteção contra a oxidação (GHARSALLAOUI et al., 2007).

As maltodextrinas com DE entre 10 e 20 são as mais indicadas na utilização para o encapsulamento de aromas, enquanto no encapsulamento de óleos essenciais são utilizadas misturas de maltodextrina com DE entre 5 e 15 e proteína (FERNANDES et al., 2017).

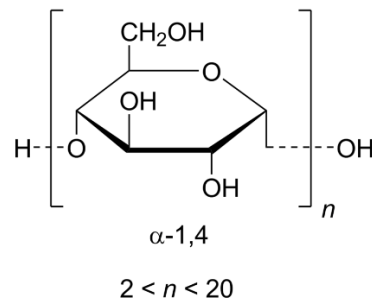


Figura 8. Estrutura química da maltodextrina.

Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/9b/Maltodextrin.png/800px-Maltodextrin.png>

Entre os agentes transportadores disponíveis, a maltodextrina é amplamente utilizada, considerando seu desempenho satisfatório, sabor suave, preço razoável e o fato de não apresentar doçura. Em geral, a alta solubilidade em água contribui para uma redução significativa da viscosidade aparente das gotículas, o que é favorável à liofilização (SILVA et al., 2015; VLADIĆ et al., 2016). A higroscopicidade, a eficiência de microencapsulação e a atividade antioxidante podem ser melhoradas com a adição de maltodextrina durante o processo de secagem e armazenamento. O aumento da DE aumenta igualmente a barreira de oxigênio e, portanto, a estabilidade oxidativa (ZHOU et al., 2017).

Entre os métodos existentes para secagem e estabilização das microcápsulas, a liofilização é um processo delicado de conservação devido as baixas temperaturas em que a secagem ocorre (BALLESTEROS et al., 2017). Este método consiste na secagem de um produto previamente congelado no qual a maior parte da água é removida por sublimação. O método gera produtos de excelente qualidade, uma vez que minimiza as alterações associadas a altas temperaturas (LACZKOWSKI, 2013). A mudança de estado físico da água pode resultar em produtos com maior suscetibilidade à oxidação (PINTO et al., 2015).

3. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e antiglicante de saponinas esteroidais de *T. terrestris*. Além disso, desenvolvimento de um sistema de liberação controlada do extrato rico em saponinas; quantificação dos polifenóis, flavonoides e saponinas totais por meio de técnicas espectrofotométricas e de análise em HPLC do extrato, e dos compostos liberados pelas microcápsulas.

4. Material e Métodos

4.1 Obtenção do extrato seco padronizado de *T. terrestris*

O extrato seco de *T. terrestris* foi obtido diretamente de fornecedores de matéria-prima farmacêutica. O extrato seco padronizado contendo 43,21% de saponinas totais foi adquirido acompanhado da certificação de qualidade físico-química e microbiológica. (cf. Anexo 1).

4.2 Obtenção do extrato enriquecido com saponinas de *T. terrestris*

Dez gramas do extrato seco padronizado de *T. terrestris* foi adicionado a 250 mL de clorofórmio, durante 1 h, sob agitação à temperatura ambiente. O extrato clorofórmico obtido foi filtrado e o material vegetal novamente extraído em aparelho Soxhlet, três vezes, sob refluxo, com 250 mL de etanol a 70% durante 1 hora. Os extratos foram reunidos, e o solvente removido em aparelho rotaevaporador sob pressão reduzida. A solução aquosa resultante foi congelada, liofilizada e armazenada, sendo esta metodologia realizada de acordo com Dinchev et al. (2008) e Ren et al. (2015). Após realização da extração e obtenção do extrato seco, o rendimento total de saponinas foi determinado em gramas.

4.3 Determinação de polifenóis, flavonoides e saponinas totais

4.3.1 Determinação de polifenóis totais

Para a determinação de polifenóis totais foi utilizado o método do reagente de *Folin-Ciocalteu* (molibdato, tungstato e ácido fosfórico), utilizando-se ácido gálico como padrão de comparação. A cada 0,5 mL de amostra (extratos) foram adicionados 5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de *Folin-Ciocalteu*. Após 3 minutos, foi adicionado 1 mL de solução de Na₂CO₃ saturada a 10% e a mistura ficou armazenada por 1 hora. A absorbância foi medida a 725 nm em espectrofotômetro. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido gálico por g de extrato seco. As concentrações avaliadas foram 1000 µg/mL para os extratos padronizado e enriquecido com saponinas. Para as microcápsulas a concentração foi de 10.000 µg/mL, assim como para o produto de liberação das microcápsulas.

4.3.2 Determinação de flavonoides totais

A determinação dos teores de flavonoides totais dos extratos foi quantificada por espectrofotometria, e as amostras foram preparadas de acordo a metodologia de Zhishen et al. (1999), baseado na complexação dos flavonoides com AlCl₃, ocorrendo o

deslocamento das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda. Uma alíquota de 250 µL dos extratos em diferentes concentrações foi misturada com 1,25 mL de água destilada e 75 µL de uma solução de NaNO₂ a 5%. Após 6 minutos, 150 µL de uma solução de AlCl₃/H₂O a 10% foi adicionada. Depois de 5 minutos, 0,5 mL da solução de NaOH 1M foi adicionada e, então, o volume total completado com 2,5 mL de água destilada. As amostras foram agitadas em vórtex; a absorbância, mensurada a 510 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados obtidos expressos em mg de rutina por g de extrato. As concentrações avaliadas foram de 1000 µg/mL para os extratos padronizado e enriquecido com saponinas.

4.3.3 Determinação de saponinas totais e preparo do extrato e padrões para análise em HPLC-DAD/MS

O extrato enriquecido com saponinas seco foi previamente preparado. Para tanto, 200 mg foram dissolvidos em 1,0 mL de Metanol PA grau HPLC. A solução foi levada ao banho ultrassônico por 5 min. Após dissolução do extrato em metanol, a amostra foi aplicada em cartucho de SPE de 0,45 µm (Macherey-Nagel Chromabond® C18 EC) para ser filtrado. Uma alíquota de 2 µL foi injetada no sistema de análise LC/DAD/MS para coleta dos dados cromatográficos.

Para preparação dos padrões de saponinas, a diosgenina foi diluída em 1 mL de etanol grau HPLC, com a concentração final de 2,6 mg/mL, e com o auxílio de ultrassom e centrifugação por 2 min a 100 rpm, utilizando para a análise o sobrenadante. O padrão de protodioscina foi diluído em 1 mL de etanol grau HPLC, com a concentração final de 1 mg/mL.

Para infusão direta dos padrões em Espectrometria de Massa foi utilizado um eppendorf de 2 mL, 5 µL da solução obtida na preparação para o HPLC. Estas foram diluídas em 995 µL de solução de infusão Metanol: Água (1:1).

A análise foi realizada utilizando um HPLC Shimadzu® Prominence: sistema modular binário, contendo: duas bombas LC-20AD, desgaseificador de fase móvel DGU-20A3R, amostrador automático SIL-20AHT, forno para colunas CTO-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A e software Bruker Daktonics, DataAnalysis, Versão 4., acoplado a um espectrômetro de massas: Bruker® Amazon, com configuração ESI-IT-MS.

A separação por HPLC foi realizada em uma coluna Luna C18 (250 x 4.6 mm 5 µm) (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). Fase móvel: acetonitrila + 0,1% Ác. Fórmico (A) e Água + 0,1 % de Ác. Fórmico. Gradiente: 05-100% de A em B em 40 min. A cromatografia

foi realizada a 40°C com fluxo de 1 mL/min. As amostras foram monitoradas por detector PDA na faixa de 200-800 nm.

Os parâmetros de ionização foram: tensão capilar 4500V; tensão da placa final - 500 V; nebulização de gás de nitrogênio a 50,0 p.s.i.; gás de secagem de 10l/min de nitrogênio a 300°C. A faixa de aquisição foi de 50 a 1500 m/z. Os espectros de MS-MS foram gravados no modo auto-MS-MS. A amplitude de fragmentação foi ajustada para 1,0 V. Os espectros de massa foram adquiridos simultaneamente usando ionização por eletropray nos modos de ionização positiva.

4.4 Microencapsulação

4.4.1 Microencapsulação dos extratos em Maltodextrina

A metodologia utilizada na microencapsulação do extrato padronizado e enriquecido contendo saponinas de *T. terrestris* foi realizada de acordo com a proposta por Laczkowski (2013) com adaptações laboratoriais. Foram preparadas soluções contendo 0,5, 1,0 e 2,0 gramas de extrato, dissolvido em 5 mL de etanol, formando soluções de 10%, 20% e 40%. Em seguida, foram pesadas as quantidades de 5, 10 e 20 gramas de maltodextrina DE20, dissolvida em 80 mL de água destilada a 60°C. Após a dissolução completa da maltodextrina, a solução foi resfriada a temperatura ambiente, sendo adicionada a solução contendo o extrato. A solução foi agitada separadamente em agitador mecânico por um período de 30 minutos a 2500 rpm. Após o período de agitação, a solução contendo as microcápsulas foi concentrada em rotaevaporador. Cada uma das soluções, obtidas com as respectivas proporções, de ambos os extratos, foi previamente congelada e submetida a processo de secagem em liofilizador. Após o período de secagem, obteve-se um pó seco e fino, por meio de moagem do liofilizado. Os pós de maltodextrina com as microcápsulas foram avaliados por meio dos testes antioxidante do DPPH e FRAP, de acordo com a descrição efetuada nos subitens 3.5.1 e 3.5.2, respectivamente, e foram determinados os polifenóis totais conforme indicado no subitem 3.3.1.

4.4.2 Avaliação das microcápsulas

4.4.2.1 Eficiência da encapsulação de acordo com compostos fenólicos (%).

Foi considerada como eficiência de encapsulação a relação existente entre a quantidade de compostos fenólicos não encapsulados, presentes na superfície das micropartículas, e o total de compostos fenólicos que foi microencapsulado. O experimento para determinar a eficiência da encapsulação foi dividido em duas partes,

sendo a primeira a de extração dos compostos fenólicos que não foram microencapsulados, e a segunda, após a ruptura e liberação das micropartículas, para quantificação dos compostos fenólicos que nelas estavam contidos. A eficiência de encapsulação foi calculada utilizando-se a seguinte equação: Eficiência de encapsulação (%) = (FT- FS) / ST x 100, onde ST (polifenóis totais após a ruptura) é a quantidade de compostos polifenólicos de uma quantidade conhecida de microcápsulas e FS (compostos polifenólicos da superfície), a quantidade de compostos fenólicos (saponosídico) contida na mesma quantidade de microcápsulas.

4.4.2.2 Ruptura das micropartículas para liberação dos compostos

Para a liberação dos ativos das microcápsulas produzidas com maltodextrina D20 (ME20), sua estrutura de revestimento foi completamente rompida de acordo com método proposto por Robert et al. (2010), com adaptações. As microcápsulas foram pesadas de acordo com o teor de sólidos totais (ST), onde $ST = [(MD20 + Extrato\ TT) - MD20\ inicial]$. As microcápsulas foram dispersas em 1 mL de solução de etanol, ácido acético e água (50:8:42 v/v/v). Esta dispersão foi agitada utilizando-se o agitador Vórtex por 1 minuto e, em seguida, sonicada com frequência de 50Hz, duas vezes por 20 min (com intervalo de 5 minutos). O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 G durante 5 min e, em seguida, filtrado em filtro Millipore (0,45 µm). A solução resultante da liberação das microcápsulas foi avaliada por meio dos testes antioxidante do DPPH e FRAP, de acordo com a descrição realizada nos subitens 3.5.1 e 3.5.2, respectivamente, e foram determinados os polifenóis totais, conforme subitem 3.3.1.

4.4.2.3 Análise das microcápsulas por diferencial de varredura em espectrofotometria

A análise das microcápsulas por diferencial de varredura em espectrofotômetro foi executada de acordo com a metodologia empregada por Soudaleff et al., (2013), para a determinação do pico de absorção das microcápsulas. As mesmas foram diluídas em água e etanol PA na concentração de 0,05 g/mL para cada formulação de microcápsulas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas para leitura em espectrofotômetro UV-VIS, com absorbância de 200 a 800 nm e com intervalo de 50 nm, utilizando-se como branco a solução de água e álcool etílico PA. Como padrões de varredura foram utilizados maltodextrina e extrato padronizado seco de *T. terrestris*. Os espectros foram realizados em triplicata. Todos os procedimentos foram mantidos protegidos da luz.

4.4.2.4 Análise estrutural das microcápsulas em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A estrutura e a morfologia das microcápsulas foram observadas em MEV. Para tanto, pequenas quantidades de amostras de microcápsulas foram colocadas na superfície de fita dupla face e fixadas em "stubs". A amostra foi observada sistematicamente sob ampliações a 1500, 2000, 3000 e 4000 vezes.

4.5 Avaliação da Atividade Antioxidante para os extratos (padronizado e enriquecido); microcápsulas contendo os extratos e produto da liberação das microcápsulas

4.5.1 Atividade sequestradora do radical DPPH

A atividade antioxidante do extrato para o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi avaliada conforme metodologia descrita por Blois, (1958). Os experimentos foram realizados em triplicata para fins estatísticos, utilizando-se a solução de 1 mL de tampão acetato (pH 5,5 e 100 mM), 1,25 mL de etanol P.A., 250µL de solução de DPPH (500 µM) e 50 µL das amostras. Os extratos reagiram com o radical DPPH por um período de 30 minutos em ambiente de pouca luminosidade e em seguida foram submetidos ao espectrofotômetro UV-Vis a um comprimento de onda de 517 nm. O cálculo da atividade antioxidante foi efetuado de acordo com a fórmula: Atividade antioxidante (%) = $[(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$, onde A_{controle} é a absorbância do controle (contêm todos os reagentes exceto a amostra) e A_{amostra} é a absorbância da amostra após 30 minutos. O ácido gálico foi aplicado como controle positivo na concentração de 100 µg/mL.

As concentrações avaliadas dos extratos padronizado e enriquecido com saponinas foram de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL. Já para as microcápsulas e para o produto de liberação das microcápsulas, a concentração foi de 10.000 µg/mL.

4.5.2 Poder de redução do Ferro (FRAP)

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP Ferric Reducing Antioxidant Power) (RUFINO et al., 2006), o reagente FRAP foi preparado no momento da análise, por meio da mistura na concentração de 10:1:1 de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e FeCl₃ (20 mM) em solução aquosa, respectivamente. Uma alíquota de 90 µL da solução de extrato foi adicionada a 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP e incubada

a 37°C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo a 595 nm e o espectrofotômetro zerado com o reagente FRAP. Os resultados foram expressos em μM equivalente de Trolox (ET) por g de extrato seco.

As concentrações avaliadas dos extratos padronizado e enriquecido com saponinas foram de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Já para as microcápsulas e para o produto de liberação das microcápsulas, a concentração foi de 10.000 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.3 Inibição da peroxidação lipídica

Para a avaliação da capacidade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica foi empregada a metodologia do TBARS (tiobarbituric acid reactive species), descrita por Guimarães et al. (2010), com algumas modificações. A gema de ovo foi homogeneizada (1%, p/v) em tampão PBS (20 mM / pH 7,4). Deste homogenato, 1 mL foi sonificado e homogeneizado com 0,1 mL dos extratos padronizado e enriquecido com saponinas diluídos em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) ou controle positivo (Trolox 140 $\mu\text{g/mL}$). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH; 0,12 M), durante 30 min em banho-maria a 37°C. Após o resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionadas as reações 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%), aquecidos em banho-maria a 97°C por 15 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos e, em seguida, incubadas em banho-degelo por mais 15 minutos. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 532 nm, e os resultados, expressos em porcentagem de TBARS formadas apenas por AAPH sozinho (controle positivo de lipoperoxidação).

4.5.4 Atividade sequestradora de óxido nítrico

Para a avaliação da capacidade sequestradora de óxido nítrico (NO), utilizou-se a metodologia descrita por Marcocci et al. (1994), com modificações. O NO foi gerado por decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato salino (PBS) e quantificado pela reação colorimétrica de Griess, onde ocorre a formação de um cromóforo róseo durante a diazotação do nitrito com a sulfanilamida e a subsequente complexação com o naftiletilenodiamino (Green et al., 1982). Uma mistura reacional contendo 320 μL de solução dos extratos padronizado e enriquecida com saponinas diluídas em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), 360 μL NPS (25 mM/ PBS pH 7,4) e 215 μL de reagente de Griess foi adicionada em tubos de ensaio e incubada em banho-maria a 37°C por 2 horas, na ausência de luz. A

absorbância do teste foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados alcançados foram submetidos a uma equação da reta, obtida pela regressão linear de uma curva de calibração padrão de nitrito de sódio, atingida sob as mesmas condições do teste, e os resultados foram expressos em quantidade de nitrito formado ($\mu\text{M}/\text{mL}$).

4.5.5 Método hemolítico

4.5.5.1. Obtenção de Eritrócitos

Todos os procedimentos realizados neste protocolo de estudo receberam aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Câmpus Assis – SP (Processo nº 833.386, aprovado em 16/09/2014) (**Anexo 2**). O sangue foi coletado em tubos com EDTA de um voluntário sadio, do sexo masculino, por punção venosa, com idade variando entre 30 e 40 anos. Logo após, centrifugou-se o material (2500 rpm/5min, a temperatura ambiente) para se alcançar a fração correspondente aos eritrócitos. Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução tampão PBS (pH=7,2) por meio do processo de centrifugação (2500 rpm/5min). Posteriormente, realizou-se a diluição para a obtenção da suspensão de eritrócitos a 10% em tampão PBS.

4.5.5.2 Ensaio de hemólise oxidativa

Para o ensaio de hemólise oxidativa recorreu-se ao método descrito por Yang et al. (2006) e Banerjee et al. (2008), com modificações. Uma suspensão de eritrócitos a 10% foi incubada com AAPH (50 mM) na presença ou ausência dos extratos em diferentes concentrações (extratos padronizados foram de 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e extrato enriquecido com saponinas 3000, 5000 e 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 6 horas em banho-maria a 37°C. A cada 60 minutos, alíquotas de 400 μL foram retiradas, transferidas para tubos eppendorf, centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura espectrofotométrica do sobrenadante. A hemólise pôde ser determinada pela leitura da absorbância de hemoglobina a 540 nm e calculada de acordo com a equação: Hemólise (%) = $[(A_{\text{amostra}} - A_{\text{controle negativo}}) / (A_{\text{controle positivo}} - A_{\text{controle negativo}})] \times 100$, onde A_{amostra} é a absorbância do teste na presença do extrato; $A_{\text{controle positivo}}$ é a absorbância do controle positivo (suspensão de eritrócitos 10% + AAPH 50 mM) e representa 100% de hemólise; $A_{\text{controle negativo}}$ é a absorbância do controle negativo (suspensão de eritrócitos 10% + tampão PBS) e representa ausência de hemólise. Realizou-se o experimento em triplicata para a análise estatística e os resultados foram expressos em porcentagem de hemólise.

4.6 Avaliação da atividade antiglicante

4.6.1 Mobilidade relativa em eletroforese (MRE)

A MRE pôde ser avaliada de acordo com a metodologia descrita por Miura et al. (1994). O BSA (0,3 mg/mL de proteína) foi diluído em 10 mM tampão fosfato (PBS), ribose (400 mM) e aminoguanidina (1 mM) a 37°C durante 24h, na presença e ausência dos extratos (0,1 mg/mL). A SDS-PAGE foi realizada com 5% de gel de empilhamento e 8% de gel de separação. Uma alíquota de solução de BSA glicada foi misturada com um volume igual de SDS tampão de amostra (20 mg/mL de SDS, 30% glicina, 0,25 M tampão Tris-HCl, pH 6,8) e fervida por 3 minutos. Da solução mista, 15 µL foram aplicados no gel de empilhamento, e executou-se o gel de separação em uma corrente constante de 30 mA, por aproximadamente 3 horas. Após a finalização da eletroforese, foi fixado o gel com ácido acético e, em seguida, corado com Coomassie-Blue (R-250). Os resultados foram observados na MRE empregando-se o BSA nativo como base. As concentrações finais de aminoguanidina (1 mM) e de BSA (0,3 mg/mL de proteína, sem adição do extrato) foram utilizadas como os controles positivos e negativos, respectivamente.

4.6.2 Determinação de grupos de amina livres

Os grupos de aminas livres das amostras glicadas foram determinados pelo método de ortoformaldaldeído (OPA) (FAYLE et al., 2001; LEDESMA-OSUNA et al., 2008). O reagente OPA foi preparado com 25 mL de borato de sódio 0,1 M; 2,5 mL de SDS a 20%; 100 µL de 2-mercaptoetanol; 40 mg de OPA (dissolvido em 1 mL de metanol) e ajustado a um volume de 50 mL com água destilada. Uma alíquota das amostras, depois de aquecidas, passada por diálise por 24 horas e contendo 50 µg de proteína foi misturada com 1 mL de reagente OPA, incubada durante 2 minutos à temperatura ambiente; em seguida, mensurou-se a absorção a 340 nm contra um branco contendo o reagente OPA. O BSA tratado com ribose foi considerado tendo máxima redução de grupos amina disponíveis. Para a determinação da atividade utilizou-se a fórmula, expressa em porcentagem de redução de glicação, $RG\% = ((Abs_{amostra} - Abs_{controle}) / Abs_{controle}) \times 100$, onde $Abs_{amostra}$ é o tratamento que inclui BSA com ribose e o agente antiglicante (Aminoguanidina ou extrato), e $Abs_{controle}$ é o tratamento com BSA e ribose apenas.

4.6.3 Determinação da fluorescência de AGEs

A mesma mistura reacional utilizada para determinação de aminas livres foi incubada em estufa a 37°C por 7 dias. A formação de AGEs foi determinada pela medida de suas características fluorescentes utilizando a excitação e emissão máxima de 360 e

460 nm, respectivamente. A leitura foi realizada em duplicata e os resultados expressos por porcentagem de inibição de formação de AGEs.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados pelo software BioEstat, versão 5.0, por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey como *post hoc* teste. Em todos os casos, as diferenças puderam ser consideradas significativas quando $p < 0,5$.

5. Resultados e Discussão

5.1 Rendimento de compostos saponínicos do extrato enriquecido

Após realização da extração direcionada para obtenção do extrato enriquecido com saponinas, o rendimento total do extrato seco foi de 2,45 g de extrato, de acordo com o método descrito no subitem 3.2. Resultados de rendimento semelhantes foram demonstrados por Dinchev et al. (2008) e Ren et al. (2015), que padronizaram a metodologia de enriquecimento com saponinas em extratos de *T. terrestris*.

5.2 Determinação de polifenóis, flavonoides e saponinas totais

Na tabela 1 estão apresentados os valores da determinação de polifenóis e flavonoides totais presentes nos extratos padronizado e enriquecido com saponinas. Tanto para o extrato padronizado como para o enriquecido com saponinas foram avaliados o conteúdo total de polifenóis e flavonoides na concentração de 1000 µg/mL. O extrato padronizado de *T. terrestris* apresentou 220,58 mg de polifenóis totais, equivalentes ao ácido gálico/g de extrato, e 25,67 mg de flavonoides totais, equivalentes a rutina/g de extrato. Para o extrato enriquecido com saponinas, foram obtidos 258,00 mg de polifenóis totais, equivalentes ao ácido gálico/g de extrato, e 155,13 mg de flavonoides totais, equivalentes a rutina/g do extrato. O extrato enriquecido apresentou aproximadamente 17% a mais de compostos polifenólicos; porém, a extração utilizada para a sua obtenção visou o enriquecimento dos compostos saponosídicos. Contudo, para a determinação de flavonoides totais foi observado um aumento de 6 vezes para o extrato enriquecido em comparação ao extrato padronizado, demonstrando, assim, que a extração direcionada para compostos saponosídicos também resultou no aumento de flavonoides totais neste extrato. Resultados semelhantes foram observados por Granato et al, (2013); Cartaxo-Furtado et al. (2015) e Qasim et al. (2017), que demonstraram a

presença de diferentes compostos polifenólicos, entre eles, os flavonoides em extratos desta espécie.

Tabela 1 – Determinação do conteúdo polifenólico e flavonoides totais nos extratos padronizado e enriquecido com saponinas de *T. terrestris*.

<i>Tribulus terrestris</i> (1000 µg/mL)	Polifenóis Totais (mg EAG/g* de extrato seco)	Flavonoides Totais (mg ER/g** de extrato seco)
Extrato padronizado	220,58	25,67
Extrato enriquecido	258,00	155,13

* EAG = Equivalente a Ácido gálico; ** ER = Equivalente Rutina

As saponinas totais do extrato enriquecido foram determinadas por HPLC-MS. Os perfis estão apresentados na Figura 9, assim como a detecção da presença de outros compostos, como flavonoides e açúcares. Foi possível observar a presença das saponinas protodioscina e diosgenina descrevendo o mesmo tempo de retenção e peso molecular que os padrões utilizados. Além destas duas saponinas, foi observada também a presença da hecogenina e gitogenina, tanto em perfil cromatográfico quanto peso molecular avaliado em espectro de massa, sendo que esta última se apresentou como saponina majoritária no extrato enriquecido. Resultados semelhantes foram relatados por Mulinacci et al. (2003); Niño et al. (2007); Ivanova et al. (2014), utilizando extratos obtidos de diferentes partes vegetais da espécie *T. terrestris*.

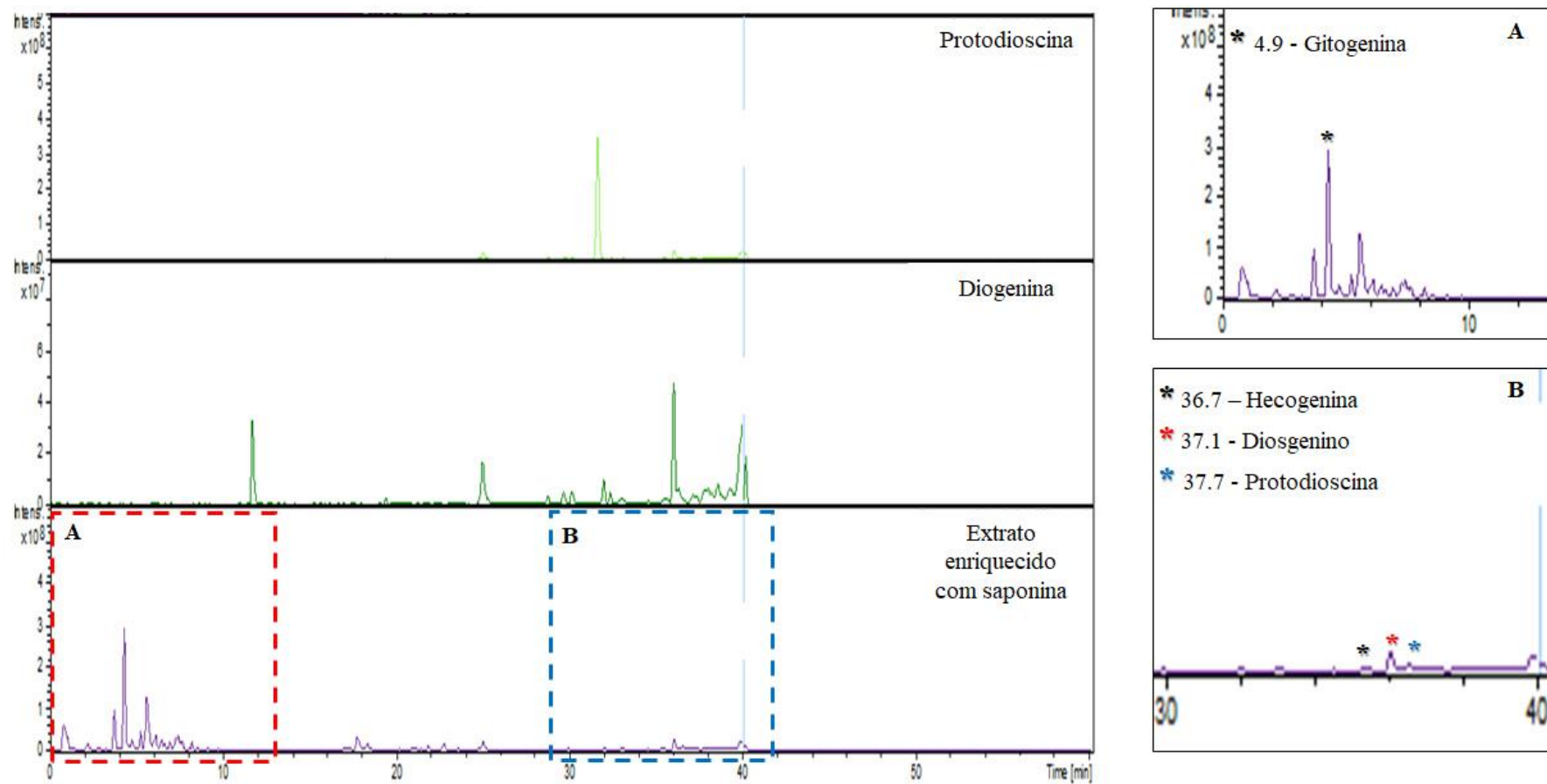


Figura 9: Perfil cromatográfico por HPLC/MS do extrato enriquecido com saponinas de *T. terrestris*. A – perfil da Gitogenina; B – perfis da Hecogenina, Diosgenina e Protodioscina

5.3 Eficiência da encapsulação de acordo com compostos polifenólicos totais

Na tabela 2 estão expressos os valores da porcentagem de eficiência de encapsulação do extrato padronizado de *T. terrestris*, de acordo com a determinação do conteúdo de polifenólicos antes de encapsular, encapsulado e após a liberação das microcápsulas. Foi possível constatar que o protocolo utilizado para o processo de encapsulação do extrato obteve eficiência variando entre a porcentagem de extrato e maltodextrina, sendo que a maior eficiência foi observada para a diluição de 2 g do extrato padronizado de *T. terrestris*, onde a eficiência média foi de 90,44%, levando-se em consideração as diferentes diluições de maltodextrina. Foi possível notar que a diluição somente contendo maltodextrina não apresentou conteúdo de polifenólicos detectado pelo método de determinação utilizado neste estudo. Semelhantemente, na tabela 3 estão expressos os valores da porcentagem de eficiência de encapsulação do extrato enriquecido com saponinas de *T. terrestris*. No entanto, foram avaliadas somente as diluições de 0,5 g de extrato e 5 g de maltodextrina, e 1,0 g de extrato e 10 g de maltodextrina, nas quais foi possível observar uma eficiência de 100% de encapsulação para ambas diluições. É possível constatar também que o conteúdo de polifenólicos após a ruptura e liberação das microcápsulas foi maior que o extrato sem encapsular. Este aumento pode estar relacionado com a liberação de compostos polifenólicos durante a realização do protocolo de liberação e com a maior concentração de polifenóis e flavonoides observada no extrato enriquecido em comparação ao extrato padronizado (Tabela 1). Resultados semelhantes de eficiência de encapsulação foram demonstrados por Robert et al. (2010) e Negrão-Murakami et al. (2017), que estudaram a eficiência e estabilidade de microcápsulas de maltodextrina contendo diferentes compostos polifenólicos (óleos essenciais, terpenos, saponinas, flavonoides e taninos).

Tabela 2 - Determinação da porcentagem de eficiência de encapsulação do extrato padronizado de *T. terrestris*, obtida por meio da dosagem dos compostos polifenólicos totais, antes de encapsular, encapsulado e após a liberação das microcápsulas, em diferentes diluições de extrato e maltodextrina.

Extrato padronizado (10000 µg/mL) + MD ₂₀ (g)	Polifenóis totais (mg EAG/g [*])			% Eficiência Encapsulação
	Sem encapsular	Encapsulado	Liberado	
0,5 + 5	10,01	2,20	9,33	71,22
0,5 + 10	5,20	-	4,10	78,84
0,5 + 20	1,86	-	1,20	64,51
1,0 + 5	15,50	-	15,21	98,00
1,0 + 10	4,20	-	3,52	83,80
1,0 + 20	9,10	2,30	5,25	32,41
2,0 + 5	29,24	-	26,40	90,28
2,0 + 10	26,30	-	25,90	98,47
2,0 + 20	18,90	1,99	17,60	82,59
0,0 + 5,0	-	-	-	-
0,5 + 0,0	135,20	-	-	-

* EAG = Equivalente a Ácido gálico de extrato seco

Tabela 3 - Determinação da porcentagem de eficiência de encapsulação do extrato enriquecido com saponinas de *T. terrestris*, obtida por meio da dosagem dos compostos polifenólicos totais, antes de encapsular, encapsulado e após a liberação das microcápsulas, em duas diluições de extrato e maltodextrina.

Extrato enriquecido (10000 µg/mL) + MD ₂₀ (g)	Polifenóis totais (mg EAG/g [*] de extrato seco)			% Eficiência Encapsulação
	Sem encapsular	Encapsulado	Liberado	
0,5 + 5	15,20	-	82,6	100
1,0 + 10	6,80	-	29,6	100
0,0 + 5,0	-	-	-	-
0,5 + 0,0	235,00	-	-	-

* EAG = Equivalente a Ácido gálico

5.4 Análise das microcápsulas por diferencial de varredura em espectrofotometria

Nas figuras 10 e 11 estão apresentados os valores das absorvâncias pelo comprimento de onda alcançados no espectrofotômetro de varredura para as microcápsulas obtidas com extrato padronizado de *T. terrestris*, diluídas em água e etanol PA, respectivamente, na concentração de 10.000 µg/mL e em diferentes diluições em proporção de extrato com maltodextrina. Para o extrato padronizado e diluído em água

(Figura 10), é possível perceber uma absorbância seguida de espalhamento de luz em comprimento de onda menor que a luz visível, estando na região do ultravioleta (200 a 400 nm). De acordo com o comportamento espectrofotométrico da absorbância, é possível constatar que a solução encontra-se com grande número de partículas dispersas, dificultando a propagação da luz pelo meio, evidenciando, assim, a baixa diluição das microcápsulas contendo extrato.

Para as microcápsulas de extrato padronizado diluído em etanol (Figura 11), o perfil de varredura demonstra que a absorbância e o espalhamento de luz foi menor, principalmente em comparação com o extrato padronizado, sem incorporação da maltodextrina, evidenciando, desse modo, a alta capacidade de diluição das microcápsulas no etanol. Este método de análise de diluição de partículas está de acordo com o descrito por Paschoal et al., (2003), e os resultados obtidos com os compostos polifenólicos encapsulados estão em conformidade com Silva et al., (2013) e Matos et al., (2016), que demonstraram o comportamento de diluição de diferentes compostos polifenólicos pelo perfil espectrofotométrico de varredura. Ainda sobre a capacidade de diluição do extrato padronizado e diluído em etanol, é possível observar que a maltodextrina DE20, além de promover a encapsulação, aumentou a capacidade de diluição do extrato e de seus componentes.

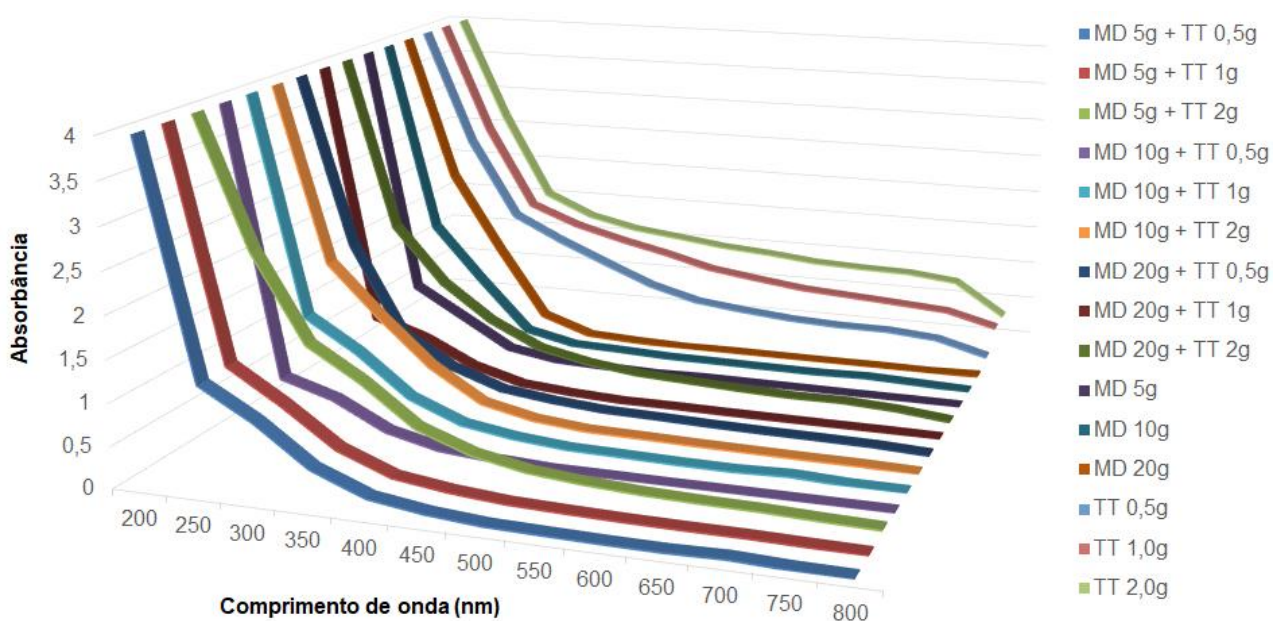


Figura 10: Valores das absorbâncias, pelo comprimento de onda, alcançados no espectrofotômetro de varredura para as microcápsulas obtidas com extrato padronizado de *T. terrestris* (10.000 µg/ mL), diluídas em água em diferentes diluições em proporção de extrato com maltodextrina.

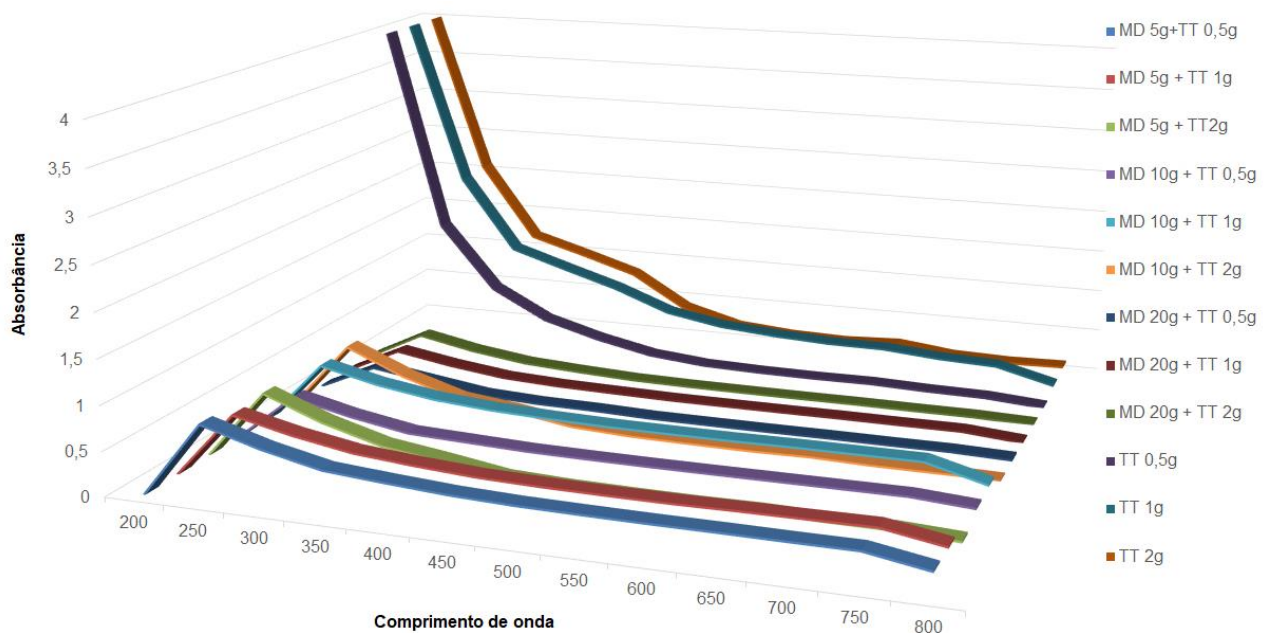


Figura 11: Valores das absorbâncias, pelo comprimento de onda, alcançados no espectrofotômetro de varredura para as microcápsulas obtidas com extrato padronizado de *T. terrestris* (10.000 µg/mL), diluídas em etanol em diferentes diluições em proporção de extrato com maltodextrina.

5.5 Análise estrutural das microcápsulas em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na figura 12 são exibidas as imagens correspondentes às partículas produzidas com diferentes concentrações de extrato enriquecido em saponinas e maltodextrina. De modo geral, as microcápsulas revelaram formato com superfícies irregulares, havendo um espaçamento entre elas, o que é característico das partículas produzidas pelo processo de liofilização. Para obter os espectros de absorção óptica, a frequência de modulação da luz foi fixada em 25Hz. O tamanho variou entre 10 µm e 100 µm e aumentos de 500 e 2000 vezes. Maiores concentrações de maltodextrina resultaram em uma melhor visualização e regularidade na estrutura das microcápsulas, como pode ser constatado nas figuras 12 C e 12 D. Resultados semelhantes foram observados por Tonon et al. (2009); Ferrari et al. (2012) e Santiago-Adame et al. (2015), que apresentaram a microestrutura das microcápsulas formadas por maltodextrina, porém obtidas a partir da técnica de spray dryer.

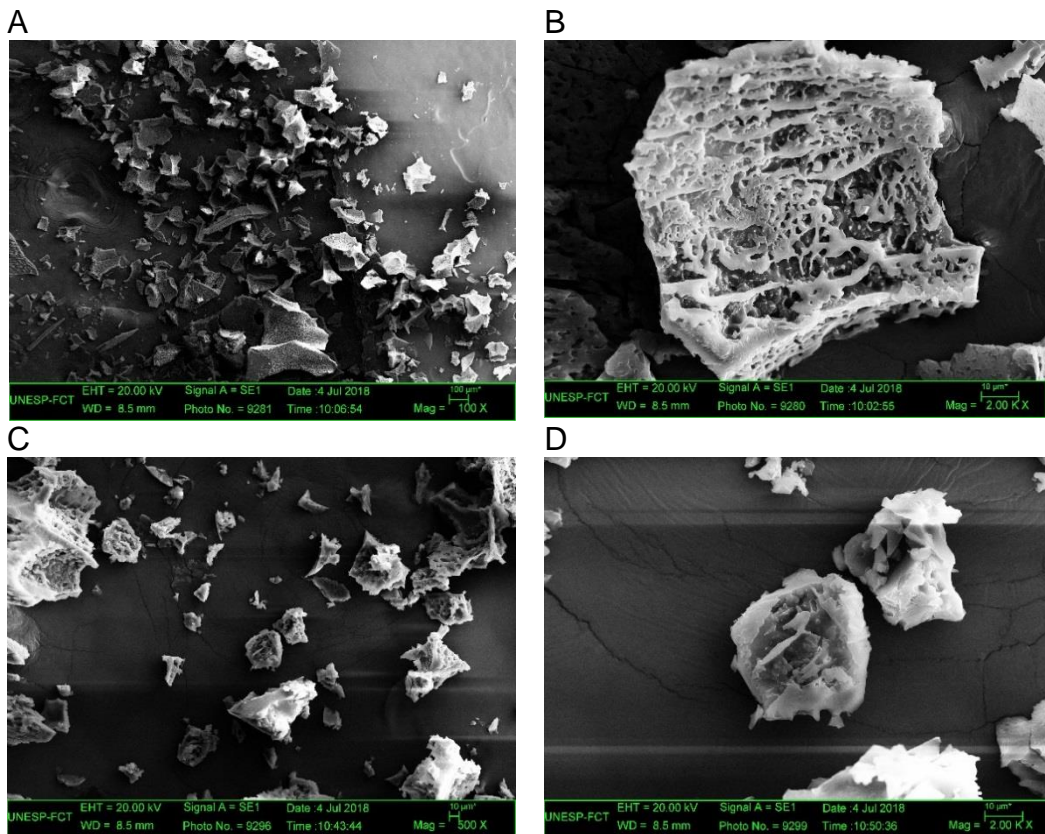


Figura 12: Micrografias eletrônicas das microcápsulas de maltodextrina DE20 contendo extrato enriquecido em saponinas de *T. terrestris* em diferentes concentrações: A e B= 0,5 g de extrato + 5,0 g de Maltodextrina, e C e D= 1,0 g de extrato + 10 g de maltodextrina, em diferentes aumentos, quais sejam, A e C em 500 vezes e B e D em 2000 vezes.

5.6 Atividade antioxidante para os extratos padronizado e enriquecido (DPPH, FRAP, TBARS e NO)

Para o teste antioxidante por meio da atividade sequestradora do radical DPPH, utilizou-se o extrato padronizado diluído em diferentes concentrações, que variaram de 5 a 1000 $\mu\text{g/mL}$. A tabela 4 mostra que as maiores atividades antioxidantes foram observadas nas concentrações de 500 (82,22%) e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (92%). Quanto ao controle positivo (ácido gálico), percebeu-se uma atividade de 74,56% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Os valores observados para as concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram diferença estatística entre si e em comparação ao controle positivo. Após realização do cálculo do EC50, foi possível constatar que 436,59 $\mu\text{g/mL}$ são necessários para sequestrar em 50% o radical DPPH. Semelhantemente ao observado no teste do DPPH, a atividade antioxidante avaliada pelo teste FRAP mostrou que o maior potencial redutor também ocorreu na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, que apresentou um valor de 79,56 $\mu\text{M ET/g}$ de extrato seco, significativamente diferente da concentração de 500 $\mu\text{M ET/g}$ de extrato seco (tabela 4).

Para o ensaio da atividade inibidora da peroxidação lipídica TBARS, os menores níveis de TBARS foram observados para a concentração de 250 (37,76%) e de 1000 µg/mL (32,49%), enquanto a concentração de 500 µg/mL revelou 45,77%. Esta diminuição foi semelhante ao verificado para o controle positivo (Trolox), que exibiu 49,59% na concentração de 1000 µg/mL. No entanto, os valores obtidos com as diferentes concentrações avaliadas não apresentaram diferenças significativas entre si e em comparação com o controle positivo (tabela 4).

Quanto à avaliação da capacidade sequestradora do radical óxido nítrico (NO), o extrato padronizado de *T. terrestris* expôs 35,91 µM/mL de nitrito para a concentração de 250 µg/mL; 39,69 µM/mL de nitrito para a concentração de 500 µg/mL, e a maior formação de nitrito foi na concentração de 1000 µg/mL, apresentando 45,14 µM/mL de nitrito (tabela 4). Estes resultados demonstraram que a concentração de 250 µg/mL evidenciou maior capacidade de sequestrar o NO. Entretanto, os valores obtidos com as diferentes concentrações avaliadas não apresentaram diferenças significativas entre si. Resultados semelhantes foram relatados por HONG et al., (2002) e SUEISHI et al., (2013), que analisaram extratos vegetais com potencial antioxidante pelo sequestro do íon NO.

Tabela 4 - Atividade antioxidante do extrato padronizado de *T. terrestris* e controle positivo ácido gálico e Trolox por meio dos testes DPPH, FRAP, TBARS e NO.

Concentração (µg/mL)	Atividade Antioxidante			
	DPPH ^{1*}	FRAP ²	TBARS ^{3**}	NO ⁴
50	17,77±0,01a	ND	ND	ND
100	25,77±0,01b	ND	ND	ND
250	35,55±0,01c	ND	37,76±10,59a	35,91±3,54a
500	82,22±0,01d	28,74±05,01a	45,77±02,65a	39,69±2,17a
1000	92,00±0,01d	79,56±13,47b	32,49±07,17a	45,14±0,36a
Ácido Gálico*/Trolox**	74,56±0,01d	ND	49,59±0,00a	
EC ₅₀	436,59 µg/mL			

Valores apresentados como média±desvio padrão; *Padrão utilizado como referência no teste do DPPH; **Padrão utilizado como referência no teste do TBARS; 1 = % Atividade Antioxidante; 2 µM Equivalente Trolox/g de extrato; 3 - %TBARS; 4 - nitrito em µM/mL. ND = não determinado; Médias e desvio padrão seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 0,5% de probabilidade.

A tabela 5 mostra os valores do teste do DPPH realizado com o extrato enriquecido avaliado em diferentes concentrações (de 5 a 1000 µg/mL). As maiores atividades antioxidantes foram observadas nas concentrações de 25 µg/mL (36,14%) e 50 µg/mL (54,45%). Quanto ao controle positivo (ácido gálico), foi notada uma atividade de 74,56% na concentração de 100 µg/mL. Os valores observados para as concentrações de 25 e 50

$\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferenças estatísticas entre si e em comparação ao controle positivo. Após realização do cálculo do EC_{50} , foi possível constatar que $44,08 \mu\text{g/mL}$ são necessários para sequestrar 50% do radical DPPH. Semelhantemente ao percebido no teste do DPPH, a atividade antioxidante avaliada pelo teste FRAP mostrou que o maior potencial redutor também ocorreu na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ ($499 \mu\text{M ET/g}$ de extrato seco), sendo significativamente diferente da concentração de $25 \mu\text{g/mL}$ ($255 \mu\text{M ET/g}$ de extrato seco) (tabela 5).

Já para o ensaio da atividade inibidora da peroxidação lipídica (TBARS), os menores níveis de TBARS foram observados para a concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$ (56,70%) e de $500 \mu\text{g/mL}$ (66,18%), enquanto a concentração de $250 \mu\text{g/mL}$ expôs 79,42%. Contudo, todos os valores obtidos com as diferentes concentrações avaliadas apresentaram diferenças significativas entre si e em comparação ao controle positivo (Trolox) (tabela 5).

Quanto à avaliação da capacidade sequestradora do radical óxido nítrico (NO), o extrato enriquecido com saponinas de *T. terrestris* revelou $15,13 \mu\text{M/mL}$ de nitrito para a concentração de $250 \mu\text{g/mL}$; $17,93 \mu\text{M/mL}$ de nitrito para a concentração de $500 \mu\text{g/mL}$, e a maior formação de nitrito foi na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$, apresentando $19,33 \mu\text{M/mL}$ de nitrito (tabela 5). Estes resultados demonstraram que a concentração de $250 \mu\text{g/mL}$ evidenciou maior capacidade de sequestrar o NO; porém, os valores obtidos com as diferentes concentrações avaliadas não apresentaram diferenças significativas entre si.

Tabela 5 - Atividade antioxidante do extrato enriquecido com saponinas de *T. terrestris* e controle positivo Ácido Gálico e Trolox por meio dos testes DPPH, FRAP, TBARS e NO.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Atividade Antioxidante			
	DPPH ^{1*}	FRAP ²	TBARS ^{3**}	NO ⁴
5	24,51 \pm 9,67a	109 \pm 0,01a	ND	ND
10	27,22 \pm 10,91a	140 \pm 0,01b	ND	ND
25	36,14 \pm 16,04a	255 \pm 0,00c	ND	ND
50	54,45 \pm 26,90b	499 \pm 0,02d	ND	ND
250	ND	ND	79,42 \pm 0,00a	15,13 \pm 0,03a
500	ND	ND	66,18 \pm 0,00b	17,93 \pm 0,00a
1000	ND	ND	56,70 \pm 0,03c	19,33 \pm 0,01a
Ácido Gálico*/Trolox**	74,56 \pm 0,00b		49,59 \pm 0,00c	
EC_{50}	44,08 $\mu\text{g/mL}$			

Valores apresentados como média \pm desvio padrão; *Padrão utilizado como referência no teste do DPPH; **Padrão utilizado como referência no teste do TBARS; 1 = % Atividade Antioxidante; 2 μM Equivalente Trolox/g de extrato; 3 - %TBARS; 4 - nitrito em $\mu\text{M/mL}$. ND = não determinado. Médias e desvio padrão seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 0,5% de probabilidade.

A avaliação antioxidante dos extratos padronizado e enriquecido de *T. terrestris*, utilizando os testes de DPPH, FRAP, TBARS e de sequestro do NO, demonstrou que os mesmos apresentam compostos com atividade antioxidante tanto na condição de sequestrantes de radicais livres e de quelantes de compostos indutores de oxidação como também na de inibidores da peroxidação lipídica proporcionada pelo AAPH. Contudo, o extrato padronizado mostrou-se mais eficiente quanto ao sequestro do radical DPPH na concentração de 1000 µg/mL; nesta circunstância, a atividade resultante foi de 92%. No entanto, aplicando este mesmo teste o extrato enriquecido obteve mais de 50% de atividade sequestradora, uma concentração vinte vezes (50 µg/mL) menor que a concentração do extrato padronizado. Em acréscimo, após o cálculo da EC₅₀ foi possível constatar que o extrato enriquecido necessita de uma dose aproximadamente dez vezes menor (44,08 µg/mL) para sequestrar 50% dos radicais DPPH em comparação com o extrato padronizado (436,59 µg/mL). Esta constatação pode ser observada também na interpolação dos resultados dos outros testes antioxidantes (FRAP, TBARS e NO) na questão de concentração e atividade máxima obtida. De modo geral, e para ambos os extratos, os resultados obtidos de DPPH e FRAP foram semelhantes aos realizados por Hammoda et al. (2013) e Naz et al. (2017), que demonstraram uma grande capacidade sequestradora de radicais livres nos extratos desta espécie, classificando a mesma como uma rica fonte de compostos antioxidantes.

Resultados oriundos deste estudo, empregando o teste do TBARS, tanto com extrato padronizado como enriquecido de *T. terrestris* estão de acordo com os apresentados por Sailaja et al., (2013), os quais demonstraram o efeito inibitório da lipoperoxidação pelo teste TBARS (*in vivo*) para extrato aquoso obtido de frutos de *T. terrestris*. No que diz respeito aos resultados revelados com o extrato enriquecido, é possível constatar que os mesmos estão em conformidade com McAnuff et al., (2003) e Xi et al., (2013), cujos procedimentos indicaram que extratos enriquecidos em saponinas, principalmente em saponinas esteroidais, apresentam um maior potencial antiperoxidação lipídica, tanto *in vitro* como *in vivo*. De modo geral, outros autores, como Boulanouar et al. (2013) e Sousa et al. (2015), evidenciaram a importância de avaliar extratos de origem vegetal na prevenção e/ou inibição da atividade antiperoxidação lipídica, como método de assegurar e validar as atividades dos extratos sobre o estresse oxidativo e sobre os danos causados em moléculas biológicas.

Os valores encontrados no teste do sequestro do NO observados no presente estudo, tanto para o extrato padronizado como o enriquecido, assemelham-se aos que foram relatados por Hemalatha e Hari (2013), que demonstraram a expressiva atividade

sequestradora do NO por extratos e frações de saponinas obtidos de *T. terrestris*. Outros estudos, realizados por Bhat et al, (2012) e Dakshayini e Basha (2018), também comprovaram a eficácia em sequestro do NO; porém, avaliaram diferentes extratos derivados do fruto de *T. terrestris*.

5.7 Atividade antioxidante para os extratos padronizado e enriquecido (Método Hemolítico)

Após obtenção dos resultados com os testes antioxidantes do DPPH, FRAP, TBARS e NO, as concentrações de 500 e 1000 µg/mL do extrato padronizado de *T. terrestris* foram selecionadas para realização do ensaio anti-hemolítico em sangue humano. Na Figura 13 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante pelo método de inibição da hemólise oxidativa em eritrócitos humanos. Observou-se que o extrato padronizado inibiu a ação hemolítica do AAPH. Para a concentração de 500 µg/mL nas 3^a e 6^a horas, revelou uma inibição da ação hemolítica de 93,08% na 3^a hora e de 90,27% na 6^a hora, em comparação ao controle positivo (AAPH). Para a concentração de 1000µg/mL, foram notadas uma hemólise de 11,41% na 5^a hora e outra, de 8,78%, na 6^a hora, resultando, assim, uma inibição hemolítica de 88,59% na 5^a hora e outra, de 91,22%, na 6^a hora. O controle positivo apresentou um índice de hemólise médio de 94,62% nas seis horas observadas. Os resultados alcançados sugerem um potencial de atividade anti-hemolítica do extrato padronizado, como relatado por Schmitz et al. (2008), que avaliaram diferentes extratos de plantas medicinais por meio do teste hemolítico.

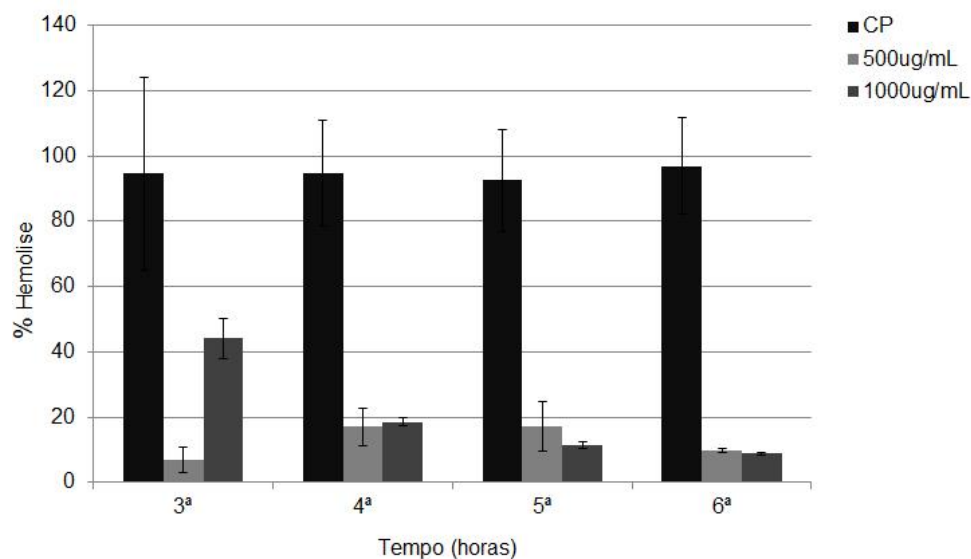


Figura 13 - Atividade antioxidante pelo método de hemólise do extrato padronizado de *T. terrestris* durante 6 horas de incubação nas concentrações de 500 µg/mL e 1000 µg/mL, mensurada a 540nm em espectrofotômetro.

Na avaliação da atividade antioxidante pelo método hemolítico do extrato enriquecido de *T. terrestris*, não foi possível observar atividade inibidora do AAPH em hemolisar eritrócitos sanguíneos, pois os valores de hemólise foram maiores que 100%. Este resultado pode estar correlacionado com a alta capacidade e especificidade das saponinas em promover hemólise em eritrócitos, como indicado por Baumann et al., (2000) e Bissinger et al., (2014). Esta constatação também evidencia a presença majoritária de saponinas no extrato enriquecido de *T. terrestris* preparado e utilizado neste estudo.

5.8 Atividade antioxidante das microcápsulas contendo os extratos padronizado e enriquecido (DPPH e FRAP)

Após determinação da eficiência de encapsulação de cada extrato avaliado, e com a finalidade de constatar a presença de compostos fenólicos não encapsulados, as amostras das microcápsulas obtidas foram avaliadas pelo teste antioxidante de sequestro do radical DPPH e do teste FRAP. Na tabela 6, estão expressos os resultados das porcentagens antioxidante e redutora de ferro das amostras de microcápsulas conseguidas com extrato padronizado em diferentes diluições, e em dois solventes distintos (água e etanol PA). Por meio da avaliação antioxidante realizada foi possível verificar a ausência de compostos fenólicos antioxidantes ligados à parede externa das microcápsulas ou livres da encapsulação, pois somente a diluição das microcápsulas preparadas, 0,5 g de extrato e 5 g maltodextrina em água, apresentou atividade antioxidante mensurável pelo método do DPPH; porém, esta diluição apresentou 6,27% de atividade antioxidante máxima, sendo que o extrato padronizado sem encapsular e na mesma diluição revelou 89,77%.

Tabela 6 – Atividade antioxidante de microcápsulas de maltodextrina contendo extrato padronizado de *T. terrestris* (10000 µg/mL), em diferentes diluições e solventes (água e etanol PA).

Extrato padronizado (10000 µg/mL)+ MD ₂₀ (g)	DPPH ¹	DPPH ¹	FRAP ² (µM/mL)	FRAP ² (µM/mL)
	Etanol	Água	Etanol	Água
0,5 + 5	6,27	5,72	-	-
0,5 + 10	-	-	-	-
0,5 + 20	-	-	-	-
1,0 + 5	-	-	-	-
1,0 + 10	-	-	-	-
1,0 + 20	-	-	-	-
2,0 + 5	-	-	-	-
2,0 + 10	-	-	-	-
2,0 + 20	-	-	-	-
0,0 + 5,0	-	-	-	-
0,5 + 0,0	89,77	28,0	520,33	8,44

1 = % Atividade Antioxidante e 2 = µM Equivalente Trolox/g de extrato

Para as microcápsulas contendo extrato enriquecido com saponinas de *T. terrestris*, pôde-se observar, nas diluições em etanol PA avaliadas, uma atividade antioxidante, tanto na avaliação pelo método do DPPH como na do FRAP. As diluições avaliadas não apresentaram diferenças significativas entre si, em ambos os testes; entretanto, diferiram significativamente em comparação com a amostra de extrato enriquecido diluído e sem encapsular utilizado como controle.

Tabela 7 – Atividade antioxidante de microcápsulas de maltodextrina (MD₂₀) contendo extrato enriquecido com saponinas de *T. terrestris* (10000 µg/mL), em diferentes diluições.

Extrato enriquecido (10000 µg/mL) + MD ₂₀ (g)	DPPH	FRAP (µM/mL)
	Etanol	Etanol
0,5 + 5	8,28±0,6a	12,84±0,3a
1,0 + 10	8,01±0,9a	14,22±0,2a
0,0 + 5,0	-	-
0,5 + 0,0	89,77±3,2b	520,33±11,6b

Valores apresentados como média±desvio padrão; 1 = % Atividade Antioxidante; 2 µM Equivalente Trolox/g de extrato. Médias e desvio padrão seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 0,5% de probabilidade.

Tanto os resultados obtidos com as microcápsulas contendo extrato padronizado como com o enriquecido estão de acordo com Negrão-Murakami et al., (2017), que avaliou a estabilidade e a formação de microcápsulas de mate (*Ilex paraguariensis*) por meio da atividade antioxidante do DPPH e FRAP, utilizando maltodextrina D20 como agente encapsulador.

5.9 Atividade antioxidante do produto da liberação das microcápsulas (DPPH e FRAP)

Após constatar a ausência de compostos fenólicos livres ou colados às paredes das microcápsulas, estas passaram pelo processo de liberação de seus componentes fenólicos, conforme subitem 3.4.2.2. Logo após, os produtos de liberação foram avaliados quanto à atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e FRAP. Na tabela 8, estão apresentados os valores das atividades antioxidantes dos produtos de liberação, onde é possível observar que o maior potencial antioxidante avaliado pelo teste do radical DPPH foi nas diluições de 1,0 g+5 g; 2,0 g+10 g; 2,0 g+5 g, apresentando 81,45; 83,12 e 85,29%, respectivamente, sendo que não houve diferença significativa em comparação com a amostra de extrato padronizado diluído e utilizado como controle. Já para o teste FRAP, houve um aumento do potencial redutor de ferro nas diluições de 2,0 g+10 g (125,01 $\mu\text{M}/\text{mL}$) e 1,0 g+10 g (111,68 $\mu\text{M}/\text{mL}$), diferindo significativamente do extrato controle, que apresentou 52,33 $\mu\text{M}/\text{mL}$.

Tabela 8 – Atividade antioxidante do produto de liberação de microcápsulas de maltodextrina contendo extrato padronizado de *T. terrestris* (10000 µg/mL), em diferentes diluições.

Extrato padronizado (10000 µg/mL) + MD ₂₀ (g)	DPPH ¹ Etanol	FRAP ² Etanol
0,5 + 5	29,52±1,23a	78,87±2,21a
0,5 + 10	52,90±3,02b	86,25±2,36a
0,5 + 20	52,14±2,96b	84,96±3,45a
1,0 + 5	81,45±4,62c	95,20±1,98a
1,0 + 10	74,81±2,27c	111,68±8,27b
1,0 + 20	51,88±2,53b	77,25±3,06a
2,0 + 5	85,29±4,89c	88,33±3,52a
2,0 + 10	83,12±3,97c	125,01±9,13b
2,0 + 20	71,53±2,44c	145,10±9,27c
0,0 + 5,0	-	-
0,5 + 0,0	89,77±4,86c	52,33±2,08d

Valores apresentados como média±desvio padrão; 1 = % Atividade Antioxidante; 2 µM Equivalente Trolox/g de extrato. Médias e desvio padrão seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 0,5% de probabilidade.

Na tabela 9, estão apresentados os valores das atividades antioxidantes, onde é possível observar que tanto para o teste do radical DPPH quanto para o FRAP não houve diferença entre si, mas apresentou diferença significativa em comparação ao extrato enriquecido utilizado como controle.

Tabela 9 – Atividade antioxidante do produto de liberação de microcápsulas de maltodextrina contendo extrato enriquecido com saponinas de *T. terrestris* (10000 µg/mL), em diferentes diluições e solventes (água e etanol PA).

Extrato enriquecido (10000 µg/mL) + MD ₂₀ (g)	DPPH ¹ Etanol	FRAP ² Etanol
0,5 + 5	58,22±1,14a	130,52±5,49a
1,0 + 10	63,48±1,78a	121,70±6,23a
0,0 + 5,0	-	-
0,5 + 0,0	89,77±4,86b	52,33±2,08b

Valores apresentados como média±desvio padrão; 1 = % Atividade Antioxidante; 2 µM Equivalente Trolox/g de extrato. Médias e desvio padrão seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 0,5% de probabilidade.

Os resultados revelados com os testes antioxidantes, aplicados aos produtos de liberação das microcápsulas obtidas, tanto do extrato padronizado como o enriquecido, demonstraram que o processo de liberação das mesmas mostrou-se eficiente e que também é possível manter a estabilidade dos compostos fenólicos e sua atividade após liberação das cápsulas. Estes resultados estão de acordo com Cilek et al., (2012), os quais comprovaram a eficiência de encapsulação seguida de liberação de compostos fenólicos, avaliados pelo teste do DPPH e pelos de Negrão-Murakami et al., (2017), os quais foram avaliadas a estabilidade e a formação de microcápsulas e a liberação de compostos fenólicos de *Ilex paraguariensis* por meio da atividade antioxidante do DPPH e FRAP.

5.10 Atividade antiglicante para os extratos padronizado e enriquecido (MRE, OPA e Determinação de AGEs)

Após realização dos testes de avaliação do potencial antioxidante por diferentes mecanismos de eliminação dos radicais livres, foi constatado que o extrato bruto e enriquecido com saponinas na concentração de 1000 µg/mL seria avaliado quanto à capacidade antiglicante, visando a utilização deste extrato na concepção dos estudos de sua microencapsulação e sua liberação.

Na Figura 14 estão revelados os perfis eletroforético do extrato padronizado, do extrato enriquecido com saponinas de *T. terrestris* e a saponina padrão Diosgenina, em contraponto à ação glicante da ribose e antiglicante da aminoguanidina. É possível observar que os extratos apresentaram atividade antiglicante com relação à glicação promovida pela ribose sobre o BSA. A amostra de BSA tratada com ribose+extrato enriquecido com saponinas exibiu o perfil eletroforético mais semelhante que o BSA padrão. Já o perfil eletroforético apresentado pelo de BSA tratado com ribose+extrato padronizado e saponina diosgenina descreveu um perfil semelhante ao BSA tratado com ribose+aminoguanidina. Sendo assim, é possível evidenciar uma atividade antiglicante dos extratos avaliados pelo método utilizado. Estudos conduzidos por Kaise et al. (2009) e Gilabert-Oriol et al. (2015) demonstraram a importância da investigação da capacidade antiglicante de compostos naturais desta espécie, assim como de outras espécies de origem vegetal e suas ações, tendo em vista que o estresse oxidativo está intimamente ligado aos danos causados pela glicação em células e tecidos animais e humanos.

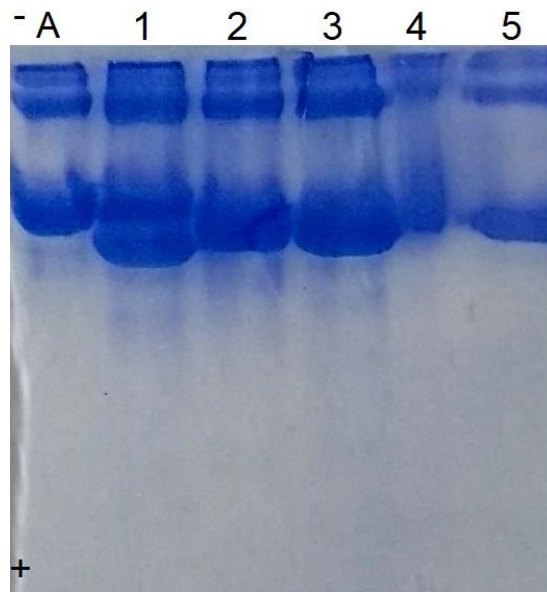


Figura 14 - Teste de mobilidade relativa em eletroforese para avaliação da capacidade antiglicação pelo sistema A=BSA, 1=BSA+Ribose, 2=BSA+Ribose+AMG, 3=BSA+Ribose+Extrato padronizado, 4= BSA+Ribose+Extrato enriquecido e 5= BSA+Ribose+Diosgenina. Onde BSA=Albumina sérica bovina e AMG=Aminoguanidina.

Na figura 15 (A e B) estão visíveis as porcentagens de aminos livres determinadas pelo método do OPA, realizado com o extrato padronizado e enriquecido de *T. terrestris* em associação com BSA, como proteína, e Ribose, como agente glicante; no entanto, é possível observar que 45,85% das aminos se encontram livres da glicação na presença da Ribose, refletindo, assim, no valor real de aminos livres dos grupos tratados com os extratos. Desse modo, a porcentagem de aminos livres nos grupos tratados foi de 26,33% para a associação com extrato padronizado, 85,32% para o extrato enriquecido e 30,89% para saponina diosgenina (Figura B).

A atividade antiglicante das saponinas, tanto esteroidais como triterpênicas, vem demonstrando sua relação com a redução das complicações geradas pelo diabetes mellitus. Este benefício possivelmente está correlacionado com a sua ação antiglicante, em associação com a atividade antioxidante destes compostos, pois, com isso, inibe a glicação proteica e de outras biomoléculas, como foi demonstrado por Xi et al.,(2008 e 2010) e Bi et al., (2012). Diante disso, é possível observar neste estudo que tanto o extrato padronizado como o enriquecido apresentam atividade antiglicante; porém, esta atividade é mais proeminente na associação com o extrato enriquecido, que apresentou 85,32% de atividade antiglicante perante o agente glicante Ribose, sendo também de maior eficiência que a saponina padrão diosgenina.

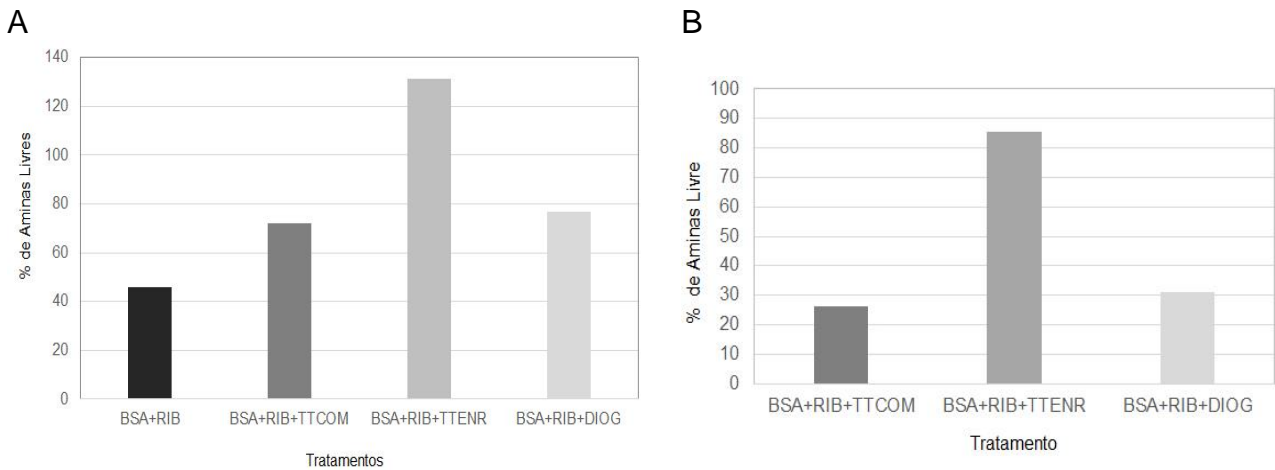


Figura 15 (A e B) – Porcentagem de aminos livres determinada pelo método do OPA para o extrato enriquecido de *T. terrestris* em associação com BSA como proteína e Ribose como agente glicante.

Na figura 16 estão apresentados os resultados da determinação de aminos livres expressos por intensidade de fluorescência e porcentagem de inibição de glicação, onde é possível observar, que tanto o extrato padronizado como o enriquecido de *T. terrestris* inibiram a glicação em aproximadamente 15%, enquanto que o controle tratado com Aminoguanidina apresentou 22,57% de inibição (Figura 16-B). Estes resultados estão de acordo com a fluorescência determinadas para as amostras reacionais avaliadas (Figura 16 – A).

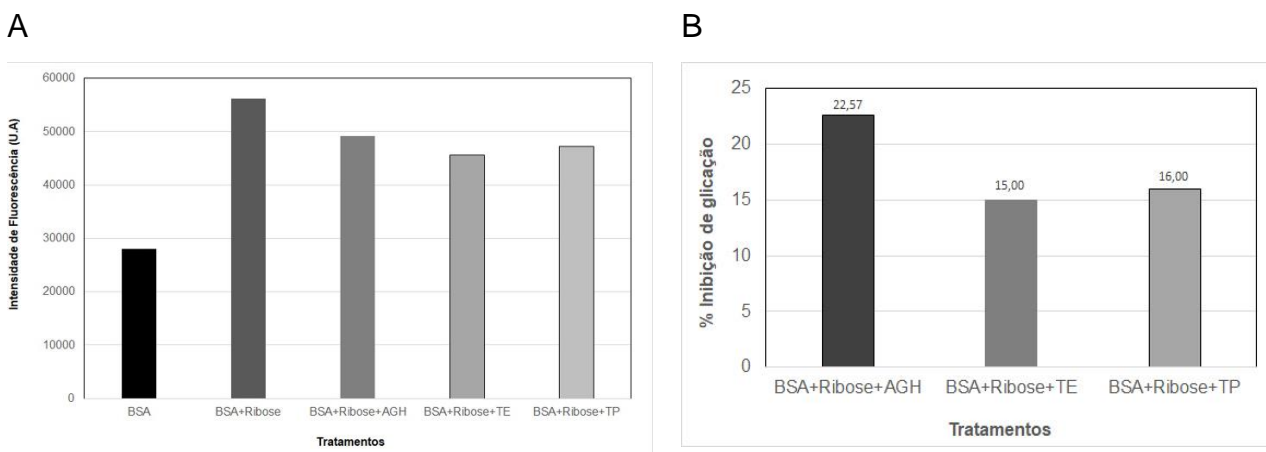


Figura 16 - Resultados da determinação de aminos livres expressos por intensidade de fluorescência (A) e porcentagem de inibição de glicação (B), TE = extrato enriquecido; TP = extrato padronizado e AGH = Aminoguanidina.

Na figura 17 estão expressos os valores da inibição da formação de AGEs determinada por fluorescência de AGEs com fluorescência avaliada em excitação e emissão máxima de 360 e 460 nm, respectivamente. A leitura determinou que tanto o extrato padronizado quanto ao enriquecido com saponinas de *T. terrestris* inibiram mais

de 50% a formação de AGEs, caracterizando assim os extratos como fonte de compostos antiglicantes.

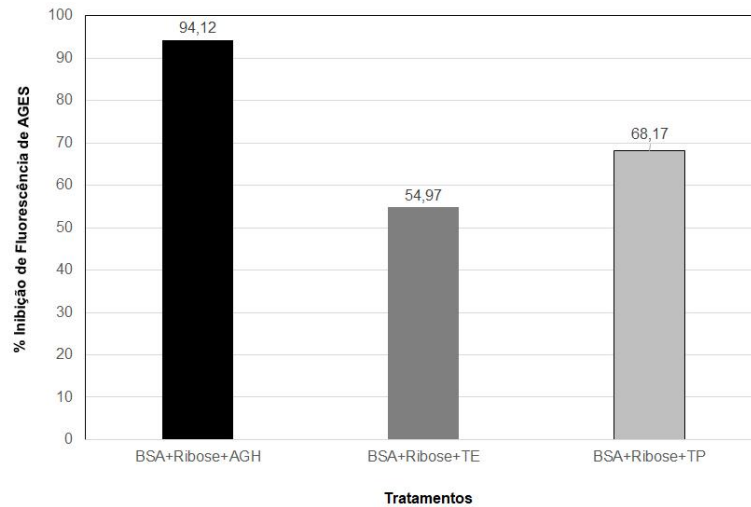


Figura 17 - Valores da inibição da formação de AGEs determinada por fluorescência de AGEs.

Diante dos resultados obtidos tanto para o teste de MRE, OPA e determinação de AGEs por fluorescência, utilizando o BSA padrão como proteína, e Ribose como agente glicante, foi possível constatar que ambos os extratos de *T. terrestris* apresentam atividade antiglicante, porém esta atividade torna-se mais eficiente com a extração e obtenção do extrato enriquecido, inclusive em contraponto com a saponina padrão diosgenina. Estes resultados são relatados pela primeira vez com base científica e avaliação protocolar, não existindo até o momento resultados semelhantes às análises realizadas no presente estudo que sejam cabíveis de comparação ou interpolação. Porém a frequência de citações sobre o potencial antioxidante atribuído a extratos e compostos isolados de *T. terrestris* podem estar também correlacionados com a atividade antiglicante, pois a mesma pode ser gerada pelo estresse oxidativo e o desequilíbrio da eliminação de diferentes radicais livres (Sousa et al., 2015; Naz et al., 2017).

6 Considerações Finais

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que tanto o extrato padronizado como o enriquecido com saponinas obtidas de *T. terrestris* apresentaram atividade antioxidante e antiglicante pelos diferentes métodos de avaliação adotados.

Cabe ressaltar, que apesar do extrato padronizado constar em laudo um conteúdo de saponinas totais de 43,2 %, o método de extração e enriquecimento do extrato em saponinas mostrou-se eficaz, principalmente em saponinas de menor interesse

(diosgenina, protodioscina, furostanol e espirostanol) responsáveis pelas principais ações terapêuticas e farmacológicas atribuídas a espécie *T. terrestris*.

É possível demonstrar que o protocolo adotado e realizado para encapsular os extratos de *T. terrestris* resultou em um método eficaz de encapsulação com maltodextrina DE20, e após a liberação manteve a atividade antioxidante exercida pelos diferentes extratos avaliados, podendo ser utilizado como um método de liberação controlada para os mesmos.

Conclusão

De modo geral, e em consideração a todos os resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que o método de extração, encapsulação e de liberação de microcápsulas, contendo extrato enriquecido de saponinas de *T. terrestris* conjuntamente com a atividade antioxidante e antiglicante, tem potencialidade de ser aplicado na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos.

Referências

ADISAKWATTANA, S.; THILAVECH, T.; SOMPONG, W.; PASUKAMONSET, P. Interaction between ascorbic acid and gallic acid in a model of fructose-mediated protein glycation and oxidation. *Electronic Journal of Biotechnology* v.27, p.32–36, 2017.

AKRAM, M.; ASIF, H.M.; AKHTAR, N.; SHAH, P.A.; UZAIR, M.; SHAHEEN, G.; SHAMIM, T.; ALI SHAH, S.M.; AHMAD, K. *Tribulus terrestris* Linn.: a review article. *Journal Medicinal Plants Res.* v.5, p.3601–3605, 2011.

ANSON, R. Microencapsulation: for enhanced textile performance. *Performance Apparel Markets*, v.12, n.12, p.21-39, 2005.

ARAUJO-DÍAZ, S.B.; LEYVA-PORRAS, C.; AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; ÁLVAREZ-SALAS, C.; SAAVEDRA-LEOS, Z. Evaluation of the physical properties and conservation of the antioxidants content, employing inulin and maltodextrin in the spray drying of blueberry juice. *Carbohydrate Polymers*, v.167, p.317-325, 2017.

ARIYARATHNA, I.R.; KARUNARATNE, D.N. Microencapsulation stabilizes curcumin for efficient delivery in food applications. *Food Packaging and Shelf Life*, v.10, p.79-86, 2016.

ARPAGAUS, C.; COLLENBERG, A.; RÜTTIB, D.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S.M. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, v.546, p.194-214, 2018.

ASADMOBINI, F.; BAKHTIARI, M.; KHALEGHI, S.; ESMAEILI, F.; MOSTAFAEI, A. The effect of *Tribulus terrestris* extract on motility and viability of human sperms after cryopreservation. *Cryobiology*, p. 1-24, 2017.

AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v.16, n.1, p.89-97, 2005.

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

BANERJEE A, KUNWAR A, MISHRA B, PRIYADARSINI KI. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *ChemBiol Interact*, v.174, n.2, p. 134–139, 2008.

BANSODE, S.S.; BANERJEE, S.K.; GAIKWAD, D.D.; THORAD, M.M. Microencapsulation: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, Analogues of This Natural Product. Molecules*, v.18, p.3356-3378, 2013.

BAUMANN, E.; STOYA, G.; VOÈ LKNER, A.; RICHTER, W.; LEMKE, C.; LINSS, W. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochemica*, v.102, p.21-35, 2000.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse Oxidativo, Lesões no Genoma e Processos de Sinalização no Controle do Ciclo Celular. *Química Nova*, v.29, (6), 1340-1344, 2006.

BHAT, B.A.; ELANCHEZHIAN, C.; SETHUPATHY, S.; RENJU, V.C.; SHOBA, V.; HEMALATHA, S.; GOWRI, K.; ALLAYIE, S.A.; BHAT, O.A.; SUHASINI, S. Journal of Pharmacy Research, v.5, n.5, p. 2954-2958, 2012.

BHUSHAN, B.; PAL, A.; KUMAR, S.; RAJESH, SINGH, A. Evaluation of post-germinative lipid peroxidation and enzymatic antioxidant potential in lead absorbing oat (*Avena sativa*) seedlings. Journal Environ Biol, v.36, n.1, p.279-88, 2015.

BI, L.; TIAN, X.; DOU, F.; HONG, L.; TANG, H.; WANG, S. New antioxidant and antiglycation active triterpenoid saponins from the root bark of *Aralia taibaiensis*. Fitoterapia, v.83, p.234–240, 2012.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organization Journal, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BISSINGER, R.; MODICANO, P.; ALZOUBI, K.; HONISCH, S.; ABED, M.; LANG, F. International Journal of Hematology, v.100, n.1, p.51-59, 2014.

BLOIS MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nat, v.181, p1199–1200, 1958.

BOULANOUAR, B.; ABDELAZIZ, G.; AAZZA, S.; GAGO, C.; GRACA MIGUEL, M. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. Industrial Crops and Products, v.46, p.85–96, 2013.

BOEL E, SELMER J, FLODGAARD HJ, JENSEN T. Diabetic late complications: will aldose reductase inhibitors or inhibitors of advanced glycosylation endproduct formation hold promise? Journal Diabetes Complications, v.9, n.2, p.104-29, 1995.

CAMPELO, P.H.; DO CARMO, E.L.; ZACARIAS, R.D.; YOSHIDA, M.I.; FERRAZ, V.P.; FERNANDES, R.V.B.; BOTREL, D.A.; BORGES, S.V. Effect of dextrose equivalent on physical and chemical properties of lime essential oil microparticles. Industrial Crops and Products, v.102, p.105–114, 2017.

CARTAXO-FURTADO, N.A.D.E.O.; SAMPAIO, T.O.; XAVIER, M.A.; MEDEIROS, A.D.D.E.; PEREIRA, J.V. Perfil fitoquímico e determinação da atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) frente a microrganismos bucais. Rev. bras. plantas med.[online]. v.17, n.4, s.3, p.1091-1096, 2015.

CASTEJON, F.V. Taninos e Saponinas. Universidade Federal de Goiás-Escola de Veterinária e Zootecnia do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. p. 1-21, 2011.

CHAMPAGNE C.P.; FUSTIER P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. Current Opinion in Biotechnology, v.18, p.184-190, 2007.

CHAVES, M.B.; AVERSE-FERREIRA, T.A. Terapia Medicamentosa da Doença de Alzheimer. Revista Eletrônica de Farmácia. v.1, p.1-7, 2008.

CHHATRE, S.; NESARI, T.; SOMANI, G.; KANCHAN, D.; SATHAYE, S. Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*. Pharmacognosy Journal. v. 8, n.15, p.45-51, 2014.

CHEN, Y.; TANG, YOU-MEI.; YU, SU-LAN.; HAN, YU-WEI.; KOU, JUN-PING.; LIU, BAO-LIN.; YU, BO-YANG. Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. Chinese Journal of Natural Medicines, v.13, n.8, p.0578-0587, 2015.

CHU, S.; PANG, W. Q. X.; SUN, B.; HUANG, X. Effect of saponin from *Tribulus terrestris* on hyperlipidemia, Zhong. Yao. Cai. v. 26, p. 341–344, 2012.

CILEK, B.; LUCA, A.; HASIRCI, V.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. European Food Research and Technology, v. 235, n.4, p. 587-596, 2012.

CONRAD J.; DINCHEV D.; KLAIBER I.; MIKA S.; KOSTOVA I.; KRAUS W. A novel furostanol saponin from *Tribulus terrestris* of Bulgarian origin. Fitoterapia, v. 75, p.117-122, 2004.

CONRAD J.; DINCHEV D.; KLAIBER I.; MIKA S.; KOSTOVA I.; KRAUS W. A novel furostanol saponin from *Tribulus terrestris* of Bulgarian origin. Fitoterapia, v.75, p.117-122, 2004.

CORRÊA, R. M. Produção de micropartículas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixe: estudos de sistema-modelo com inclusão de micropartículas lipídicas ou emulsão lipídica e testes in vivo. 151f. Tese (Doutorado em Alimentação e Nutrição) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

DAKSHAYINI, P.N.; BASHA, M.P. Phytochemical screening and in vitro antioxidant potential of *Tribulus terrestris* fruit and *mesua ferrea* flower extracts: A comparative study. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v.10, n.3, 2018.

DEL-RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.2, p.389-399, 2012.

DINCHEV, D.; JANDA, B.; EVSTATIEVA, L.; OLESZEK, W.; ASLANI, M.R., KOSTOVA, I. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. Phytochemistry, v.69, p.176–186, 2008.

DJERASSI, C.; ROSENKRANZ, G.; PATAKI, J. Steroids, XXVII. Synthesis of allopregnane- 3beta, 11beta, 17alpha-, 20beta, 21-pentol from cortisone and diosgenin [J]. Journal Biol Chem, v. 194, n. 1, p. 115-118, 1952.

DONSÌ, F.; SESSA, M.; MEDIOUNI, H.; MGAIDI, A.; FERRARI, G. Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion based delivery systems. Procedia Food Science, v. 1, p. 1666 – 1671, 2011.

DONSÌ, F.; SESSA, M.; MEDIUMI, H.; MGAIDI, A.; FERRARI, G. Encapsulation of bioactive compounds in nano emulsionbased delivery systems. *Procedia Food Science*, v. 1, p. 1666 – 1671, 2011.

ELEKOFEHINTI, O.O. Saponins: Anti-diabetic principles from medicinal plants - A review. *Pathophysiology*, v.22, n.2, p.95-103, 2015. em praticantes de musculação. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, v.11, n.67, p.836-842, 2017.

FANCELLO, F.; PETRETTO, G.; SANNA, M.L.; PINTORE, G.; LAGE, M.; ZARA, S. Isolation and characterization of microorganisms and volatiles associated with Moroccan saffron during different processing treatments. *International Journal of Food Microbiology*, v.273, p.43–49, 2018.

FARO, L.; RUSSO, J.A. Testosterona, desejo sexual e conflito de interesse: Periódicos biomédicos como espaços privilegiados de Expansão do mercado de medicamentos. *Horizontes Antropológicos*, Porto Alegre, v.23, n.47, p.61-92, 2017.

FAYLE, S.E.; HEALY, J.P.; BROWN, P.A.; REID, E.A.; GERRARD, J.A.; AMES, J.M. Novel approaches to the analysis of the Maillard reaction of proteins. *Electrophoresis*. v.22, p.1518–1525, 2001.

FERRARI, C.C.; RIBEIRO, C.P.; AGUIRRE, J.M. Secagem por atomização de polpa de amora-preta usando maltodextrina como agente carreador. *Braz. J. Food Technol*, v.15, n.2, p.157-165, 2012.

FINOT, P. A. Historical perspective of the maillard reaction in food science. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1043, n.1, p.1-8, 2005.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER,K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition* [online], v.88, p.587–605, 2002.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER,K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition* [online], v.88, p. 587–605, 2002.

FRANCO, R.; VARGAS, M. Redox Biology in Neurological Function, Dysfunction, and Aging. *Antioxid Redox Signal*, v.28, n.18, p.1583-1586, 2018.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int. J. Pharm.* v.10, n.282, p.1-18, 2004.

FUJIWARA, G. M. Microencapsulação de estigmasterol utilizando alginato de sódio, quitosana e amido. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2012.

GAUTHAMAN, K.; ADAIKAN, P, G.; PRASAD, R. N. V. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. *Life Science*. v. 71, n.12, p.1385–1396, 2002.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International*, v.40, p.1107–1121, 2007.

GILABERT-ORIOU R., WENG A., MALLINCKRODT B., STÖSHEL A., NISSI L., MELZIG M., FUCHS H., THAKUR M. Electrophoretic mobility as a tool to separate immune adjuvant saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015.

GOLDIN, A.; BECKMAN, J.A.; SCHMIDT, A.M.; CREAGER, M.A. Advanced Glycation end Products Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Basic Science for Clinicians*, v.114, p.597-605, 2006.

GONÇALVES, A. F.; Estresse oxidativo promovendo a longevidade - Um conceito de mito-hormese. *Revista Brasileira de Nutrição Funcional*, v.14, n.59, p.8-11, 2014.

GRANATO, D., SANTOS, J. S., MACIEL, L. G., NUNES, D. S. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, v.80, p.266-279, 2013.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrite in biological fluids. *AnalBiochem*. v.126, n.1, p.131–138, 1982.

GUIMARÃES AG, OLIVEIRA GF, MELO MS, CAVALCANTI SC, ANTONIOLLI AR, BONJARDIM LR, SILVA FA, SANTOS JP, ROCHA RF, MOREIRA JC, ARAÚJO AA, GELAINN DP, QUINTANS-JUNIOR LJ. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v.107, n.6, p.949–957 2010.

HAMED, H.; BELLASSOUED, K.; BRAHMI, N.; GARGOURI, A.; GHANNOUDI, Z.; ELFEKI, A. Modulatory Effects of Rosemary Leaves Aqueous Extraction against oxidative stress and related damages in experimental model of CCl₄-induced cardiac toxicity in mice. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, p.1-36, 2018.

HAMMODA, H. M.; GHAZY, N. M.; HARRAZ, F. M.; RADWAN, M. M.; ELSOHLI, M. A.; ABDALLAH, I. I. Chemical constituents from *Tribulus terrestris* and screening of their antioxidant activity. *Phytochemistry*, v. 92, p.153–159, 2013.

HASHIM, S.; BAKHT, T.; MARWAT, K. B.; JAN, A. Medicinal Properties, Phytochemistry and Pharmacology of *Tribulus terrestris* L. (*Zygophyllaceae*) Pak. *Journal Botanic*. v.46, n.1, p.399-404, 2014.

HEMALATHA, S.; HARI, R. Comparative antioxidant activities of crude ethanolic and saponin rich butanol extracts of *Tribulus terrestris* fruits. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v.4, n.4, p.784 - 793, 2013.

HODGE, J. E. Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.1, p.928-943, 1953.

HONG, C.H.; HUR, K.S.; OH, O-JIN.; KIM, S.S.; NAM, K.A.; LEE, S.K. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide

synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v.83, p.153-159, 2002.

HUO, R.; ZHOU, QIU-LI.; WANG, BEN-XIANG.; TASHIRO, SHIN-ICHI.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Diosgenin induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.25, n.8, p.1077-1082, 2004.

IVANOVA, A.; LAZAROVA, I.; MECHKAROVA, P.; TCHORBANOV, B. HPLC Method for Screening of Steroidal Saponins and Rutin as Biologically Active Compounds in *Tribulus Terrestris* L. 2014.

JAISSON, S.; and GILLERY, P. "Les produits de glycation avancée des protéines," *Revue Francophone des Laboratoires*, View at Publisher · View at Google Scholar, v.2018, n.502, p.48–55, 2018.

JESUS, M.; MARTINS, A.P.J.; GALLARDO, E.; SILVESTRE, S. Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, v.16, p.1-16, 2016.

JOSEPH, J.; COLLINS, N. D. Phytotherapeutic Management of Endocrine Dysfunctions. *Nutri News Inquiries*, v.8, n.1, 2006.

KAISE, S.; PAVEI, C.; ORTEGA, G.G. Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.20, n.3, p.300-309, 2009.

KERLEY, C.P. Dietary nitrate as modulator of physical performance and cardiovascular health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v.20, n.6, p.440-446, 2018.

KHANAM, U. K. S.; OBAB, S.; YANASE, E.; MURAKAMIC, Y. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*, v.4, p.979-987, 2012.

KIM, AH-NA.; KIM, H.J.; CHUN, J.; HEO, H.J.; KERR, W.L.; CHOI, S.G. Degradation kinetics of phenolic content and antioxidant activity of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta*) puree at different storage temperatures. *LWT - Food Science and Technology*, v.89, p.535–541, 2018.

KOSTOVA, I.; DINCHEV, D. Saponins in *Tribulus terrestris* – chemistry and bioactivity. *Phytochem. Rev*, v. 4, p.111–137, 2005.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. v.113, n.9, p.71–88, 2002.

KUANG, S. S.; OLIVEIRA, J. C.; CREAN, A. M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.50, p.1913-1918, 2010.

LACZKOWSKI, M.S.; LACZKOWSKI, I.M. Microencapsulation by Freeze-Drying of Potassium Norbixinate and Curcumin with Maltodextrin: Stability, Solubility and Food Application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.61, 2013.

LACONO, F.; PREZIOSO, D.; RUFFO, A.; DI LAURO, G.; ROMIS, L.; ILLIANO, E. Analyzing the efficacy of a new natural compound made of the alga *Ecklonia bicyclis*, *Tribulus terrestris* and BIOVIS in order to improve male sexual function. *JMB*, v.8, n.4, p. 282–287, 2011.

LEDESMA-OSUNA, A.I.; RAMOS-CLAMONT, G.; VÁZQUEZ-MORENO, L. Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. *Acta Biochimica Polonica*. v.55, n.3, p.491-497, 2008.

LEPAGE, C.; LÉGER, D.Y.; BERTRAND, J.; MARTIN, F.; BENEYTOU, J. L.; LIAGRE, B. Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Lett.* v.28, p.193–202, 2011

LI, J. L.; YANG, S. S. Review of saponins in *Tribulus terrestris* chemistry and bioactivity. *Chin Arch Trad Chin Med*, v.24, p.1509–10, 2006.

LIU, J.; CHEN, H.; XU, Y.; ZHANG, W.; LIU, W. Studies on chemical constituents of *Tribulus terrestris* L. *Dier. Junyi Daxue Xuebao*, v.24, p.221–222, 2003.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, v.4, n.8, p.421-304, 2010.

LOKANATHAN, Y.; OMAR, N.; PUZI, N.N.A.; SAIM, A.; IDRUS, R.H.J. Recent Updates in Neuroprotective and Neuroregenerative Potential of *Centella asiatica*. *Malays J Med Sci*. n.23, n.1, p.4–14. 2017.

LÓPEZ, E.P.F.; WANG, Q.; WEI, W.; JORNET, P.L. Potential chemotherapeutic effects of diosgenin, zoledronic acid and epigallocatechin-3-gallate on PE/CA-PJ15 oral squamous cancer cell line. *Archives of Oral Biology*, v.82, p.141–146, 2017.

MA, Y.; GUO, Z.; WANG, X. *Tribulus terrestris* extracts alleviate muscle damage and promote anaerobic performance of trained male boxers and its mechanisms: Roles of androgen, IGF-1 and IGF binding protein-3. *Journal of Sport and Health Science* xx, p.1–8, 2015.

MAcANUFF, M.A.; OMORUYI, F.O.; MORRISON, E.Y.; ASEMOTA, H.N. Hepact function enzymes and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats fed bitter Yam (*Discorea Polygonoides*) steroidal sapogenin extract. *Diabetologia Croatica*, v.32, n.1, p. 17-23, 2003.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour Encapsulation and Controlled Release - a Review. *International Journal of Food Science Technology*, v.41, n. 1, 1-21, 2006.

MAJEED, M.; PRAKASH, L. Fenusterols®: product write-up - Sabinsa Corporation. p.6-8, 2007.

- MANIKANDASELVI, S.; SUBALAKSHMI, R.; THINAGARBABU, R.; RAVIKUMAR, R. Evaluation of antidiabetic potential of ethanolic extract of leaves of *ficus bengalensis* Linn. *Inter J. Pharma and Bio Sciences*, v.3, n.2, p.108-113, 2013.
- MARCOCCI L, MAGUIER JJ, DROY-LEFAIX MT, PACKER L. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract. *Biochem Res Commun*. v.201, n.2, p.748–755, 1994.
- MATEOS, R.; BAEZA, G.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, S.; SARRIÁ, B.; BRAVO, L. LC–MS characterization of saponins in mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil) and their quantification by HPLC-DAD. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.63, p.164-170, 2017.
- MATOS, J.; MIRANDA, C.; POON, P.S.; MANSILLA, H.D. Nanostructured hybrid TiO₂-C for the photocatalytic conversion of phenol. *Solar Energy*, v.134, p.64-71, 2016.
- MATSUURA, H. Saponins in Garlic as Modifiers of the Risk of Cardiovascular Disease. *The Journal of Nutrition*. v.131, p.1000-1005, 2001.
- MATTÉ, G. M.; ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v. 14, p. 206-218, 2013.
- MEDIGOVIĆ, I.; RISTIĆ, N.; ŽIVANOVIĆ, J.; ŠOŠIĆ-JURJEVIĆ, B.; FILIPOVIĆ, B.; MILOŠEVIĆ, V.; NESTOROVIĆ, N. Diosgenin does not express estrogenic activity: a uterotrophic assay. *Can J Physiol Phar Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v.92, n.4, p.292-298, 2014.
- MERINO, F.J.Z.; OLIVEIRA, V.B.; PAULA, C.S.; CANSIAN, F.C.; SOUZA, A.M.; ZUCHETTO, M.; HIROTA, B.C.K.; DUARTE, A.F.S.; KULIK, J.D.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.17, n.4, p.1031-1040, 2015.
- MIURA S, WATANABE J, TOMITA T, SANO M, TOMITA I. The inhibitory of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu²⁺ mediated oxidative modification of low density lipoproteion. *Biol Pharm Bull*. v.17, n.12, p.1567-1572, 1994.
- MOTAAL, A.A.; ASKARYA, H.E.; CROCKETTC, S.; KUNERTD, O.; SAKRB, B.; SHAKERB, S.; GRIGOREE, A.; ALBULESCUE, R.; BAUER, R. Medicinal Properties, Phytochemistry and Pharmacology of *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae). *Pak. J. Bot*. v. 46, n. 1, p. 399-404, 2015.
- MUHOZA, B.; ZHANG, Y.; XIAA S.; CAIB, J.; ZHANGA, X.; SU, J. Improved stability and controlled release of lutein-loaded micelles based on glycosylated casein via Maillard reaction. *Journal of Functional Foods*, v.45, p.1–9, 2018.
- MULINACCI, N.; VIGNOLINI, P.; LA MARCA, G.; VINCIERI, F.F. Food supplements of *Tribulus terrestris* L.: An HPLC-ESI-MS method for an estimation of the saponin content. *Chromatographia*, v.57, n.9, p.581-592, 2003.
- NAVARRO DEL HIERRO, J.; HERRERA, T.; GARCÍA-RISCO, M.R.; FORNARI, T.; REGLERO, G.; MARTIN, D. Ultrasound-assisted extraction and bioaccessibility of saponins from edible seeds: quinoa, lentil, fenugreek, soybean and lupin. *Food Research International*, v.109, p.440–447, 2018.

NAZ, R.; AYUB, H.; NAWAZ, S.; ISLAM, ZU.; YASMIN, T.; BANO, A.; WAKEEL, A.; ZIA, S.; ROBERTS, T.H. Antimicrobial activity, toxicity and anti-inflammatory potential of methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. *BMC Complement Altern Med*, v.8, n.17, p.302.

NEGRÃO-MURAKAMI, A.N.; NUNES, G.L.; PINTO, S.S.; MURAKAMI, F.S.; AMANTE, E.R.; PETRUS, J.C.C.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C. *LWT. Food Science and Technology*, p.1-7, 2016.

NETO, A.G.; SILVA COSTA, A.A.; COSTA, J.M.L.C.; VINHOLIS, A.H.C.; SOUZA, G.H.B.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.E.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal in vitro activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. *Phytomedicine*, v.11, p.662–665, 2006.

NEYCHEV, V., MITEV, V. Pro-sexual and Androgen Enhancing Effects of *Tribulus terrestris* L.: Fact or Fiction. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016.

NING, Z.; LI, Y.K.; ZHOU, Y. Effect and mechanism of methyl protodioscin in protecting cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western medicine*, v. 30, n.4, p.407-9, 2015.

NIÑO, J.; JIMÉNEZ, D.A.; MOSQUERA, O.M.; CORREA, Y.M. Diosgenin quantification by HPLC in a *Dioscorea polygonoides* tuber collection from colombian flora. *J. Braz. Chem. Soc*, v.18, n.5, 2007.

NUNES, G.L.; MENEZES, C.R. Microencapsulação por spray drying dos compostos bioativos do extrato aquoso de erva mate (*Ilex paraguariensis*) crioconcentrado. *Ciência e Natura*, v.37, p.18-29, 2015.

NURSTEN, H. E. The Maillard reaction: chemistry, biochemistry, and implications. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005. 226 p.

OBEIDAT, W.M. Recent patents review in microencapsulation of pharmaceuticals using the emulsion solvent removal methods. *Recent patents on Drugs Delivery and Formulation*. v.3, n.3, p.178-192, 2009.

OGASAVARA, J.M.N.; Caracterização e instantaneização de maltodextrinas em pó com dextrose-equivalente entre 04 e 20. Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, SP, Brasil, 2004.

ORHAN, I.; SENER, B.; CHOUDHARY, M. I.; KHALID, A. Acetylcholinesterase and butyryl cholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 91, p. 57–60, 2004.

OZSOY, M.G.; ÖZYER, T.; POLAT, F.; ALHAJJ, R. Realizing drug repositioning by adapting a recommendation system to handle the process. *BMC Bioinformatics*, v.19, p.136, 2018.

PABÓN, A.; ESCOBAR, G.; VARGAS, E.; CRUZ, V.; NOTARIO, R.; BLAIR, S.; ECHEVERRI, F. Diosgenone Synthesis, Anti-Malarial Activity and QSAR of extraction of

saponins from *T. terrestris*. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, p.1-8, 2017.

PAGUREVA, A.; TCHOLAKOVA, S.; GOLEMANOV, K.; DENKOVA, N.; PELANB, E.; STOYANOV, S.D. Surface properties of adsorption layers formed from triterpenoid and steroid saponins. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, v. 491, p.18-28, 2016.

PASCHOAL, L. R. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v.39, n.1, 2003.

PEREIRA, M.A.O.; PEREIRA, V.S.; PEREIRA, E.A.Z.; MOREIRA, D.C.F.; VILELA, B.S. Influência do uso de *lepidium meyenii* walp e *tribulus terrestris* on lipid profile and oxidative stress in isoproterenol induced myocardial necrosis in male albino wistar rats. EXCLI Journal, v.12, p.373-383, 2013.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. Journal of Biotechnology and Biodiversity, v.3, n.4, p.146-152, 2012.

PEREIRA, M.A.O.; PEREIRA, V.S.; PEREIRA, E.A.A.; MOREIRA, D.C.F.; VILELA, B.S. Influência do uso de *lepidum meyenii* walp e *Tribulus terrestris* em praticantes de musculação. Revista Brasileira de Nutrição Esportiva. v.11, n.67, p.836-847. 2017.

PEREIRA, M.A.O.; PEREIRA, V.S.; PEREIRA, E.A.A.; MOREIRA, D.C.F.; VILELA, B.S. Influência do uso de *lepidum meyenii* walp e *Tribulus terrestris* em praticantes de musculação. Revista Brasileira de Nutrição Esportiva. v.11, n.67, p.836-847. 2017.

PINTO, L.A.M.; MATEUS, G.A.P.; TAVARES, F.O.; BAPTISTA, A.T.A.; HIRATA, A.K.M.; SILVA, O.; GOMES, R.G.; BERGAMASCO, R.C. Avaliação do efeito da secagem na viabilidade de microrganismos probióticos microencapsulados em alginato. Revista UNINGÁ Review, v.23, n.1, pp.11-14, 2015.

PIZARRO, A.P.B.; FILHO, A.M.O.; PARENTE, J.P.; MELO, M.T.V.; SANTOS, C.E.; LIMA, P.R.O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v.32, n.1, p.23-29, 1999.

POKRYWKA, A.; MORAWIN, B.; KRZYWANSKI, J.; ZEMBRON-LACNY, A. An Overview on *Tribulus terrestris* in Sports Nutrition and Energy Regulation. University of Zielona Gora, Zielona Gora, Poland; National Centre for Sports Medicine, Warsaw, Poland. Chapter 9, 2017.

PONCELET, D. Microencapsulation: Fundamentals, methods and applications. Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science, p.23-34, 2006.

PRAKASH, L.; MAJEED, M. Natural ingredients for anti-ageing skin care. Skin Care, v. 2, 2007.

PYCIA, K.; JUSZCZAK, L.; GAŁKOWSKA, D.; JAWORSKA, G. Maltodextrins from chemically modified starches: Selected physicochemical properties. Carbohydrate Polymers, v.146, 2017.

QASIM, M.; ABIDEEN, Z.; ADNAN, M.Y.; GULZAR, S.; GUL, B.; RASHEED, M.; KHAN, M.A. Antioxidant properties, phenolic composition, bioactive compounds and nutritive value of medicinal halophytes commonly used as herbal teas. *South African Journal of Botany*, p. 1-11, 2017.

QUAN, H.J.; KOYANAGI, J.; FUSAO, K.; SAITO, S. Preparations of vitamin D analogs, spirostanols and furostanols from diosgenin and their cytotoxic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.40, p.662–673. 2005.

RAJU, J.; MEHTA, R. Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutr Cancer*. v. 61, n. 1, p. 27-35, 2008.

RAMKISSOON, J.S.; MAHOMOODALLY, M.F.; AHMED, N.; SUBRATTY, A.H.; Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. *Asian Pacific Journal Tropical Medicine*, v.6, p.562–569, 2013.

RE´, M.I. Formulating drug delivery systems by spray drying, *Drying Technol.* v.24, p.433-446, 2006.

REBELO, A.I.M.A. Diosgenina e derivados oxidados: potenciais agentes antitumorais e antifungicos. Dissertação de Mestrado, UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR-Ciências, p.1-74, 2011.

REN, Y.; CHEN, Y.; HU, B.; WU, H.; LAI, F.; LI, X. Microwave-assisted extraction and a new determination method for total steroid saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright. *Steroids*, 2015.

ROBERT, P.; GORENA, T.; ROMERO, NALDA.; SEPULVEDA, E.; CHAVEZ, J.; SAENZ, C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, v.45, p.1386–1394, 2010.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROSS, I.A. *Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Uses*. Human Press, Totowa, New Jersey, 2005.

RUFINO, M.S.M., ALVES, R.E, BRITO, E.S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F., MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, v.121, p.996-1002, 2010.

SADEGHI, M.; ZOLFAGHARI, B.; SENATORE, M.; LANZOTTI, V. Spirostane, furostane and cholestane saponins from Persian leek with antifungal activity. *Food Chemistry*. v.141, p.1512–1521, 2013.

SAILAJA, K.V.; SHIVARANJANI, V.L.; POORNIMA, H.; RAHAMATHULLA, S.B.M.; DEVI, K.L. Protective effect of *Tribulus terrestris* l. fruit aqueous extract on lipid profile and oxidative stress in isoproterenol induced myocardial necrosis in male albino Wistar rats. *Experimental and Clinical Sciences*, v.12, p.373-383, 2013.

SALGADO, R.M.; MARQUES-SILVA, M.H. GONÇALVES, E.; MATHIA, A.C.S.; AGUIAR, J.G.; WOLFF, P. Effect of oral administration of *Tribulus terrestris* extract on semen quality and body fat index of infertile men. *International Journal of Andrology*, p.1-6, 2016.

SANTIAGO-ADAME, R.; MEDINA-TORRES, L.; GALLEGOS-INFANTE, J.A.; CALDERAS, F.; GONZÁLEZ-LAREDO, R.F.; ROCHA-GUZMÁN, N.E.; OCHOA-MARTÍNEZ, L.A.; BERNAD BERNAD, M.J.; Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. *Food Science and Technology*, p.1-33, 2015.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: uma alternativa viável. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.3, n.16, 2008.

SARVIN, B.; STEKOLSHCHIKOVA, E.; RODIN, I.; STAVRIANIDI, A.; SHPIGUN, O. Optimization and comparison of different techniques for complete extraction of saponins from *T. terrestris*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v.8, p.75-82, 2018.

SARKAR, M.; MAHATO, S.B. Homogeneous Enzyme Immunoassay of Diosgenin and Its Glycosides. *Analytical Biochemistry*, v.136, p.168-174, 1984.

SAUVAIRE, Y.; RIBES, G.; BACCOU, J.C.; LOUBATIERES-MARIANI, M.M. SCHENKEL, E.P.; MONTANHA, J.A.; GOSMANN, G. Triterpene saponins from mate, *Ilex paraguariensis*. *Adv Exp Med Biol*, v.405, p.47-56, 2001.

SCHMITZ, W.O.; SIMÃO, A.N.C.; CECCHINI, R.; SARIDAKIS, H.O. Estresse oxidativo em eritrócitos submetidos a 2,2-azobis amidinopropano (AAPH): efeito antioxidante e anti-hemolítico do chá verde (*Camellia sinensis*). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, v.12, n.3, p. 175-179, 2008.

SECOLIN, V.A. Microencapsulação de compostos bioativos de *Camellia sinensis* em sistemas lipídicos por spray-drying. 113 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

SEN, S.; CHAKRABORTY, R. Revival, modernization and integration of Indian traditional herbal medicine in clinical practice: Importance, challenges and future. *Journal Traditional and Complementary Medicine*, v.7, n.2, p. 234-244, 2017.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.(Orgs). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, p.1104, 2007.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, v.18,p. 820–897, 2017.

SHANMUGAMA, G.; MOHANKUMARA, A.; KALAISELVIA, D.; NIVITHAB, S.; MURUGESH, E.; SHANMUGHAVELC, P.; SUNDARARAJ, P. Diosgenin a phytosterol substitute for cholesterol, prolongs the lifespan and mitigates glucose toxicity via DAF-16/FOXO and GST-4 in *Caenorhabditis elegans*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.95, p.1693–1703, 2017.

SHARMA, M. K.; KUMAR, A. *Ocimum sanctum* aqueous leaf extract provides protection against mercury induced toxicity in swiss albino rats. *Indian J. Exp. Biol*, v.40, p.1079-1082, 2002.

SHEN, J.; YANG, X.; MENG, Z.; GUO, C. Protodioscin ameliorates fructose-induced renal injury via inhibition of the mitogen activated protein kinase pathway. *Phytomedicine*, 2016.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. *Revista de Nutrição*, v.24, n.6, p.895-904, 2011.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, *Redox Biology*, 2015.

SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40, n.4, p.994-1002, 2010.

SILVA, A.A.; JUNIOR, J.L.B.; BARBOSA, M.I.M.J. Farinha de banana verde como ingrediente funcional em produtos alimentícios. *Ciência Rural*, v.45, n.12, p.2252-2258, 2015.

SILVA, C.R.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.39, n.1, p. 1-9, 2003.

SILVA, F. C.; FONSECA, C. R.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; CARVALHO BALIEIRO, J. C.; PITTIA, P.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. *Food and Bioproducts Processing*, v.91, p.28–36, 2013.

SILVA, M.T.; ZANCAN, R.L.; LORENZONI, N.G; FRANCO, C.C.; BONA, S.C.; RAGAGNIN, M.C. Encapsulação de compostos bioativos por coacervação complexa. *Ciência e Natura*, v.37, n.5, p.56-64, 2015.

SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M.A.; MENEZES, C. R.; FRIES, L. M.; MENEZES, M. F. C.; STEFANELLO, F. S. Microencapsulação De Probióticos: Inovação Tecnológica Na Indústria De Alimentos. *Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas - UFSM, Santa Maria Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET*. v. 18, p. 66-75, 2014.

SINGH, S.; BROCKER, C.; KOPPAKA, V.; CHEN Y.; JACKSON, B. C.; MATSUMOTO A.; THOMPSON D. C.; VASILIOU, V.A. Idehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radical Biol Med*. v. 56, p. 89-101, 2013.

SISTO, M.; LISI, S.; D'AMORE, M.; LUCRO, R.; CARATI, D.; CASTELLANA, D.; LA PESA, V.; ZUCCARELLO, V.; LOFRUMENTO, D. D. Saponins from *Tribulus terrestris* L. protect human keratinocytes from UVB-induced damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. v.117, p.193–201, 2006.

SKHIRTLADZE, A.; PERRONE, A.; MONTORO, P.; BENIDZE, M.; KEMERTELIDZE, E.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Steroidal saponins from *Yucca gloriosa* L. rhizomes: LC–MS profiling, isolation and quantitative determination. *Phytochemistry*. n.72, p.126-135, 2011.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M. E. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Research Reviews*, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.

SOUSA, E.O.; MIRANDA, C.M.B.A.; NOBRE, C.B.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.I.; COSTA, J.G.M. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *Lantana camara* and *Lantana montevidensis* extracts. *Ind Crop Prod*, v.70, p.7–15, 2015.

SOUSDALEFF, M.; BAESSO, M.L.; MEDINA NETO, A.; NOGUEIRA, A.C.; MARCOLINO, V.A.; MATIOLI, G. Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixinate and curcumin with maltodextrin: stability, solubility, and food application. *J Agric Food Chem*. v.4, p.955-65, 2013.

SOUZA, T. C. R.; PARIZE, A. L.; BRIGHENTE, I. M. C.; FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M. Chitosan microspheres containing the natural urucum pigment. *Journal of Microencapsulation*, v. 22, p. 511–520, 2005.

SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; STADEN, J.V. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, v.94, n.2-3, p.219-43, 2004.

STÉPHANE JAISSON; PHILIPPE GILLERY. Innovative approaches in diabetes diagnosis and monitoring: less invasive, less expensive but less, equally or more efficient ? *Clin Chem Lab Med*, 2018.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009.

SU, H. S.; CHOI, Y. H.; Jeong, W.; Kwon, J. G.; Kim, J. K.; Seo, C.; Ahn, E. K.; Lee, H. H.; Ko, H. J.; Seo, D. W.; Oh, J. S. Two new furostanol glycosides from the fruits of *Tribulus terrestris*. *Tetrahedron Letters* v. 54, p. 3967–3970, 2014.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; TAN, L. H.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Alginato/starch composites as wall material to achieve microencapsulation with high oil loading. *Journal of Microencapsulation*, v. 26, n. 03, 263-271, 2009.

SUEISHI, Y.; HORI, M. Nitric oxide scavenging rates of solubilized resveratrol and flavonoids. *Nitric Oxide*, v.29, p.25-29, 2013.

TARCITANO, L.A.C.; MESQUITA, E.F.M. Ação dos condimentos alimentares in natura sobre a microbiota patógena durante o processamento, preparo e/ou consumo do pescado: uma revisão sistemática de literatura. *Arq. Ciên. Mar, Fortaleza*, v.50, n.1, p.141-162, 2016.

TIWARI, S.; GOEL, A.; JHA, K.K.; SHARMA, A. Microencapsulation techniques and its application: a review. *The Pharma research*, v.3, n.12, p. 112-116, 2010.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINBINGER, M.D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.2, p.444-450, 2009.

TRINDADE, C.S.F.; PINHO, S.C.; ROCHA, G.A. Review: Microencapsulation of food ingredients. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.11, n.2, p.103-109, 2008.

TROISE, A.D.; WILTAFSKY, M.; FOGLIANO, V.; VITAGLIONE, P.; The quantification of free Amadori compounds and amino acids allows to model the bound Maillard reaction products formation in soybean products. *Food Chem.* v.1, n.247, p.29-38, 2018.

UEMURA, T.; HIRAI, S.; MIZOGUCHI, N.; GOTO, T.; LEE, JOO-YONG.; TAKETANI, K.; NAKANO, Y.; SHONO, J.; HOSHINO, S.; TSUGE, N.; NARUKAMI, T.; TAKAHASHI, N.; KAWADA, T. Diosgenin present in fenugreek improves glucose metabolism by promoting adipocyte differentiation and inhibiting inflammation in adipose tissues. *Molecular Nutrition Food Research*, v.54, n.11, p. 1596-1608, 2010.

VALENTE, E. P. O uso de antioxidantes na prevenção da doença. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde. Porto, p. 1-92, 2014.

VASCONCELOS, T. B.; CARDOSO, A. R. N. R.; JOSINO, J. B.; MACENA, R. H. M.; BASTOS, V. P. D. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, v.16, n.3, p.213-9, 2014.

VEN-SHING, W.; TA-YUAN, C.; CHIEN-CHEN, L.; SAN-YUE, C.; LONG-CHEN, H.; KEH-PING, C. Application of solid phase microextraction on dental composite resin analysis. *Journal of Chromatography B*, v.903, p.88-94, 2012.

VESILADA, E.; HONDA, G.; SEZIK, E.; TABATA, M.; FUJITA, T.; TANAKA, T.; TAKEDA, Y.; TAKAISHI, Y. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the Inner Taurus Mountains. *Journal Ethnopharmacol.* v.46, p.133–152, 1995.

VESPERINI, D.; CHAPUT, O.; MUNIER, N.; MAIRE, P.; EDWARDS-LÉVY, F.; SALSAC, V.A.; GOFF, A.L. Deformability- and size-based microcapsule sorting. *Medical Engineering Physics*, v.48, p.68-74, 2017.

VIALTA, A.; MADI, L.F.C. Ingredients, processed functional foods. *Braz. J. Food Technol.* v.21, e2017010, 2017.

VINCKEN, J.P.; HENG, L.; GROOT, A.H. Gruppen, Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom, *Phytochemistry*, v.68, p.275–297, 2007.

VLADIĆ, J.; AMBRUS, R.; SZABÓ-RÉVÉSZ.; P.; VASIĆ, A.; CVEJIN, A.; PAVLIĆ, B.; VIDOVIĆ, S. Recycling of filter tea industry by-products: Production of *A. millefolium* powder using spray drying technique. *Industrial Crops and Products*, v.80, p.197-206, 2016.

WAUTIER, M.P.; GUILLAUSSEAU, P.J.; WAUTIER, J.L. Activation of the receptor for advanced glycation end products and consequences on health. *Diabetes Metab Syndr.* v.11, n.4, p. 305-309, 2017.

WALLACE, F.; BANNADJI, G.; FERREIRA, F.; OLIVARO, C. Analysis of an immunoadjuvant saponin fraction from *Quillaja brasiliensis* leaves by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry. *Phytochemistry Letters*, v.20, p.228–233, 2017.

WANG, R.Y.; CHEN, G.; YU, C.Y. Chemical constituents of *Tribulus terrestris* L. J B Univ Chem Technol (Nat Sci Ed), v.36, p.79–82, 2010.

WANG, Z.; ZHANG, D.; HUI, S.; ZHANG, Y.; HU, S. Effect of *Tribulus terrestris* saponins on behavior and neuroendocrine in chronic mild stress depression rats. J Tradit Chin Med., v.33, n.2, p.228-32, 2013.

WEST, E.; KRYCHMAN, M. Natural Aphrodisiacs—A Review of Selected Sexual Enhancers. Sexual Medicine Reviews. v.3, p.279-288, 2015.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production – A review. J Agric Food Chem., v.53, p.8093–8105.

XI, M.; HAI, C.; TANG, H.; CHEN, M.; FANG, K., LIANG, X. Antioxidant and Antiglycation Properties of Total Saponins extracted from Traditional Chinese Medicine used to treat Diabetes Mellitus. Phytotherapy Research, v.22, p.228-237, 2008.

XI, M.; HAI, C.; TANG, H.; WEN, A.; CHEN, H.; LIU, R.; LIANG, X.; CHEN, M. Antioxidant and antiglycation properties of triterpenoid saponins from *Aralia taiabaiensis* traditionally used for treating diabetes mellitus. Redox Report, v. 15, n.1, p. 21-28, 2013.

XIA, Y.; YANG, L.; XIA, L. Preparation of a novel soluble inducer by cellobiase-release microcapsules and its application in cellulase production. Journal of Biotechnology, v.279, p.22–26, 2017.

YAN, Y.T.; LI, S.D.; LI, C.; XIONG, Y.X.; LU, X.H.; ZHOU, X.F.; YANG, L.Q.; PU, L.J.; LUO, H.Y. Panax notoginsenoside saponins Rb1 regulates the expressions of Akt/mTOR/PTEN signals in the hippocampus after focal cerebral ischemia in rats, Behavioural Brain Research, p.1-18, 2015.

YANG HL, CHEN SC, CHANG NW, CHANG JM, LEE ML, TSAI PC, FU HH, KAO WW, CHIANG HC, WANG HH, HSEU YC. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. Food Chem. Toxicol. v.44, n.9, p.1513–1521, 2018.

YAZDI, F. F.; GHALAMKARI, G.; TOGHYANI, M.; MODARESI, M.; LANDY, N. Efficiency of *Tribulus terrestris* L. as an antibiotic growth promoter substitute on performance and immune responses in broiler chicks. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. v.4, n.2, p.1014-1018, 2014.

YE, Q.; GEORGES, N.; SELOMULYA, C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. Trends in Food Science Technology, n.78, p. 167-179, 2018.

YUE, L.; CHEN, L.; KOU, J. P. Recent advances of diosgenin in its pharmacological activities and mechanism. Chin J Clin Pharmacol, v.15, n.2, p.233-237, 2010.

ZANDALINAS, S. I.; MITTLER, R.; BALFAGÓN, D.; ARBONA, V.; and GÓMEZ-CADENAS, A. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. Physiol. Plant, 2017.




ZHANG, X.; GUO, Z.; LI, J.; ITO, Y.; SUN, W. A new quantitation method of protodioscin by HPLC-ESI-MS/MS in rat plasma and its application to the pharmacokinetic study. *Steroids*, v.106, p.62-69. 2016.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, v.64, p.555-559, 1999.

ZHOU, M.; HUANG, L.; LI, L.; WEI, Y.; SHU, J.; LIU, X.; HUANG, H. New furostanol saponins with anti-inflammatory and cytotoxic activities from the rhizomes of *Smilax davidiana*. *Steroids*, 2017.

ZHU, W.; DU, Y.; MENG, H.; DONG, Y.; LI, I. A review of traditional pharmacological uses, phytochemistry, and pharmacological activities of *Tribulus terrestris*. *Chemistry Central Journal*, v.11, p.60, 2017.

Anexo 1

Vigilância Sanitária CEVS 353870901-519-00001-1-6 M.S. 1.05.983-7	CONTROLE DE QUALIDADE Laudo de Análise	Farmacêutica Responsável:  Dra. Paula Mariana Pezzatti CRF-SP 35044		
 EMPRESA BRASILEIRA DE RADIAÇÕES LTDA.				
Flores e ervas Com. Farm. Ltda. - Estrada Vicente Bellini, 175 - Piracicaba - SP CNPJ: 00.602.210/0001-50 E-mail: florien@florien.com.br Website: www.florien.com.br Fone: (19) 3429-1199				
INFORMAÇÕES GERAIS				
Nosso Lote : 052891	Parte utilizada : Fruto	Validade/ fornecedor: 03/2017		
Nomenclatura : TRIBULUS EXT. SECO 40%	Esterilização : Não houve	Validade/ nosso lote : 03/2017		
Nome científico : Tribulus terrestris	Manufatura : 03/2014	Método de secagem : Spray Dryer		
Origem : China	Lote de origem : 04062746			
ASPECTOS MACRO E MICROSCÓPICOS				
Não é realizado análise microscópica por não ser possível a visualização das estruturas histológicas que caracterizam a espécie.				
CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS				
Cor : Marrom claro	Odor : Característico	Sabor : Característico		
CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS				
Aspecto	Especificação	Resultado	Especificação	Resultado
pH	De 3 a 6,5	3,25 [1:10]		Parcialmente solúvel em água
Elementos estranhos	Ausente	De acordo	Solubilidade	
Umidade	De 1 a 9 %	3,2%	Densidade	De 0,25 a 0,75 g/ml
Cinzas totais	De 0,1 a 11 %	0,33%	Líquido extrator	NA
Cinzas insolúveis	De 0,01 a 4 %	0,099%	Teor alcoólico	NA
Metais pesados	NA	NA	Resíduo seco	NA
TESTES DE IDENTIFICAÇÃO				
Positivo para Saponinas	4	1-Identificação por colorimetria 2-Espectrometria na região ultravioleta-visível 3-Cromatografia por camada delgada 4-Outros		
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS				
Análise	Especificação	Resultado		
Contagem padrão em placas	< 10000 ufc/g	Máx. 10.000 ufc/g		
Bolores e leveduras	< 100 ufc/g	Máx. 100 ufc/g ou ml		
Contagem de enterobactérias	< 100 ufc/g	Máx. 100 ufc/g ou ml		
<i>Escherichia coli</i> (coliformes)	Ausente	Ausência		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausência		
<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	Ausente	Ausência		
<i>Salmonella sp</i>	Ausente	Ausência		
TEOR DE PRINCÍPIO ATIVO				
Especificação	Resultado	Método utilizado		
**Teor de Saponinas:	43,21%	1-Identificação por colorimetria 2-Espectrometria na região ultravioleta-visível 3-Cromatografia por camada delgada 4-Outros		
CONCLUSÃO DA ANÁLISE				
Aprovado	DATA DA ANÁLISE 20/06/2014	DATA DA IMPRESSÃO		
OBS → Sem compactação. **Laudo fornecedor				

Anexo 2



FACULDADE DE CIÊNCIAS E
LETRAS - UNESP/ CAMPUS DE
ASSIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da atividade antioxidante pelo método hemolítico (ex vivo)

Pesquisador: Regildo Márcio Gonçalves da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35837814.3.0000.5401

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 833.386

Data da Relatoria: 16/09/2014

Apresentação do Projeto:

A membrana eritrocitária é ricamente composta de ácidos graxos poli-insaturados, o que a torna muito susceptível ao ataque de radicais livres e por isso é um bom modelo experimental para o estudo da lesão oxidativa. A ação dos radicais livres nos eritrócitos pode levar a uma série de alterações, como formação de lipoperóxidos, redução da deformabilidade, mudanças na morfologia, ligação cruzada e fragmentação de proteínas, hemólise e alterações no metabolismo intracelular (BEGUM e TERAQ, 2002).

Sato et al. (1995) e posteriormente Simão et al. (2005) realizaram estudos para avaliar a ação dos radicais livres gerados pelo AAPH sobre a membrana de hemácias humanas. Os radicais gerados pelo AAPH levam à lipoperoxidação da membrana da hemácia, sendo capaz de causar hemólise oxidativa em eritrócitos. Simão et al. (2006) demonstraram a atividade antioxidante e anti-hemolítica da genisteína, uma isoflavona da soja, usando este modelo de hemólise peroxidativa. (texto informado pelo pesquisador)

Objetivo da Pesquisa:

O estudo tem como objetivo promover a coleta de sangue de voluntários saudáveis, com a finalidade de avaliação do potencial antioxidante pelo método anti-hemolítico de compostos de origem natural sobre os eritrócitos, em ensaio ex-vivo.

(texto informado pelo pesquisador).

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100

Bairro: Vila Tênis Clube

CEP: 19.806-900

UF: SP

Município: ASSIS

Telefone: (18)3302-5607

Fax: (18)3302-5804

E-mail: cep@assis.unesp.br