

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do potencial antioxidante e efeito antiadipogênico das frações n-butanol das folhas de *Bauhinia forficata* Link e das cascas do fruto de *Annona crassiflora* Mart em adipócitos 3T3-L1

Pedro Henrique Gonçalves André

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

Uberlândia –MG

Julho –2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do potencial antioxidante e efeito antiadipogênico das frações n-butanol das folhas de *Bauhinia forficata* Link e das cascas do fruto de *Annona crassiflora* Mart em adipócitos
3T3-L1

Pedro Henrique Gonçalves André

Françoise Vasconcelos Botelho
(Instituto de Biotecnologia)

Natássia Caroline Resende Corrêa
(Instituto de Biotecnologia)

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

Uberlândia – MG
Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do potencial antioxidante e efeito antiadipogênico das frações n-butanol das folhas de *Bauhinia forficata* Link e das cascas do fruto de *Annona crassiflora* Mart em adipócitos

3T3-L1

Pedro Henrique Gonçalves André

Françoise Vasconcelos Botelho
(Instituto de Biotecnologia)

Natássia Caroline Resende Corrêa
(Instituto de Biotecnologia)

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Coordenador do Curso Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG
Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação do potencial antioxidante e efeito antiadipogênico das frações n-butanol das folhas de *Bauhinia forficata* Link e das cascas do fruto de *Annona crassiflora* Mart em adipócitos
3T3-L1

Pedro Henrique Gonçalves André

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Françoise Vasconcelos Botelho
Presidente da Banca

Uberlândia, de de

RESUMO

A obesidade resulta do aumento do tamanho e número de adipócitos e estudos revelam que o estresse oxidativo contribui para a intensificação da diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, pois aumentam a ativação e expressão de proteínas adipogênicas. Os antioxidantes podem combater o estresse oxidativo e, conseqüentemente, reduzir a diferenciação dessas células, o que seria interessante para um efeito antiobesidade. Sabe-se que as frações n-butanol das cascas do fruto de *Annona crassiflora* Mart (araticum) e das folhas de *Bauhinia forficata* Link (pata-de-vaca) têm uma tremenda capacidade antioxidante. A proposta deste trabalho foi analisar o efeito das frações n-butanol da casca do araticum e das folhas de pata-de-vaca em células 3T3-L1, e avaliar as possíveis atividades antiadipogênicas através da: verificação da capacidade antioxidante dos tratamentos em meio adipogênico caseiro, análise da atividade de enzimas antioxidantes e da coloração *Oil Red O*. A partir desses métodos, as frações não demonstraram promover um efeito antiobesidade na concentração e tempo de tratamento utilizados, possivelmente devido à baixa concentração administrada.

Palavras-chave: obesidade; antioxidante; adipogênese.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Obesidade.....	6
1.2 Adipócitos.....	6
1.3 Proteínas envolvidas na adipogênese.....	7
1.4 Estresse oxidativo.....	8
1.5 Produtos Naturais.....	9
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. Obtenção das frações e quercetina.....	11
3.1.1. Obtenção da fração n-butanol das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> (FBF).....	11
3.1.2. Obtenção da fração n-butanol da casca do fruto de <i>Annona crassiflora</i> (CFAC)..	12
3.1.3. Obtenção da Quercetina (Q).....	12
3.2. Obtenção e manutenção das células.....	13
3.3. Cultura de células e diferenciação adipogênica.....	13
3.4. Verificação da diferenciação adipogênica.....	14
3.4.1. Coloração Vermelho Nilo e Hoechst 33342.....	14
3.5. Ensaio de viabilidade celular.....	14
3.6. Determinação da capacidade antioxidante dos tratamentos em meio adipogênico.....	15
3.6.1. Método da capacidade de redução do ferro (FRAP).....	15
3.6.2. Método do sequestro do radical peroxil (ORAC).....	16
3.7. Avaliações do Estresse Oxidativo.....	16
3.7.1. Medida das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) intracelulares.....	16
3.7.2. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes.....	17
3.8. Atividade antiadipogênica.....	19
3.8.1. Ensaio de quantificação com o Oil Red O.....	19
3.9. Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS.....	19
4.1. Capacidade de diferenciação dos adipócitos.....	19

4.2. Viabilidade Celular	20
4.3. Avaliação da capacidade antioxidante dos tratamentos em meio adipogênico.....	21
4.4. Avaliação do efeito das frações n-butanol da casca do fruto de <i>A. crassiflora</i> e das folhas de <i>B. forficata</i> nas espécies reativas de oxigênio	23
4.5. Avaliação do efeito das frações n-butanol da casca do fruto de <i>A. crassiflora</i> e das folhas de <i>B. forficata</i> na atividade de enzimas antioxidantes	24
4.5.1. Atividade da Catalase (CAT)	24
4.5.1. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	25
4.5.3. Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)	25
4.6. Efeito antiadipogênico dos CFAC, FBF e Q.....	26
4.6.1. Coloração Oil Red O	26
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo excesso de acúmulo de gordura corporal que traz prejuízos à saúde, incluindo diabetes, complicações cardiovasculares, câncer, asma, distúrbios do sono, disfunção hepática, disfunção renal e infertilidade (GARROW, 1988; JUNG, 1997; PI-SUNYER, 1991). Mais de 1,9 bilhões de adultos no mundo estão acima do peso considerado ideal. Destes, mais de 600 milhões são obesos. A prevalência mundial de obesidade mais do que duplicou entre 1980 e 2014 (OMS, 2014).

A obesidade ocorre por um desequilíbrio entre a energia ingerida e a energia gasta, devido a fatores genéticos e ambientais, resultando no aumento do tamanho (hipertrofia) e do número de adipócitos (hiperplasia) (ALBU et al, 1997; HOSSAIN et al, 2007; CARO et al, 1989).

1.2 Adipócitos

O tecido adiposo é o reservatório energético central do organismo e os adipócitos são células especializadas no armazenamento de lipídios em seu citoplasma na forma de triglicerídeos. Essas células possuem proteínas de regulação e enzimas que são utilizadas para levar à síntese de ácidos graxos e estocar triglicerídeos (TG) em períodos em que a oferta de energia é grande e, quando há falta (déficit calórico), pode-se aproveitar esses lipídios por meio da lipólise para obtenção de energia (AHIMA & FLIER, 2000).

Os adipócitos são atuantes também no metabolismo lipídico, e além da função tradicional de armazenamento de energia na forma de triglicerídeos, têm uma atividade secretora e endócrina, com produção de numerosas substâncias hormonais e não hormonais de natureza protéica ou não protéica, como citocinas clássicas, fatores de crescimento e quimiotáticos (TRAYHURN & WOOD, 2004).

As mudanças no número de adipócitos ocorrem por meio de uma sucessão complexa de eventos que envolvem proliferação e diferenciação de pré-adipócitos (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Os pré-adipócitos passam a adquirir as características de adipócitos maduros, acumulando gotículas lipídicas em seu interior e a habilidade de responder a hormônios como a insulina. A diferenciação terminal consiste na ativação de eventos transcricionais em cascata. Então, conhecer os eventos moleculares que regulam a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros (**adipogênese**) é de suma importância para a compreensão da gênese da obesidade (QUEIROZ *et al*, 2009).

O pré-adipócito 3T3-L1, uma linhagem celular derivada de camundongo, pode ser induzido *in vitro* a diferenciar-se em células de adipócitos maduras (GREGOIRE *et al*, 1998). Essas células, quando expostas a um coquetel adipogênico composto por insulina, dexametasona (DEX) e isobutilmetilxantina (IBMX), podem passar pelo processo de diferenciação. Esse “coquetel” ativa os receptores de glicocorticóides por meio da dexametasona, o receptor de IGF-1 pela insulina e a via de sinalização do AMPc através do IBMX (FÈVE, 2005; ALIAGA & MATSUMURA, 2002; FARMER, 2006).

1.3 Proteínas envolvidas na adipogênese

Existem fatores de transcrição adipogênicos, como o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR γ), a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c) e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (CCAAT/enhancer binding protein – C/EBPs), que são cruciais na cascata transcricional que ocorre durante a adipogênese (Figura 1) (FONSECA-ALANIZ *et al*, 2006).

O PPAR γ é um membro de uma superfamília de receptores nucleares e é muito expresso no tecido adiposo. Esse fator de transcrição estimulará a transcrição de muitos genes específicos dos adipócitos, bem como vai ditar o início propriamente dito da adipogênese, tendo assim, um papel essencial na regulação da diferenciação dos adipócitos (TONTONOZ *et al*, 1995).

As Proteínas Ligantes ao Amplificador CCAAT (C/EBPs) possuem as isoformas α , β e δ que são bastante expressas no adipócito e induzidas durante a adipogênese. A C/EBP α tem um papel crítico na diferenciação em adipócitos maduros. A C/EBP β e a C/EBP δ atuam na fase inicial da diferenciação, induzidas por DEX e IBMX durante a diferenciação dos adipócitos, o que estimula a expressão de PPAR γ , o qual é um forte estimulante da complexa cascata de diferenciação e atua de forma sinérgica com a C/EBP α para indução da diferenciação (TONTONOZ *et al*, 1994; HU *et al*, 1995; FARMER, 2006).

A proteína SREBP tem um papel muito importante na adipogênese, na homeostase dos ácidos graxos e também na sensibilidade à insulina. O fator de determinação e diferenciação dependente do adipócito (ADD1) é homólogo à isoforma SREBP-1c de humanos. *In vitro*, o ADD1/SREBP-1c aumenta a transcrição de PPAR γ , aumentando o número de células submetidas ao processo de diferenciação (OSBORNE, 2000; TONTONNOZ et al, 1993).

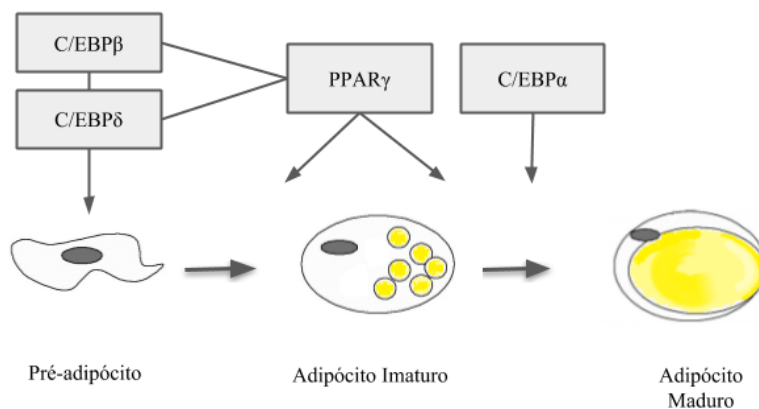


Figura 1. Algumas proteínas envolvidas na adipogênese. Fonte: FONSECA-ALANIZ et al, 2006 (adaptado).

Essas proteínas e fatores de transcrição, então, são alguns dos responsáveis pela manutenção do fenótipo adipocitário e pela diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos. O excesso de adipogênese pode conduzir ao desenvolvimento da obesidade e doenças associadas como: doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, hipertensão, etc (LEITE et al, 2009).

1.4 Estresse oxidativo

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são necessárias no metabolismo das células. Porém, quando em excesso, podem levar ao estresse oxidativo que tem potencial para causar alterações celulares e também levar ao desenvolvimento de doenças cardíacas, inflamatórias, hipertensão e até mesmo alguns tipos de câncer (OH et al, 2001).

Estudos em cultura de células e em animais relataram o papel do estresse oxidativo na patogênese da obesidade indicando que o mesmo leva a um aumento na proliferação e diferenciação de pré-adipócitos (adipogênese), assim como no tamanho dos adipócitos maduros (LEE et al, 2009; SAVINI et al, 2013). Isso se dá porque as EROs vão

desempenhar um papel determinante na regulação da diferenciação dos adipócitos devido ao seu envolvimento nas regulações positivas dos fatores de transcrição adipogênicos, além de regular negativamente as enzimas antioxidantes durante a adipogênese (LEE et al., 2009). Sabe-se que com a ocorrência da obesidade, a expressão e atividade das enzimas antioxidantes são progressivamente esgotadas (SAVINI et al, 2013).

A superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e algumas peroxidases, como a glutathiona peroxidase (GPx) são enzimas antioxidantes que têm como principais funções fisiológicas inativar essas espécies que causam danos oxidativos. A SOD converte o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é uma espécie reativa de oxigênio, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A GPx usa o H_2O_2 como substrato para a oxidação de glutathiona reduzida (GSH), e assim, há a reação entre o H_2O_2 e GSH com a formação de glutathiona oxidada (GSSG) e água. E, por fim, a catalase atua reduzindo o H_2O_2 à água e diminui a peroxidação lipídica (VINCENT et al, 2007; STOCKER & KEANEY, 2004).

1.5 Produtos Naturais

Os produtos naturais correspondem a uma fonte abundante de compostos biologicamente ativos e podem ser considerados um exemplo de diversidade de moléculas com potencial reconhecido na criação de fármacos (MISHRA et al., 2008).

Muitos compostos que estão presentes nas plantas (fitoquímicos) são conhecidos por serem agentes antioxidantes naturais, podendo neutralizar ou inibir a formação de radicais livres (BARROS et al, 2010). Ademais, sabe-se que a ingestão desses componentes na dieta humana auxilia na redução dos riscos de desenvolver doenças crônicas como diabetes, hipertensão, câncer e obesidade (SAEEDI & HOSSAIN, 2015).

Esses compostos fitoquímicos presentes nas plantas podem ser divididos em três grupos principais: terpenoides, compostos nitrogenados e compostos fenólicos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Especificamente os compostos fenólicos se destacam por apresentarem várias propriedades biológicas benéficas à saúde humana (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Os flavonoides, principais compostos fenólicos encontrados nas plantas, têm uma grande capacidade de inibir a oxidação de moléculas do organismo e, dessa forma, controlam o estresse oxidativo (GOUVEIA & CASTILHO, 2011; KUMAR & PANDEY, 2013).

Esses compostos bioativos podem atuar na expressão gênica, resultando no aumento da expressão de enzimas antioxidantes, tais como a catalase, a superóxido

dismutase e as peroxidases que estão envolvidas em diversos mecanismos intracelulares contra os processos oxidativos degenerativos (LU et al., 2010).

Já existem estudos feitos com plantas ricas em compostos bioativos, como a *Baccharis trimera* Less (carqueja), que relacionam a capacidade antioxidante com a adipogênese, sugerindo uma atividade antiadipogênica. Os extratos de *Baccharis trimera* demonstraram inibir de maneira significativa, tanto a diferenciação e acúmulo de lipídios em adipócitos, quanto a expressão dos fatores de transcrição PPAR γ , C/EBP α e C/EBP β durante a adipogênese (NASCIMENTO, 2017).

Uma espécie que chama a atenção por possuir uma diversidade de moléculas antioxidantes seria a *Bauhinia forficata* Link (pata-de-vaca). É já reconhecido que as folhas dessa planta têm efeito hipoglicêmico (ALVES, 2018; PEPATO et al, 2002).

Outra espécie de interesse seria a *Annona crassiflora* Mart. Trabalhos mostram que a casca do fruto da *A. crassiflora* (araticum), é uma fonte natural de moléculas antioxidantes bioativas para aplicações clínicas, incluindo a prevenção e terapia do diabetes, já que a fração rica em polifenóis obtida da casca do fruto de *A. crassiflora* Mart possui propriedades hepatoprotetoras contra o estresse oxidativo e nitrosativo em camundongos (JUSTINO et al., 2017). Estudos também revelam que a estefalagina, um alcalóide isolado da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart possui atividade inibitória da lipase pancreática, sendo assim, um possível tratamento para a obesidade (PEREIRA et al, 2017).

Sabe-se que as frações n-butanol das folhas de pata-de-vaca e da casca do araticum possuem uma grande capacidade de concentrar os fitoquímicos presentes nas plantas (JUSTINO, 2016; ALVES, 2018).

O efeito terapêutico das frações n-butanol das folhas de *Bauhinia forficata* Link e da casca do fruto de *Annona crassiflora* Mart já é conhecido na prevenção e terapia do diabetes e no combate ao estresse oxidativo (JUSTINO, 2016; ALVES, 2018). Entretanto, ainda é desconhecido se também podem modular a diferenciação de adipócitos por meio do seu potencial antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da fração n-butanol das folhas de *Bauhinia forficata* Link e da fração n-butanol das cascas do fruto de *Annona crassiflora* Mart no estresse oxidativo e adipogênese de células 3T3-L1.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade das frações n-butanol das folhas de *Bauhinia forficata* e da casca do fruto de *Annona crassiflora* na linhagem celular 3T3-L1;
- Avaliar o efeito das frações n-butanol das plantas na adipogênese da linhagem celular 3T3-L1;
- Avaliar a capacidade antioxidante da fração n-butanol das plantas *Bauhinia forficata* e *Annona crassiflora* no meio de diferenciação;
- Analisar o estresse oxidativo dos tratamentos na linhagem 3T3-L1;
- Avaliar o efeito dos tratamentos na atividade das enzimas antioxidantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das frações e quercetina

3.1.1. Obtenção da fração n-butanol das folhas de *Bauhinia forficata* (FBF)

Foi utilizado 1,0 Kg das folhas da *B. forficata* aplicando-se o método de maceração estática, isto é, sem agitação, na qual o material ficará imerso em 5,0 L de etanol 99,8% como solvente (proporção de 1:5 m/v) durante seis dias em média. Após esse período, a solução com os extrativos foi filtrada e o solvente removido em rotaevaporador sob pressão reduzida a 40° C. O material vegetal foi macerado por mais duas vezes, utilizando-se o solvente recuperado na rotaevaporação. O extrato bruto gerado foi congelado e liofilizado para a remoção da água e posteriormente, armazenado em freezer à -20°C. Ocorreu o fracionamento do extrato etanólico e obtenção da fração de n-butanol e para isso, aproximadamente 30 g do extrato bruto foi solubilizado em 200 mL de solução metanol: água (9:1). Com o auxílio de um funil de separação, o fracionamento foi realizado com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol e água. Para esse processo, foram realizadas quatro extrações com 200,0 mL de cada solvente. Os solventes das frações foram totalmente removidos por rotaevaporação sob pressão reduzida a 40° C; as frações então

foram congeladas e liofilizadas para a remoção da água remanescente e, em seguida, armazenadas a -20° C. Foi utilizada a fração obtida com o n-butanol, pesados 0,001g da fração, dissolvidos em 1 mL de etanol absoluto (veículo), de modo que fosse obtida uma concentração de 1mg/mL. O preparado foi armazenado em microtubo, envolto com papel alumínio e mantido a -20°C.

3.1.2. Obtenção da fração n-butanol da casca do fruto de *Annona crassiflora* (CFAC)

O extrato etanólico da casca do fruto araticum foi obtido pelo processo de maceração à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Foi utilizado 1,0 kg de cascas do fruto, triturados e previamente secos em estufa a 50° C durante 24 horas. A maceração foi realizada utilizando 5,0 L de etanol 98% como solvente (proporção de 1:5 m/v). O material vegetal foi deixado em maceração durante 6 dias. Após esse período, a solução com os extrativos foi filtrada e o solvente foi removido em um rotaevaporador sob pressão reduzida a 40° C. O extrato foi congelado e liofilizado para a remoção da água. O processo de maceração com o material vegetal filtrado foi repetido até a exaustão da extração. O extrato etanólico foi armazenado a -20° C. Para a partição líquido-líquido do extrato etanólico, aproximadamente 20 g de extrato etanólico da casca do araticum foi solubilizado em 200,0 mL de solução metanol:água (9:1). Com o auxílio de um funil de separação, a partição líquido-líquido foi realizada com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol e água. Para esse processo, foram realizadas quatro extrações com aproximadamente 200,0 mL de cada solvente. Os solventes das frações foram totalmente removidos por rotaevaporação sob pressão reduzida a 40° C; as frações foram congeladas e liofilizadas para a remoção da água remanescente e, em seguida, armazenadas a -20° C. Somente a fração n-butanol foi utilizada, dissolvida em etanol absoluto (veículo), de modo que fosse obtida uma concentração de 1mg/mL da fração (0,001g da fração em 1 mL de etanol absoluto). O preparado foi armazenado em microtubo envolto com papel alumínio e mantido a -20°C.

3.1.3. Obtenção da Quercetina (Q)

A quercetina (quercetina-3-o-rhamnosídeo) foi comprada da Sigma-Aldrich. Foram pesados 0,001g da quercetina (Q) e dissolvidos em 1 mL de etanol absoluto e o preparado foi armazenado em microtubo envolto com papel alumínio e mantido a -20°C.

3.2. Obtenção e manutenção das células

Os pré-adipócitos de camundongos (linhagem 3T3-L1) foram obtidos do banco de células do Rio de Janeiro (código BCRJ0019 – BCRJ/UFRJ), livres de micoplasma.

As células foram cultivadas em garrafas médias (75 cm²) com o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) baixa glicose, 10% de soro fetal bovino, solução antibiótica/antimicótica e mantidas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após atingir confluência, as células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 96 poços (5x10³ células/poço ou 1x10⁴ células/poço) ou 24 poços (3x10⁴ células/poço) de acordo com o experimento realizado. As células foram periodicamente monitoradas quanto à presença de micoplasma e outros contaminantes.

As células foram cultivadas na sala de cultura celular no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da UFU (IBTEC).

3.3. Cultura de células e diferenciação adipogênica

Após atingirem confluência, as células que foram cultivadas em meio DMEM baixa glicose 10% de soro fetal bovino, foram incubadas em meio de diferenciação adipocitária constituído pelo meio DMEM, descrito acima, acrescido com 1µM de dexametasona, 0,5 mM de isobutilmetilxantina, 200mM de indometacina e 1µg/mL de insulina. Esse meio de diferenciação é chamado de meio adipogênico ou meio de indução (MDI). Além do meio de indução, as células foram tratadas com os tratamentos: a fração n-butanol das folhas de *Bauhinia forficata* (FBF) e a fração n-butanol da casca do fruto de *Annona crassiflora* (CFAC), os quais foram dissolvidos em etanol absoluto, numa concentração de 1 mg/mL, sendo depois diluídos no meio com as células. Também foi colocado um tratamento com quercetina (Q), um flavonóide conhecido por sua atividade antioxidante, diluído em etanol absoluto na mesma concentração dos extratos (1 mg/mL), para analisarmos seu efeito nas células e servir de comparativo com as frações. No terceiro dia de indução, o meio de diferenciação foi substituído pelo meio de manutenção dos adipócitos: meio DMEM baixa glicose 10% de soro fetal bovino e 10 µg/mL de insulina. Este meio foi trocado a cada 3-4 dias, juntamente com a adição dos tratamentos (frações e a quercetina em diferentes concentrações) até o 15º dia, no caso das células que seriam utilizadas na coloração *Oil Red O*. Os experimentos restantes foram feitos durante 72h, com uma só concentração dos tratamentos (10 µg/mL) e não foi necessária a troca do meio adipogênico. Foram usados

como controle negativo as células tratadas sem indutores de diferenciação e como controle positivo as células cultivo somente com o meio de diferenciação; ambos sem os tratamentos com as frações e a quercetina. O etanol foi utilizado em alguns experimentos

3.4. Verificação da diferenciação adipogênica

3.4.1. Coloração Vermelho Nilo e Hoechst 33342

O Vermelho Nilo é o corante ideal para detectar lipídios, pois exibe alta especificidade, afinidade e sensibilidade em relação ao grau de hidrofobicidade dos lipídios (DIAZ et al., 2008). Já o reagente Hoechst 33342 é um corante fluorescente usado para corar o DNA.

O corante Vermelho Nilo foi pré-diluído em PBS 1x (1:1000) e foram adicionados 250 µL da solução nos poços. A solução de Hoechst 33342 foi feita através da dissolução de 100 mg de Hoechst 33342 em 10 mL de água ultra pura. As colorações de Vermelho Nilo e Hoechst 33342 foram feitas para os controles negativos e positivos e, logo em seguida, foram tiradas fotografias no microscópio EVOS em um aumento de 10x para verificar a diferenciação adipocitária. Essa coloração foi realizada apenas para uma avaliação qualitativa: quanto mais corado e com maior presença de gotículas lipídicas, indicava que houve maior diferenciação dos adipócitos.

3.5. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células foi testada para diferentes concentrações das frações n-butanol de *Bauhinia forficata* e *Annona crassiflora*, de quercetina e de etanol (veículo). A viabilidade celular das células 3T3-L1 foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT em cristais de *formazan* de cor azul-púrpura que se acumula no citoplasma celular (MOSMANN, 1983). O MTT utilizado foi comprado da Thermo Fischer Scientific. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (5×10^3 células/poço) e, após 24 horas, o meio foi descartado e concentrações crescentes das frações diluídas em meio foram adicionados aos poços, em triplicata.

O meio com ou sem os tratamentos foram trocados a cada 3-4 dias. O cultivo na placa foi durante sete dias. Um ensaio de MTT também foi realizado para as células que receberam

uma concentração de 10 µg/mL dos tratamentos durante 72 horas para verificar a viabilidade celular nesse tempo e concentração também.

O controle positivo foi considerado como aqueles poços em que as células foram tratadas somente com o meio de indução e o controle negativo foi considerado como aqueles poços em que as células estavam sem os tratamentos, no caso, somente com o meio base.

Ao final do tratamento, o meio que estava nos poços com as células foi retirado e foi adicionada uma solução de MTT dissolvido em PBS1X a 5mg/mL nos poços, com período de incubação de 4 horas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as partículas insolúveis de coloração roxa, produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT, foram solubilizadas com 100 µL por poço de solução 10% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% N, N-dimetilformamida. Após 4 horas de incubação e agitação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada em todas as condições experimentais em relação ao controle (células não tratadas), que correspondeu a 100% de viabilidade.

3.6. Determinação da capacidade antioxidante dos tratamentos em meio adipogênico

As células da linhagem 3T3-L1 foram cultivadas em garrafas médias e após atingirem confluência, foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e transferidas para garrafas pequenas (25 cm²) em uma quantidade de 1x10⁶ células/garrafas. As células foram tratadas com as frações, a quercetina e o etanol, os quais foram diluídos em meio adipogênico para se obter uma concentração de 10µg/mL. As células que foram tratadas somente com o meio adipogênico e o com o meio base foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

Após 72 horas, os meios em que as células estavam, com seus respectivos tratamentos foram coletados e armazenados a uma temperatura de -20°C para futuras análises. Os métodos correspondentes a capacidade de redução do ferro (FRAP) e ao sequestro do radical peroxil (ORAC) foram realizados para verificar a capacidade antioxidante dos tratamentos.

3.6.1. Método da capacidade de redução do ferro (FRAP)

A capacidade antioxidante total dos meios com e sem os tratamentos foi avaliada pelo método FRAP. O princípio do FRAP consiste na ação das moléculas antioxidantes presentes nas amostras na redução do Fe³⁺ em Fe²⁺, o qual é quelado pelo 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine

(TPTZ) para formar um complexo Fe^{2+} -TPTZ (BENZIE; STRAIN, 1996). As amostras foram incubadas com o reagente FRAP (10 volumes de 0,3M tampão acetato de sódio, pH 3,6, 1 volume de 10mM TPTZ e 1 volume de 20mM cloreto férrico) a 37°C por 6 minutos. A absorbância foi medida a 593 nm. A capacidade antioxidante foi determinada usando uma curva analítica, construída com o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (trolox) como padrão.

3.6.2. Método do sequestro do radical peroxil (ORAC)

A análise da capacidade antioxidante pelo método de absorção do radical peroxil (ORAC) é baseada na inibição da oxidação do radical peroxil iniciada por decomposição térmica do composto 2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidroclorato; a fluoresceína é utilizada nesse método como sonda fluorescente e a perda de sua fluorescência é avaliada ao longo do tempo, na ausência e/ou presença de antioxidantes (PRIOR et al., 2003). Neste ensaio, todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato a 75 mmol/L, pH 7,4. Inicialmente, 25 μL das amostras foram misturadas a 150 μL de fluoresceína (0,085 nmol/L) e incubadas à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, foi adicionado 30 μL da solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) para dar início à reação. A intensidade de fluorescência (485nm/528nm; excitação/emissão) foi medida em fluorímetro e foi verificada a cada 1 min e 30 s durante 90 min. A perda de fluorescência da fluoresceína foi medida utilizando o cálculo da área sob a curva e a capacidade antioxidante foi determinada por meio de uma curva analítica construída com Trolox. Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos como μmol equivalentes de Trolox por grama de amostra.

3.7. Avaliações do Estresse Oxidativo

3.7.1. Medida das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) intracelulares

Foi medido o nível de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs) utilizando um corante fluorescente, denominado dicloro-dihidro-fluoresceinadiacetato (DCFH-DA). A molécula DCFH-DA emite uma fluorescência por sofrer alterações moleculares pelas

espécies reativas de oxigênio e esterases presentes dentro das células. Então, de acordo com a intensidade de fluorescência pode-se mensurar a quantidade de EROs, de forma proporcional: quanto maior for a fluorescência emitida, maior será a produção de EROs intracelulares ou menor será a inativação delas (HEMPEL et al, 1999).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) com DMEM baixa glicose 10% de soro fetal bovino, e após 24 horas, o meio foi retirado e substituído pelo meio adipogênico com adição dos tratamentos (Q, CFAC, FBF e controles).

A sonda DCFH-DA havia sido dissolvida antes em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de 10 mM. Após 72 horas do tratamento, as células foram lavadas com PBS 1X, o PBS foi retirado e foi colocada uma solução de DCFH-DA diluída em PBS1X com concentração de $10 \mu\text{M}$ por 1 hora.

Durante esse tempo, as placas ficaram na estufa envoltas com papel alumínio. Em seguida, a intensidade de fluorescência (excitação/emissão; 485/528 nm) foi medida utilizando um fluorímetro. Os valores foram calculados pela intensidade de fluorescência em relação ao controle positivo (somente com o meio de diferenciação).

3.7.2. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes: SOD, CAT e níveis de GSH

As células da linhagem 3T3-L1 foram cultivadas em garrafas médias (75 cm^2) e após atingirem confluência, foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e transferidas para garrafas pequenas (25 cm^2) em uma quantidade de 1×10^6 células/garrafas. As células foram tratadas por 72 horas com as frações, a quercetina e o etanol, os quais foram diluídos em meio adipogênico para se obter uma concentração de $10 \mu\text{g/mL}$. E as células que foram tratadas somente com o meio adipogênico e o com o meio base foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

Para verificar a atividade das enzimas antioxidantes, fez-se necessário lisar as células e obter o conteúdo protéico. Para isso, foi utilizado o kit de extração nuclear e citoplasmática NE-PER™ da Thermo Fischer Scientific.

As células foram tripsinizadas a 2500 rpm por 5 minutos das garrafas pequenas (25 cm^2), transferidas para microtubos, centrifugadas para permitir a remoção do meio e tripsina e, então, lavadas com PBS 1X. Houve outra centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados $500 \mu\text{L}$ de reagente de extração citoplasmática I (CER I) para romper a membrana celular e liberar o conteúdo citoplasmático e também $5 \mu\text{L}$ de inibidor de protease. Os microtubos foram vortexados e mantidos no gelo por 10 minutos. Foram adicionados 27,5

μL do reagente de extração citoplasmática II (CER II) gelado em cada tubo. Os microtubos, então, foram vortexados mais uma vez e mantidos no gelo por 1 minuto e depois foram passados mais uma vez no vórtex.

Os microtubos foram centrifugados a $16000\times g$ por 5 minutos, e após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para microtubos novos e gelados e mantidos a -80°C .

3.7.2.1. Atividade de catalase

A atividade de catalase foi medida através da degradação do H_2O_2 pela variação de absorbância a 240nm durante 10 minutos (AEBI, 1984). As amostras foram colocadas em microplacas e misturadas com tampão fosfato 10mM pH 7 e 0,2% H_2O_2 . Uma unidade (U) é a quantidade de enzima que utiliza 1 μmoL de substrato por minuto. A atividade da catalase foi expressa em U/mg de proteína de cada amostra.

3.7.2.2. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela inibição da autooxidação do pyrogallol pelas enzimas SOD presentes nas amostras de extrato celular. As amostras foram misturadas com 50mM do Tampão Tris-HCl (pH 8,2) contendo 1 mM EDTA (para desativar as enzimas metal-dependentes, como metaloproteases), 80 U/mL catalase e 24mM de pyrogallol. O ensaio cinético foi monitorado durante 10 min a 420nm, usando uma curva analítica construída com SOD como padrão (MARKLUND & MARKLUND, 1964).

3.7.2.3 Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

As proteínas do lisado celular foram precipitadas pelo ácido metafosfórico e as amostras foram centrifugadas a $7000\times g$ por 10 min. O sobrenadante foi misturado com tampão GSH, pH 8,0, que contém fosfato de sódio 100 mM, EDTA 5 mM e água para desativar enzimas dependentes de metal, tais como metaloproteases, e 1 mg/mL de orto-ftaldeído diluído em metanol. A fluorescência foi medida a 350 nm (excitação) e 420 nm (emissão) em fluorímetro. Uma curva analítica construída com GSH como padrão foi usada para determinar o conteúdo de GSH (BROWNE & ARMSTRONG, 1998).

3.8. Atividade antiadipogênica

Após 15 dias de tratamento das células, a atividade antiadipogênica foi mensurada com o uso do corante Oil Red O, que permite a quantificação dos níveis de triglicerídeos presentes nos adipócitos.

3.8.1. Ensaio de quantificação com o Oil Red O

Após os quinze dias de indução de diferenciação com ou sem os tratamentos, as células, que haviam sido plaqueadas em uma placa de 24 poços (3×10^4 céls/poço), foram coradas com o Oil Red O, um corante das gotículas lipídicas. As células foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído 4% e coradas com uma solução do corante Oil Red O 0,2% em isopropanol por 1 hora. O excesso do corante foi lavado com PBS 1X. As gotículas de gordura foram dissolvidas com isopropanol absoluto e quantificadas no espectrofotômetro a 510 nm. As absorbâncias dos poços que continham células tratadas apenas com o meio de diferenciação (controle positivo) foram consideradas como 100% de teor relativo de lipídios. Os resultados foram apresentados como conteúdo de lipídios relativo de cada grupo experimental em relação ao controle positivo.

3.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão. O teste de D'Agostino e Pearson foi utilizado para verificar a distribuição normal das amostras. Foi utilizado testes para detecção de "outliers" no caso de distribuição normal. Para detectar diferenças entre os grupos foi feita uma ANOVA One-way, seguida do pós-teste de Dunnett. Um nível de significância de 5% foi estabelecido. As análises foram realizadas através do programa GraphPadPrism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Capacidade de diferenciação dos adipócitos

As células 3T3-L1 cresceram de maneira muito satisfatória no meio DMEM baixa glicose, enriquecido com 10% de soro fetal bovino. E após atingirem confluência, o meio foi substituído por meio DMEM baixa glicose 10% de soro fetal bovino, acrescido com $1 \mu\text{M}$ de

dexametasona, 0.5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX) e 1 µg/mL de insulina, o qual demonstrou promover a diferenciação das células 3T3-L1 ou adipogênese, verificada através da coloração Vermelho Nilo/Hoechst. O azul corresponde ao núcleo das células e o verde fluorescente corresponde às gotículas lipídicas (Figura 2).

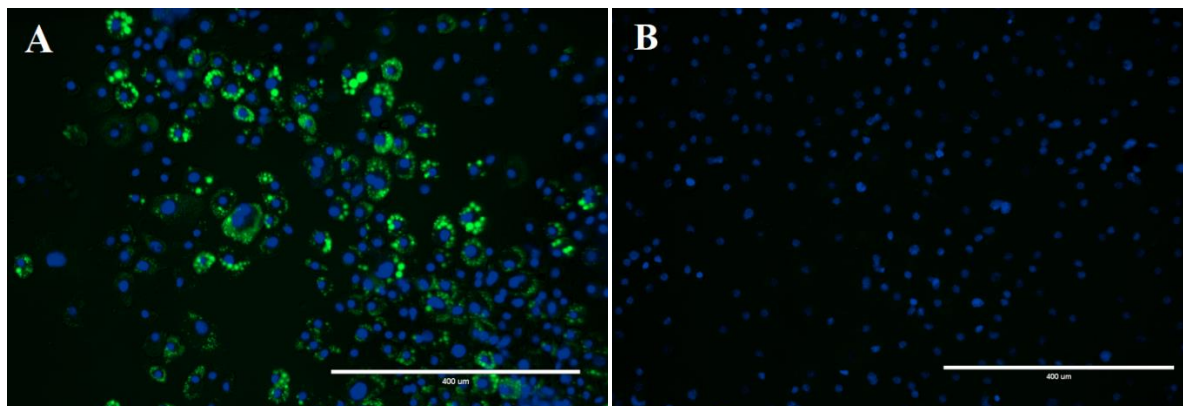


Figura 2. Capacidade de diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 referentes aos controles positivo: meio adipogênico (A) e negativo: meio base (B).

4.2. Viabilidade Celular

A Tabela 1 mostra os resultados referentes à viabilidade celular dos adipócitos 3T3-L1 tratados durante 7 dias com diferentes concentrações da fração n-butanol da CFAC, FBF, Q e etanol (veículo). Os tratamentos evidenciaram citotoxicidade considerável nas maiores concentrações: 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL, já que tiveram viabilidade celular menor que 80%. O veículo apresentou maior citotoxicidade nas concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL.

Tabela 1. Análise da viabilidade celular da linhagem 3T3-L1 tratadas com diferentes concentrações dos tratamentos

Concentração (µg/mL)	Viabilidade Celular (%)			
	Etanol	Quercetina	CFAC	FBF
1,5625	108,1 ± 4,0	98,2 ± 6,1	95,3 ± 8,9	101,5 ± 11,8
3,125	106,0 ± 2,4	92,2 ± 9,2	85,6 ± 6,8	94,8 ± 4,6
6,25	95,5 ± 4,3	82,8 ± 3,5	81,2 ± 5,1	83,9 ± 11,3
12,5	89,9 ± 2,14	71,9 ± 4,0	72,3 ± 6,5	59,6 ± 9,7
25	78,3 ± 4,5	52,4 ± 3,4	63,5 ± 5,5	16,2 ± 11,3
50	58,3 ± 7,9	35,4 ± 3,4	46,3 ± 8,1	16,6 ± 13,2
100	8,6 ± 4,0	3,3 ± 0,3	11,6 ± 1,2	3,8 ± 0,4

Valores expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (sem tratamento). Valores expressos como média \pm erro padrão. Nota: CFAC: fração n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora*; FBF: fração n-butanol das folhas de *B. forficata*.

Considerando que as concentrações abaixo de 12,5 μ g/mL não se mostraram ser citotóxicas, um ensaio de viabilidade celular (ensaio de MTT) foi feito adicionalmente para a concentração de 10 μ g/mL nas células 3T3-L1. Foram tratadas com Q, CFAC e FBF durante 72h. O etanol não foi incluso, pois no primeiro ensaio sua citotoxicidade foi somente nas primeiras concentrações. Os resultados revelaram que a concentração de 10 μ g/mL não demonstrou ser citotóxica e foi adotada para os próximos ensaios/experimentos (Figura 3).

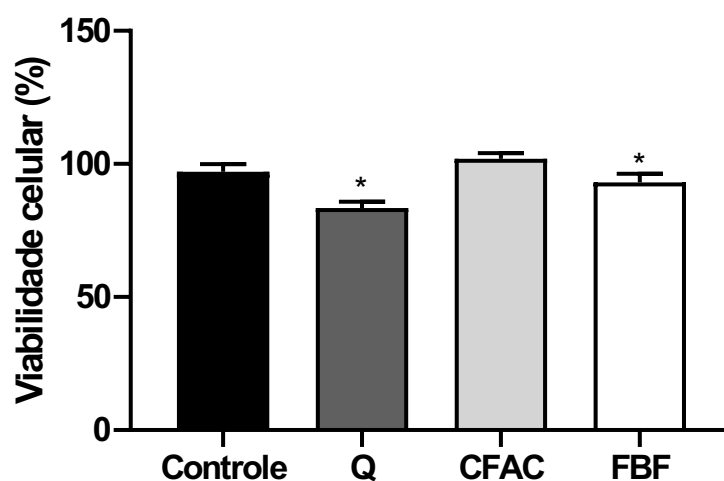


Figura 3. Análise da viabilidade celular da linhagem 3T3-L1 tratada por 72h com a concentração de 10 μ g/mL dos tratamentos (Q, CFAC e FBF). Valores expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (sem tratamento). Valores expressos como média \pm erro padrão. Nota: Q: Quercetina; CFAC: fração n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora*; FBF: fração n-butanol das folhas de *B. forficata*. *: apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

4.3. Avaliação da capacidade antioxidante dos tratamentos em meio adipogênico

Após três dias de tratamento, o meio com ou sem os tratamentos foi coletado das garrafas em que as células estavam. Os tratamentos (CFAC, FBF e Q, etanol) foram colocados no meio em uma concentração de 10 μ g/mL. O tempo foi definido considerando que o meio era trocado a cada 72 horas.

Pelo método de redução do ferro (FRAP), a Quercetina apresentou um aumento na capacidade antioxidante em meio adipogênico em relação ao controle. Por outro lado, as

capacidades antioxidantes das frações n-butanol tanto da casca do fruto de *Annona crassiflora* quanto das folhas de *Bauhinia forficata* se assemelharam ao controle (Figura 4).

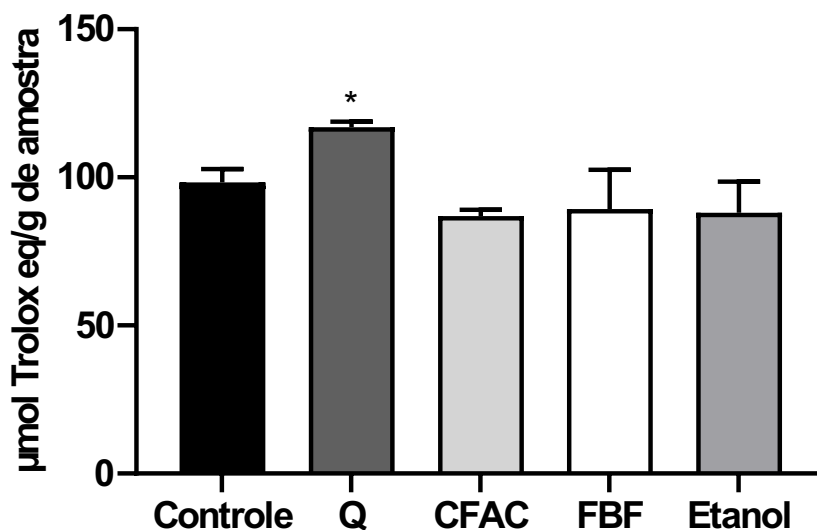


Figura 4. Análise da capacidade antioxidante das frações n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora* e das folhas de *B. forficata*, do meio adipogênico e da quercetina pelo método FRAP. Valores expressos em μmol de equivalentes de trolox por grama de amostra. Valores expressos como média \pm erro padrão. Nota: Controle: meio adipogênico; Q: Quercetina; CFAC: fração n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora*; FBF: fração n-butanol das folhas de *B. forficata*. *: apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

O controle utilizado corresponde ao meio adipogênico sem os tratamentos (CFAC, FBF, Q e etanol). O meio adipogênico ou meio de indução (MDI) utilizado é obtido a partir do meio comum (DMEM baixa glicose, 10% soro fetal bovino) com o acréscimo dos indutores de adipogênese (IBMX, dexametasona e insulina).

Pelo método ORAC, as amostras apresentaram uma tendência de aumento da capacidade antioxidante, os meios que continham a Quercetina e CFAC tiveram um aumento significativo da capacidade antioxidante por esse método (Figura 5).

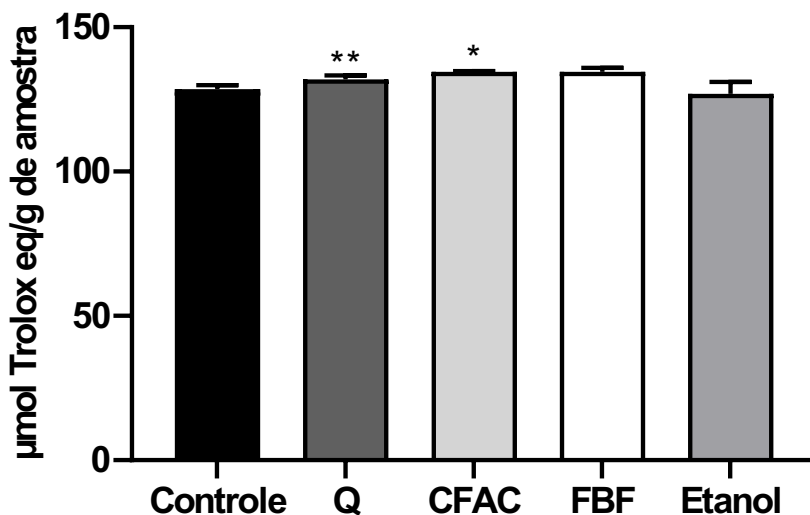


Figura 5. Análise da capacidade antioxidante das frações n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora* e das folhas de *B. forficata*, do meio adipogênico e da quercetina pelo método ORAC. Valores expressos em μmol de equivalentes de trolox por grama de amostra. Valores expressos como média \pm erro padrão. Nota: Controle: meio adipogênico; Q: Quercetina; CFAC: fração n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora*; FBF: fração n-butanol de *B. forficata*. *: apresentam diferença significativa ($p < 0,05$); **: apresentam diferença significativa ($p < 0,005$).

4.4. Avaliação do efeito das frações n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora* e das folhas de *B. forficata* nas espécies reativas de oxigênio

Os resultados encontrados revelaram que não houve redução significativa das espécies reativas de oxigênio intracelulares após 72 horas com os tratamentos referentes à CFAC e FBF comparados ao controle em uma concentração de $10 \mu\text{g/mL}$. Já o tratamento com quercetina reduziu significativamente as EROs intracelulares nessa mesma concentração (Figura 6).

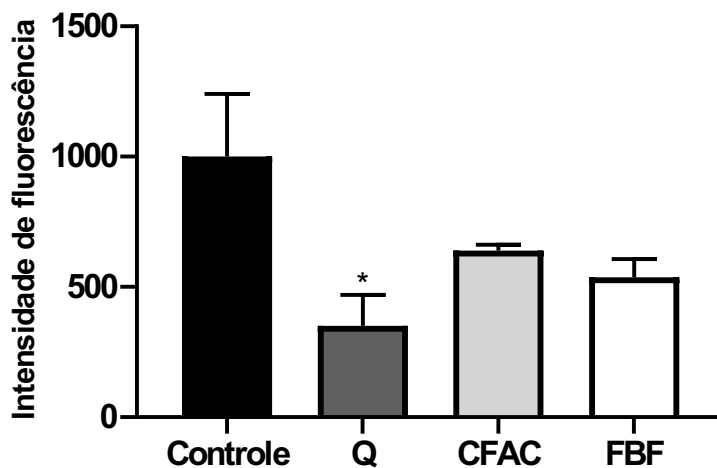


Figura 6. Avaliação da produção de EROs intracelulares utilizando a sonda DCFH-DA. Valores expressos em intensidade de fluorescência. Valores expressos como média \pm erro padrão. Nota: Controle: meio adipogênico; Q: Quercetina; CFAC: fração n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora*; FBF: fração n-butanol de *B. forficata*. *: apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

4.5. Avaliação do efeito das frações n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora* e das folhas de *B. forficata* na atividade de enzimas antioxidantes

4.5.1. Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase reduziu de maneira significativa em todos os tratamentos, mas aumentou de modo significativo na presença de etanol (Figura 7).

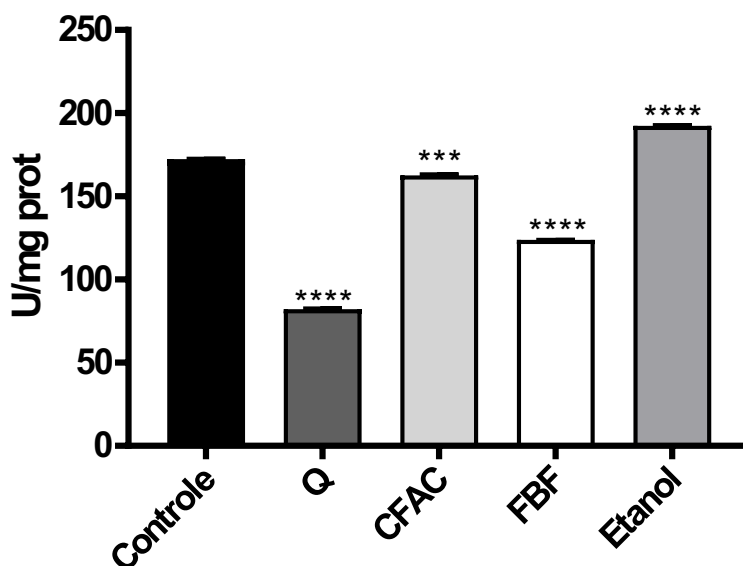


Figura 7. Determinação da atividade da catalase. Valores expressos em unidade/miligrama de proteína. Valores expressos como média \pm erro padrão. Nota: Controle: meio adipogênico; Q: Quercetina; CFAC: fração n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora*; FBF: fração n-butanol de *B. forficata*. ***: apresentam diferença significativa ($p < 0,001$); ****: apresentam diferença significativa ($p < 0,0001$).

4.5.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD aumentou de forma significativa nas células que tinham sido tratadas com a fração n-butanol da CFAC e etanol. Porém, os outros tratamentos não tiveram diferenças em relação ao controle.

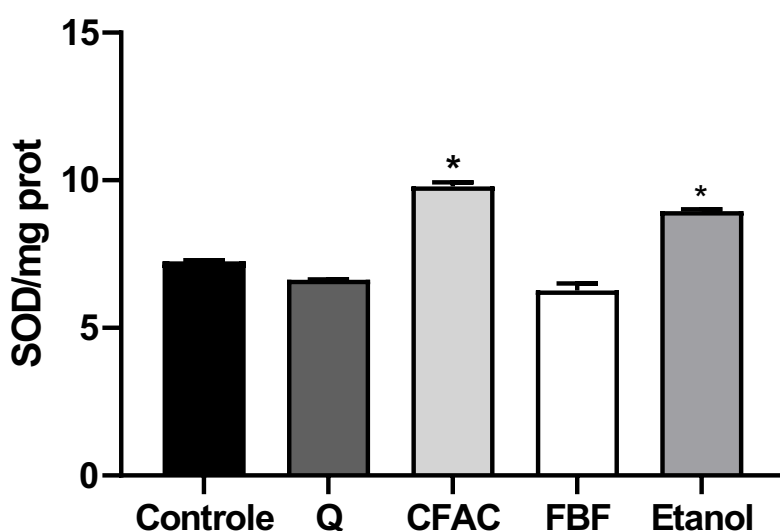


Figura 8. Determinação da atividade da superóxido dismutase. Valores expressos em SOD/miligrama de proteína. Valores expressos como média \pm erro padrão. Nota: Controle: meio adipogênico; Q: Quercetina; CFAC: fração n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora*; FBF: fração n-butanol de *B. forficata*. *: apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

4.5.3. Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

As células tratadas com Q e com as frações n-butanol de CFAC e FBF não apresentaram diferenças significativas em seus níveis de GSH em relação ao controle (Figura 9).

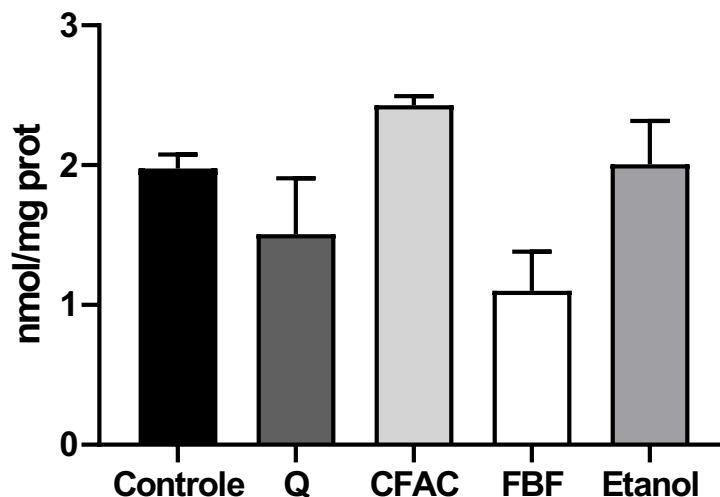


Figura 9. Determinação da atividade da GSH. Valores expressos em nanomol/miligrama de proteína. Valores expressos como média \pm erro padrão. Nota: Controle: meio adipogênico; Q: Quercetina; CFAC: fração n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora*; FBF: fração n-butanol de *B. forficata*. Não apresentam diferenças significativas ($P > 0,05$).

4.6. Efeito antiadipogênico dos CFAC, FBF e Q

4.6.1. Coloração Oil Red O

Para investigar o efeito antiadipogênico das frações, os pré-adipócitos 3T3-L1 foram induzidos a diferenciar com o meio de indução na presença ou ausência dos extratos, em uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ e as células foram coradas com uma solução de *Oil Red O* 0,2%. Os resultados mostraram que o acúmulo de lipídios intracelulares foi reduzido após o tratamento com a quercetina em comparação ao grupo não tratado. Em contrapartida, as frações n-butanol CFAC e FBF não demonstraram reduzir efetivamente o conteúdo de lipídios intracelulares, ou seja, não exerceram um efeito antiadipogênico significativo em comparação com o controle (Figura 10).

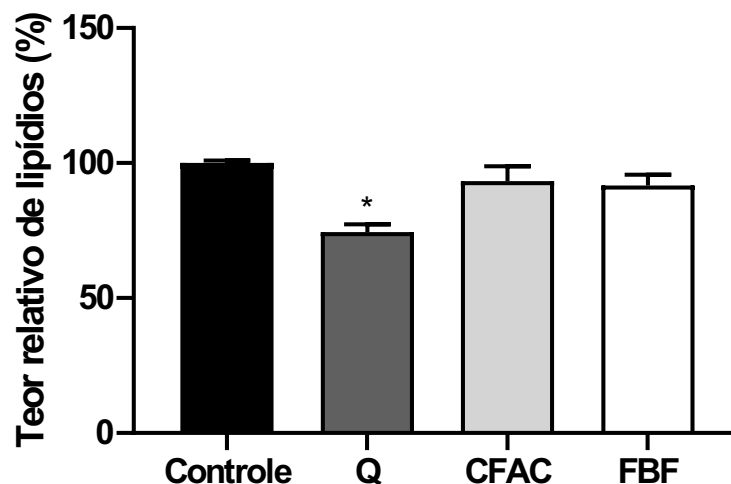


Figura 10. Análise da capacidade antiadipogênica das frações n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora* e das folhas de *B. forficata*, do meio adipogênico e da quercetina pela Coloração Oil Red O. Valores expressos em porcentagem, teor relativo de lipídios (%). Valores expressos como média \pm erro padrão. Nota: Controle: células tratadas com o meio adipogênico; Q: Quercetina; CFAC: fração n-butanol da casca do fruto de *A. crassiflora*; FBF: fração n-butanol das folhas de *B. forficata*. *: apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

As espécies reativas de oxigênio (EROs) têm um papel crucial na obesidade, devido a sua participação na regulação positiva dos fatores de transcrição adipogênicos, isso leva a um aumento na proliferação e diferenciação de pré-adipócitos (LEE et al., 2009). As EROs também levam a uma diminuição progressiva da expressão e atividade de enzimas antioxidantes (SAVINI et al., 2013).

Já se tem conhecimento que vários compostos presentes em plantas são conhecidos por serem antioxidantes naturais, podendo neutralizar ou inibir a formação de EROs (BARROS et al., 2009). A *Annona crassiflora* Mart, conhecida popularmente como “araticum”, é um membro da família Annonaceae encontrada no Cerrado brasileiro. (ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1987). A casca do fruto de *Annona crassiflora* é rica em antioxidantes, possui um sabor adstringente devido ao alto teor de compostos fenólicos (ROESLER et al., 2007).

Sabe-se que a partição n-butanol da casca do araticum possui uma tremenda atividade antioxidante, verificada por diversos métodos como ORAC, FRAP e DPPH, e isso pode ser atribuído à sua diversidade de biomoléculas como: ácido glucônico, ácido quínico, ácido málico, ácido cítrico, ácido clorogênico, cafeoil-glicosídeo, (epi)catequina,

procianidina B2 e feruloil-galactosídeo. A partição n-butanol é muito promissora no isolamento de compostos bioativos da classe dos flavonoides, e essas substâncias possuem diversas funções benéficas sobre a saúde humana (JUSTINO, 2016).

Sabe-se que o ácido clorogênico, o cafeoil-glicosídeo, a (epi)catequina, o feruloil-galactosídeo e as procianidinas B2 e C1 têm propriedades de eliminação de radicais livres (YAGI; OHISHI, 1979; COS et al., 2003; GU et al., 2006; WU, 2007; GAO et al., 2011).

Outra planta com diversidade de compostos é a *Bauhinia forficata* Link, e tem-se conhecimento que dentre as frações obtidas das folhas, a fração n-butanol é uma das que mais se destacam por apresentar uma boa capacidade antioxidante comprovada por diversos métodos como FRAP, ORAC e DPPH, devido a presença de determinadas moléculas, como ácido gálico, vários derivados da molécula de quercetina, epicatequina, luteolina-7-O-rutinosídeo, luteolinadi-O-glicosídeo, o kaempferol-3,7-dirhamnosídeo, entre outros (ALVES, 2018).

Neste trabalho, a fração n-butanol foi escolhida para testar nas células por possuir uma grande capacidade de concentrar fitoquímicos das plantas e o veículo usado foi escolhido porque tornava possível que a fração fosse dissolvida por completo (JUSTINO, 2016; ALVES, 2018).

Portanto, foi avaliada a capacidade antioxidante das frações n-butanol das folhas de *B. forficata* e das cascas do fruto de *A. crassiflora* no meio utilizado nas células, para verificar se no meio teriam capacidade de desempenhar uma ação antioxidante suficiente para promover efeitos significativos e em uma concentração que não fosse citotóxica.

Os resultados encontrados revelam que as frações foram citotóxicas nas maiores concentrações utilizadas. Como forma de contornar a toxicidade causada pelo veículo, seria interessante testar outros reagentes que mantenham as células viáveis, e assim, possibilitem a utilização de concentrações maiores das frações para analisar melhor os efeitos delas nas células.

Ao que diz respeito à capacidade antioxidante das frações utilizadas, os resultados mostraram que as frações n-butanol das folhas de pata-de-vaca e das cascas do araticum em meio adipogênico não demonstraram capacidade antioxidante significativa pelos métodos FRAP e ORAC na concentração e tempo de tratamento utilizados.

Quanto à análise das EROs intracelulares, a molécula DCFH-DA foi utilizada. A molécula é permeável às células e, após entrar, é clivada pelas esterases intracelulares para uma forma ainda não fluorescente chamada de 2',7'-dichlorodihydrofluoresceína (DCFH), a qual é oxidada em uma molécula fluorescente denominada 2',7'-dichlorofluoresceína (DCF)

por diversas espécies reativas de oxigênio (HEMPEL et al, 1999). Os resultados obtidos pela utilização da DCFH-DA revelaram que não houve redução significativa das EROs intracelulares após 72 horas com os tratamentos referentes à CFAC e FBF comparados ao controle em uma concentração de 10 µg/mL. Seria pertinente que em estudos futuros que houvesse um aumento no tempo de tratamento para que as frações e a quercetina pudessem ter uma atuação mais prolongada e até mesmo possibilitar um efeito diferente nas células.

Nesses mesmos métodos (ORAC, FRAP e ensaio com DCFH-DA), somente o meio adipogênico em conjunto com a quercetina desempenhou uma ação antioxidante significativa utilizando o controle (somente meio adipogênico) como comparativo. O fato de a quercetina ter tido maior efeito em reduzir a produção ou quantidade de EROs pode ser ligado ao fato de ela ser um flavonoide com efeitos de eliminação de radicais livres (METODIEWA et al., 1999). Também tem capacidade de aumentar o potencial antioxidante celular pela via Nrf2, aumentando assim a atividade das enzimas antioxidantes (LI et al, 2016). O padrão de ativação de fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) é a translocação do citoplasma para o núcleo. A principal função do Nrf2 é ativar a resposta antioxidante e induzir a transcrição de uma ampla gama de genes capazes de neutralizar os efeitos nocivos do estresse oxidativo, restaurando assim a homeostase intracelular (YAN et al, 2007).

Até então, somente com o ensaio de DCFH-DA, a capacidade antioxidante dos tratamentos utilizados no estudo pode ser atribuída aos compostos presentes nas frações que possivelmente estão promovendo um aumento de atividade ou expressão de enzimas antioxidantes (LU et al., 2010).

A enzima antioxidante superóxido dismutase converte cataliticamente o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) gerado através do metabolismo ou reações nas células em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (IGHODARO & AKINLOYE, 2017). De acordo com os resultados obtidos, somente a fração n-butanol correspondente às cascas do araticum promoveu um aumento significativo na atividade dessa enzima.

Com a atuação da SOD, o H_2O_2 é formado e se acumulado é tóxico para tecidos ou células. A fim de evitar esse acúmulo, a catalase (outra enzima antioxidante), abundante nos peroxissomas, decompõe o H_2O_2 em água e oxigênio molecular, reduzindo, conseqüentemente, os danos induzidos pelas EROs (IGHODARO & AKINLOYE, 2017). Porém, os resultados encontrados mostraram que a atividade da enzima catalase reduziu em todos os tratamentos em relação ao controle.

A catalase está ausente nas mitocôndrias, então o H_2O_2 é usado como substrato pela glutathiona peroxidase para oxidar a glutathiona reduzida (GSH), formando GSSG e água. A

diminuição de GSH é considerada um marcador de estresse oxidativo, já que ela é utilizada na decomposição do H_2O_2 (DÍAZ-FLORES et al, 2012). Porém, quando as células foram tratadas durante 72 horas com as frações das plantas e com a quercetina não houve alterações significativas de GSH em relação ao controle.

Como não houve um aumento significativo da atividade da SOD, CAT e GSH de forma geral, então o efeito de redução das EROs não pôde ser justificado pela ação das enzimas antioxidantes.

Provavelmente, as regulações negativas das enzimas antioxidantes podem ser devido a um desequilíbrio redox gerado por moléculas antioxidantes presentes nas frações n-butanol de CFAC e FCF e pela Q, onde as enzimas tiveram sua expressão, e conseqüentemente, suas atividades alteradas. Pois, apesar das espécies reativas de oxigênio serem vistas como algo prejudicial, elas têm extrema importância para a célula, já que promovem uma homeostase redox que se baseia na indução de cascatas de sinais redox-sensíveis, as quais podem levar a um aumento da expressão de enzimas antioxidantes (DRÖGE, 2002).

Então, o potencial antioxidante dos tratamentos nas células se dá por meio de um mecanismo que não envolve a SOD, a CAT e a GSH. Provavelmente se dá por meio de outras enzimas antioxidantes ou pelas moléculas presentes nos tratamentos. A quercetina e muitas das moléculas encontradas nas frações n-butanol são flavonoides que podem doar hidrogênio ou elétrons para formar radicais intermediários estáveis. Também inibem as enzimas envolvidas na geração de EROs e o dano oxidativo (FERGUSON, 2001; KUMAR & PANDEY, 2013).

Como foi dito anteriormente, as EROs tem participação na regulação positiva dos fatores de transcrição adipogênicos, isso leva a um aumento na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros (adipogênese), além de aumentar a proliferação das células (LEE et al, 2009). Possivelmente, o fato de a quercetina ter promovido uma redução das EROs intracelulares, permitiu que houvesse uma diminuição dos fatores de transcrição adipogênicos e proteínas adipogênicas, no geral, como: $PPAR\gamma$, $C/EBP\alpha$, $C/EBP\beta$, $C/EBP\delta$, $SREBP1c$, entre outros. É preciso que mais estudos sejam realizados para verificar a expressão gênica e protéica desses fatores, assim, haverá comprovação de que realmente esse seja o mecanismo responsável pelo efeito antiadipogênico.

De modo geral, a quercetina, que é um flavonoide isolado, apresentou ter efeitos maiores e mais significativos em relação às frações CFAC e FBF diante das condições avaliadas. Entretanto, vale ressaltar que uma planta pode conter centenas de metabólitos secundários, os quais podem gerar algum efeito em conjunto ou não, e nem todos os

compostos presentes são isolados e estudados para verificar tal efeito. A análise de substâncias ativas pode ser muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção nas plantas são os que apresentam melhores efeitos biológicos (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Portanto, foi necessário que as análises dos efeitos das frações fossem feitas previamente, para somente depois, verificar o efeito das substâncias puras. Desse modo, será possível prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir que as frações n-butanol das cascas do araticum e das folhas de pata-de-vaca nas condições (tempo e concentração) que foram administradas, de um modo geral, não desempenharam efeitos significativos na capacidade antioxidante, na redução de EROs e, conseqüentemente, na adipogênese.

Por outro lado, o tratamento com quercetina foi muito promissor para um possível tratamento antiobesidade por possuir uma significativa capacidade antioxidante capaz de reduzir as EROs e levar à redução de lipídios intracelulares, ou seja, reduzir a adipogênese.

REFERÊNCIAS

Ahima RS, Flier JS. **Adipose tissue as an endocrine organ.** Trends EndocrinolMetab 2000;11:327-32.

Albu J, Allison D, Boozer CN, Heymsfield S, Kissileff H, Kretser A, Krumhar K, Leibel R, Nonas C, Pi-Sunyer X. **Obesity solutions: Report of a meeting.** Nutr Rev 55: 150-156, 1997.

ALIAGA, M.J.M.; MATSUMURA, F. **Effects of 1,1,1-trichloro-2, -bis-(p-chlorophenyl)-ethane (p,p' - DDT) on 3T3-L1 and 3T3-F422A Adipocyte Differentiation.** BiochemicalPharmacology, v. 63, p.997-1007, 2002.

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, barú, cagaita e jatobá.** 1a ed. Embrapa-CPAC, Planaltina: 1987.

ALVES, Victor Hugo Mota. **Avaliação dos compostos bioativos e da citotoxicidade das folhas de Bauhinia forficata e de seu potencial antioxidante, antiglicante e como inibidora de enzimas relacionadas com a hiperglicemia e hiperlipidemia pós-prandial.** 2018. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). **In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine.** Industrial Crops and Products, 32(3), 572–579.

BENZIE, I. F. F.; STRAINS, J.J. **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay.** Analytical Biochemistry, v. 239, p.70-76, 1996.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. **Reduced glutathione and glutathione disulfide,** Methods in Molecular Biology, vol. 108, pp. 347–352, 1998.

BUEGE, J. A.; AUST. S. D. **Microsomal lipid peroxidation**: Methods Enzymol, v. 52, p. 302-10, 1978.

Caro JF, Dohm LG, Pories WJ and Sinha, MK. **Cellular alterations in liver, skeletal muscle, and adipose tissue responsible for insulin resistance in obesity and type II diabetes**. Diabetes MetabRev 5: 665-689, 1989.

Cechinel Filho, V., & Yunes, R. A. (1998). **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade**. Química Nova, 21(1), 99–105.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural products: secondary metabolites**. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists: 2000. 1250-1318.

Díaz-Flores, M., Angeles-Mejia, S., Baiza-Gutman, L. A., Medina-Navarro, R., Hernández-Saavedra, D., Ortega-Camarillo, C., ...Alarcon-Aguilar, F. J. (2012). **Effect of an aqueous extract of Cucurbita ficifolia Bouché on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes**. Journal of Ethnopharmacology, 144(1), 101–108.

DIAZ, G. et al. **Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio**. Micron, v. 39, n. 7, p. 819-824, 2008.

Droge, Wulf. **Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function**. Physiol Rev 82: 47–95, 2002

FARMER, S. R. **Transcriptional control of adipocyte formation**. Cell Metab. 2006; 4(4):263-73.

FERGUSON, L. R. **Role of plant polyphenols in genomic stability**. Mutat Res, v. 475, n. 1-2, p. 89-111, 2001.

FÈVE, B. **Adipogenesis: cellular and molecular aspects**. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, v.19, n.4, p. 483-499, 2005.

FONSECA-ALANIZ et al. **Tecido Adiposo e Regulação Metabólica**. Arq Bras Endocrinol Metab, vol 50, nº 2, 2006.

FIELDS, R.; DIXON, H.B. **Micro method for determination of reactive carbonyl groups in proteins and peptides, using 2,4-dinitrophenylhydrazine**. Biochem J. 1971 Feb;121(4):587-589.

GARROW, J. S. **Obesity and related diseases**. London: Churchill Livingstone; 1988. pp. 1-16.

GOUVEIA, S.; CASTILHO, P. C. **Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of Helichrysumobconicum by a RPHPLC-DAD-(-)-ESI-MSn method**. Food Chemistry, v. 129, n. 2, p. 333-344, 2011.

GREGOIRE, F.M.; SMAS, C.M.; SUL, H.S. **Understanding adipocyte differentiation**. Physiol. Rev. 78: 783-809, 1998.

Hempel, S. L., Buettner, G. R., O'Malley, Y. Q., Wessels, D. A., & Flaherty, D. M. (1999). **Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123**. Free Radical Biology and Medicine, 27(1-2), 146-159.

Hossain, P; Kavar, B; El Nahas, M. **Obesity and diabetes in the developing world - a growing challenge**. N Engl J Med 356: 213-215, 2007.

Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM. **Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR γ and C/EBP α** . Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:9856-60.

Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2017). **First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defense grid.** Alexandria Journal of Medicine.

Jung RT. **Obesity as a disease.** Br Med Bull 1997;53: 307–321.

JUSTINO, Allisson Benatti. **Casca do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) como fonte de compostos antioxidantes com atividade de inibição de α -amilase, α -glicosidase e glicação não enzimática.** 2016. 89 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

Justino, A. B.; Pereira, M. N.; Peixoto, L. G.; Vilela, D. D.; Caixeta, D. C.; de Souza, A. V.; Espindola, F. S. **Hepatoprotective Propertie sof a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* Mart. Fruit Peel against Diabetes-Induced Oxidative and Nitrosative Stress.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(22), 4428–4438, 2017.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. **Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview.** ScientificWorldJournal, v. 2013, p. 162750, 2013.

LEE, H. et al. **Reactive Oxygen Species Facilitate Adipocyte Differentiation by Accelerating Mitotic Clonal Expansion.** Journal of Biological Chemistry. v. 284, nº 16, p. 10601–10609, 2009.

LEITE, L. D. et al. **Obesidade: uma doença inflamatória.** Revista Ciência & Saúde, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 85-95, jul./dez. 2009

Leloup, C., Turrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., ... Penicaud, L. (2008). **Mitochondrial Reactive Oxygen Species Are Obligatory Signals for Glucose-Induced Insulin Secretion.** Diabetes, 58(3), 673–681.

LEVINE, R.L. et al. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.** Methods Enzymol. 1990;186:464-478.

Li X, Wang H, Gao Y, Li L, Tang C, Wen G, et al. (2016) **Protective Effects of Quercetin on Mitochondrial Biogenesis in Experimental Traumatic Brain Injury via the Nrf2 Signaling Pathway.** PLoS ONE 11(10): e0164237.

LU, J. M. et al. **Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems.** J Cell Mol Med, v. 14, n. 4, p. 840- 860, 2010.

Marklund, S.; Marklund, G. **Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase.** Eur. J. Biochem.1974,47, 469–474.

Menezes FS, Minto ABM, Ruela HS, Kuster RM, Sheridan H, Frankish H. **Hypoglycemic activity of two Brazilian Bauhinia species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz.** Braz J Pharmacogn. 2007;17:8-13.

Mishra KP, Ganju L, Sairam M, Banerjee PK, Sawhney RC. **A review of high throughput technology for the screening of natural products.** Biomed Pharmacother. 62(2): 94-8, 2008.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J ImmunolMethods, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NASCIMENTO, Daniele de Souza Marinho do. **Extratos da planta *Baccharis trimera* (Less.) DC, carqueja, possui atividades antioxidante e antiadipogênica por inibir a expressão de proteínas envolvidas na diferenciação adipocitária *in vitro*.** 2017. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

Oh, T.Y., Lee, J.S., Ahn, B.O., Cho, H., Kim, W.B., Surch, Y.J., Cho, S.W., Hahm, K.B., 2001. **Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis implication of antioxidants in its treatment.** Free Radical Biology and Medicine 30, 905–915.

Organização Mundial da Saúde. **Obesidade e excesso de peso.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 10 agosto 2017.

Osborne TF. **Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPS): key regulations of nutritional homeostasis and insulin action.** J Biol Chem 2000;275:32379-82.

Pepato, M. T.; Keller, E. H.; Baviera, A. M.; Kettelhut, I. C.; Vendramini, R. C.; Brunetti, I. L. **Anti-diabetic activity of Bauhinia forficata decoction in streptozotocin-diabetic rats.** Journal of Ethnopharmacology, 81(2), 191–197, 2002.

Pereira, M. N.; Justino, A. B.; Martins, M. M.; Peixoto, L. G.; Vilela, D. D.; Santos, P. S.; Espindola, F. S. **Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of Annona crassiflora Mart.** Industrial Crops and Products, 97, 324–329, 2017.

Pi-Sunyer FX. **Health implications of obesity.** Am J Clin Nutr 1991;53:1595S–1603S.

QUEIROZ, J. C. F. et al. **Controle da adipogênese por ácidos graxos.** Arq Bras Endocrinol Metab [online]. 2009, vol.53, n.5, pp.582-594.

PRIOR, R. L. et al. **Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples.** J Agric Food Chem, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.

ROESLER, R. et al. **Antioxidant activity of Annona crassiflora: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry.** Food Chem, v. 104, p. 1048-1054, 2007.

SAEEDI, A. H. A; HOSSAIN, M. A. **Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds crude extracts of pigeon pea traditionally used in**

Oman for the treatment of several chronic diseases. AsianPac J Trop., v.5, n.4, p. 316-321, 2015.

Savini, I., Catani, M., Evangelista, D., Gasperi, V., Avigliano, L. (2013). **Obesity-Associated Oxidative Stress: Strategies Finalized to Improve Redox State.** International Journal of Molecular Sciences, 14(5), 10497–10538.

Stocker, R., &Keaney, J. F. (2004). **Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis.** Physiological Reviews, 84(4), 1381–1478.

TAPIA, A et al. **Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*.** Journal of ethnopharmacology, v. 95, p. 155-161, 2004.

TELES, S. et al. **Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* H.B.K.** Industrial Crops and Products, v. 59, p. 169-176, 2014.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. **Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma.** Curr Opin Genet Dev 1995;5:571-6.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. **Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma2, a lipid-activated transcription factor.** Cell 1994b;79:1147-56.

Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM. **ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation.** Mol Cell Biol 1993;13:4753-9.

Trayhurn P, Wood IS. **Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue.** Br J Nutr 2004; 92 (3): 347-355.

Vincent, H. K., Innes, K. E., & Vincent, K. R. (2007). **Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity.** Diabetes, Obesity and Metabolism, 9(6), 813–839.

Yan W, Wang HD, Hu ZG, Wang QF, Yin HX (2008) **Activation of Nrf2-ARE pathway in brain after traumatic brain injury.** *NeurosciLett* 431: 150–154.