

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

VINÍCIUS MARQUES ARRUDA

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Hancornia speciosa* Gomes NA
ESTEATOSE HEPÁTICA, UMA AVALIAÇÃO *IN VITRO***

**PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2020**

VINÍCIUS MARQUES ARRUDA

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Hancornia speciosa* Gomes NA
ESTEATOSE HEPÁTICA, UMA AVALIAÇÃO *IN VITRO***

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Profa. Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra

PATOS DE MINAS – MG

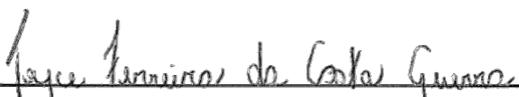
DEZEMBRO DE 2020

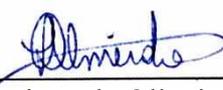
VINÍCIUS MARQUES ARRUDA

**Efeito do extrato aquoso das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes na esteatose hepática,
uma avaliação *in vitro***

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia

Banca Examinadora:


Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra – IBTEC – UFU
Presidente


Dra. Luciana de Oliveira Almeida – IBTEC - UFU
Membro


Dra. Larissa de Freitas Bonomo – Departamento de Farmácia – UFJF – GV
Membro

Patos de Minas – MG, 15 de dezembro de 2020

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão não poderia ser outra se não dedicada aos professores. Professores que o são por ofício ou por consequência da luz trazida a mim em todos os aspectos da vida. É a eles que agradeço.

Aos professores das escolas onde estudei, em especial aos do Colégio Nossa Senhora da Graças, e ainda mais especialmente, à profa. Elis Regina e aos prof. Lucas e Carlos.

Aos professores, técnicos e servidores da Universidade Federal de Uberlândia, principalmente aos técnicos Lucas e Luciana, por todo o auxílio e pelas lições que ultrapassam as paredes da graduação.

Aos colegas de laboratório, em especial do Laboratório de Bioquímica e Processos Redox e do Laboratório de Cultura de Células Animais, por compartilharem conhecimentos, descobertas e frustrações da vida acadêmica e científica.

Aos meus colegas de faculdade, especialmente Brena e Bruno, sem os quais toda a graduação não seria possível, pelo suporte, companheirismo, divertimento e compartilhamento de conhecimentos e de esforços.

Aos meus amigos, em especial Rafael, Ana Beatriz, Jordana e Clarisse, que também me ensinam como sonhar, me divertir e viver.

À minha família, sobretudo meus irmãos Letícia, Daniel e César Rafael, que além de todo o apoio, me ensinam lições de companheirismo, confiança, identidade e paciência.

Às Dras. Luciana de Oliveira Almeida e Larissa de Freitas Bonomo por terem aceitado participar da banca de defesa deste trabalho.

Às agências de fomento CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro fornecido para o desenvolvimento do projeto.

À minha professora orientadora Joyce Guerra por tantos ensinamentos, de profissionalismo, dedicação e amor ao trabalho (e à Bioquímica). Em especial pela confiança depositada em mim, mesmo quando me faltava a minha própria. Pela perseverança e apaziguamento quando a desistência parecia ser o melhor caminho. A maior parte do meu amadurecimento neste momento é mérito da incrível pessoa que você é.

Finalmente, e mais fundamentalmente, aos melhores professores que poderia ter nesta vida: meus pais, que me ensinam a ser quem eu sou e a ser melhor. Obrigado pelas lições de amor e por todo o apoio incondicional.

RESUMO

A esteatose hepática é caracterizada pelo acúmulo de triacilgliceróis nos hepatócitos e é o mais proeminente estágio da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD), cuja progressão está estritamente relacionada ao estresse oxidativo. Compostos bioativos encontrados em plantas nativas do Cerrado brasileiro representam uma vasta fonte de recursos terapêuticos úteis para o tratamento da doença. Portanto, este trabalho objetivou avaliar o efeito do extrato aquoso das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (EAM) sobre um modelo *in vitro* de esteatose hepática. O extrato foi obtido por infusão das folhas em banho-maria a 72°C por 10min e sua capacidade antioxidante determinada pelo método ORAC foi de 260,04±65,76µM equivalentes de Trolox/g. O efeito do extrato sobre a viabilidade de células HepG2 foi avaliado pelo método MTT em 12, 24 e 48h, e somente a concentração de 1000µg/mL em 48h foi capaz de reduzi-la abaixo de 70%. A esteatose em células HepG2 foi induzida pela incubação com os ácidos oleico:palmítico (2:1) a 1mM e avaliada qualitativamente ao microscópio após coincubação com 50 e 100µg/mL do EAM por 24h e posterior coloração com *Oil Red*. Não foram observadas diferenças na presença de gotículas lipídicas em ambos os tratamentos com extrato. O dano hepatocelular foi determinado pelos níveis de aminotransferases no sobrenadante da cultura com reduções significativas de alanina aminotransferase(ALT), promovidas pela incubação com extrato a 50 e 100µg/mL nas células com esteatose. Apesar de não ter alterado o conteúdo lipídico intracelular, a alta capacidade antioxidante e o efeito redutor dos níveis de ALT suportam a necessidade de novos estudos para validação do potencial terapêutico das folhas da mangabeira na MAFLD.

Palavras-chave: MAFLD. Mangaba. Capacidade antioxidante. Ácidos graxos. Células HepG2.

ABSTRACT

*Hepatic steatosis is characterized by the accumulation of triacylglycerols in hepatocytes and is the most prominent stage of metabolic associated fatty liver disease (MAFLD), whose progression is strictly related to oxidative stress. Bioactive compounds found in native plants from the Brazilian Cerrado represent a vast source of therapeutic resources useful for the treatment of the disease. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of the aqueous extract of the leaves of *Hancornia speciosa* Gomes (EAM) on an in vitro model of hepatic steatosis. The extract was obtained by infusion of the dried leaves in water bath at 72°C for 10 minutes and its antioxidant capacity determined by the ORAC method was 260.04±65.76 µM equivalent of Trolox/g. The effect of the extract on the of HepG2 cells viability was evaluated by the MTT method at 12, 24 and 48h, and only the concentration of 1000 µg/mL at 48h was able to reduce it below 70%. Steatosis in HepG2 cells was induced by incubation with oleic: palmitic acids (2:1) at 1mM and qualitatively evaluated under microscope after coincubation with 50 and 100 µg/mL of EAM for 24h and subsequent Oil Red staining. No differences were observed in the presence of lipid droplets in both treatments with the extract. Hepatocellular damage was determined by the levels of aminotransferases in the culture supernatant with relevant reductions in alanine aminotransferase (ALT), promoted by incubation with the extract at 50 and 100 µg/mL in cells with steatosis. Although it has not altered the intracellular lipid content, a high antioxidant capacity and the reducing effect of ALT levels support the need for further studies to validate the therapeutic potential of mangabeira leaves in MAFLD.*

Keywords: MAFLD. Mangaba. Antioxidant capacity. Fatty acids. HepG2 cells.

Effect of the aqueous extract of *Hancornia speciosa* Gomes leaves on liver steatosis, an in vitro evaluation



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: Micrograma(s)
µL: Microlitro(s)
µM: Micromolar
AAPH: Dicloreto de 2,2''-azobis (2-amidinopropano)
Abs: Absorbância
AG: Ácidos graxos
AGL: Ácidos graxos livres
ALT: Alanina aminotransferase
ApoB: Apolipoproteína B
AST: Aspartato aminotransferase
AUC: Área sob a curva
BHT: Hidroxitolueno butilado
BSA: Albumina sérica bovina
ChREBP: Proteína de ligação do elemento resposta de carboidrato
CO₂: Gás carbônico
DMEM: do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAM: Extrato aquoso das folhas de mangabeira
ERO: Espécies reativas de oxigênio
ET: Equivalentes de Trolox
g: Grama(s)
h: Hora(s)
IC₅₀: 50% da concentração inibitória máxima
IL-6: Interleucina 6
L: Litro
M: Molar
MAFLD: Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo
MG: Minas Gerais
min: Minuto(s)
mL: Mililitro(s)
mM: Milimolar
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-YL)-2,5-difeniltetrazólio
NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NAFLD: Doença hepática gordurosa não alcoólica
NASH: Esteato-hepatite não alcoólica
NF-κB: Fator de transcrição nuclear kappa B
nm: Nanômetro(s)
ORAC: do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*
ORO: *Oil Red O*
PBS: Tampão fosfato salino
PPAR- α: Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos alfa
RI: Resistência à insulina
SREBP-1c: Fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol
SFB: Soro Fetal Bovino
TAG: Triacilgliceróis
TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa
Trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico

U: Unidade(s)

VLDL: Lipoproteínas de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo.....	12
1.1.1 Estresse oxidativo.....	17
1.1.2 Modelos de estudo da MAFLD.....	21
1.2 Cerrado.....	23
1.3 Mangaba (<i>Hancornia speciosa</i> Gomes).....	25
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Obtenção das amostras e preparo dos extratos.....	28
3.2 Determinação da capacidade antioxidante.....	29
3.3 Cultura de células da linhagem HepG2.....	29
3.4 Determinação da viabilidade celular.....	30
3.5 Indução da esteatose hepática.....	30
3.6 Determinação da atividade de aminotransferases.....	31
3.7 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Determinação da capacidade antioxidante.....	33
4.2 Determinação da viabilidade celular.....	35
4.3 Indução da esteatose hepática.....	37
4.4 Determinação da atividade de aminotransferases.....	39
5 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A esteatose hepática faz parte de um amplo espectro de condições decorrentes de um distúrbio metabólico multissistêmico, conhecido como doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD), que abrange também a esteato-hepatite, fibrose e cirrose. A esteatose é o estágio mais brando da doença e pode ser induzida em modelos hepáticos *in vitro* através da captação de ácidos graxos livres. Atualmente, a MAFLD é a mais comum das doenças crônicas do fígado, atingindo mais de um quarto da população adulta mundial e, no entanto, ainda não possui tratamento farmacológico aprovado. Além disso, está ainda associada à síndrome metabólica e seus componentes individuais: diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, obesidade e hipertensão arterial (MIKOLASEVIC et al., 2016).

Bioquimicamente, a MAFLD é a decorrência de um desequilíbrio entre a obtenção de ácidos graxos, pela captação e síntese *de novo*, e mecanismos de remoção através da oxidação e secreção em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (FERRAMOSCA; DI GIACOMO; ZARA, 2017). Quando o influxo lipídico e a lipogênese excedem o metabolismo e exportação, o excesso de lipídios se acumula no citoplasma de células hepáticas em gotículas lipídicas (ALBHAISI; SANYAL, 2018). Diversas linhas de evidência indicam a estrita associação da resistência à insulina (RI) ao acúmulo de lipídios nos hepatócitos. Na RI, o hormônio falha em suprimir a lipólise no tecido adiposo, aumentando o efluxo de ácidos graxos e a consequente captação pelo fígado. Além disso, a hiperinsulinemia e a hiperglicemia decorrentes da RI promovem nos hepatócitos a lipogênese *de novo* através da regulação positiva de fatores de transcrição e o acúmulo de triacilgliceróis pela redução na expressão da apolipoproteína B (ApoB), constituinte das VLDL exportadas pelo fígado (VAZQUEZ et al., 2008; ANGULO, 2002). Assim, quando estabelecida a esteatose, diversos fatores subjacentes, especialmente o estresse oxidativo, são responsáveis pela progressão da doença.

O estresse oxidativo é um dos mediadores predominantes do dano hepático e tem papel central na progressão da MAFLD (SUMIDA et al., 2013). O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a formação excessiva de espécies reativas e a eficiência dos mecanismos antioxidantes (HALLIWELL, 2007), levando à ocorrência de efeitos deletérios que afetam a estrutura e função de biomoléculas e consequentemente a homeostase celular. Com a sobrecarga de lipídios, as vias de oxidação são estimuladas e ocorre um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais levam à

peroxidação lipídica, que por sua vez, acarreta no processo inflamatório pela ativação de citocinas e na fibrogênese pela ativação de células estreladas do fígado (LEONARDUZZI et al., 1997; ANGULO et al., 2015). Além disso, a disfunção mitocondrial e deficiências em enzimas da β -oxidação peroxissomal são comuns em pacientes com MAFLD e são consideradas fatores importantes na evolução da esteatose hepática para esteato-hepatite, fibrose e cirrose (FAN et al., 1998).

Dada sua relevância no espectro da MAFLD, o estresse oxidativo constitui um alvo em potencial para o tratamento da doença. Diversos estudos demonstram a capacidade de algumas classes de antioxidantes na regulação de mecanismos envolvidos na progressão da MAFLD e, portanto, dietas ricas nestes compostos têm sido propostas como agentes terapêuticos para a esteatose hepática (CAI et al., 2010; HSU, YEN, 2007). Moléculas antioxidantes são parte essencial do metabolismo secundário de plantas e por isso diversas frutas e vegetais têm sido utilizadas como alimentos funcionais na prevenção de doenças crônicas.

Nesse contexto, o Cerrado brasileiro representa uma vasta fonte de recursos naturais úteis à saúde humana, incluindo uma imensidade de plantas conhecidas por suas propriedades terapêuticas. Apontado como um *hotspot* global de biodiversidade, o Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul e abriga mais de 11 mil espécies vegetais nativas (BRASIL, 2018). Muitas dessas plantas são vastamente aplicadas pela cultura popular e medicina tradicional no tratamento e prevenção de diversas desordens, como inflamação, doenças gastrointestinais, neurodegenerativas, metabólicas e câncer. Entretanto, a composição química e as propriedades bioquímicas que lhes conferem tais propriedades não são totalmente elucidadas e necessitam de maiores investigações.

Em meio a essa diversidade de plantas medicinais, é possível destacar a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), árvore frutífera pertencente à família *Apocynaceae* e que se distribui por quase todo o país, abrangendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Algumas de suas partes são frequentemente aplicadas na medicina popular, como as folhas, que possuem propriedades anti-hiperlipidêmicas e antidiabéticas e cujo chá é muito difundido para tratamento de inflamações (PEREIRA, 2012).

1.1 Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo

A MAFLD, anteriormente denominada doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), é compreendida como a manifestação hepática de um distúrbio multissistêmico,

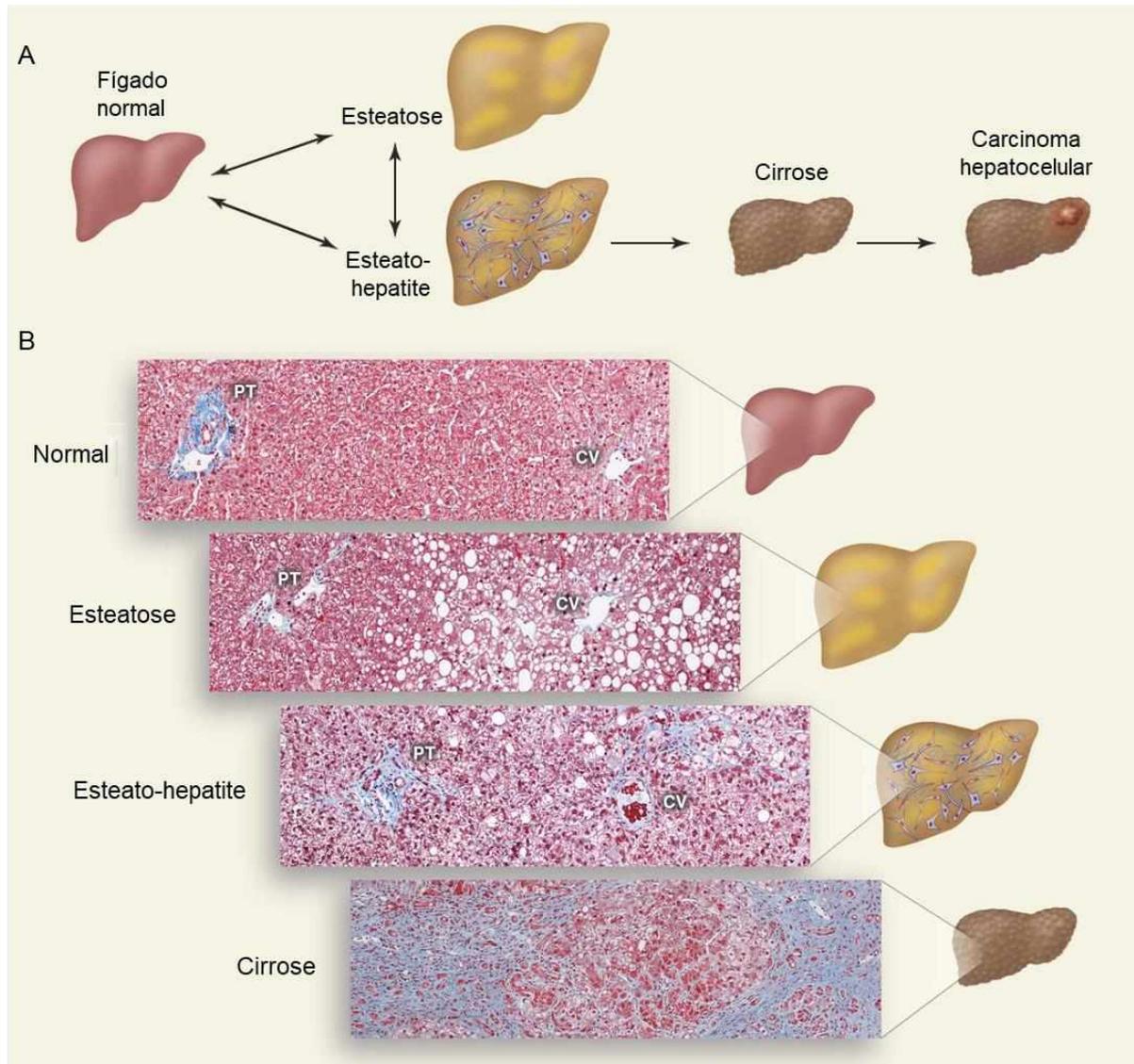
com causas, progressão e apresentação heterogêneas (BYRNE, TARGHER, 2015). A doença está estritamente associada a condições como obesidade, dislipidemias e resistência à insulina, e por isso é geralmente considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica (YOSHIOKA et al., 2020).

Os termos NAFLD e esteato-hepatite (NASH) foram primeiramente cunhados por Ludwig et al. (1980) para descrever achados histológicos semelhantes à hepatite alcoólica, como hepatomegalia e hepatite-lobular em pacientes prevalentemente obesos e sem histórico de ingestão de álcool. Desde então, a NAFLD tem sido reconhecida como um amplo espectro de condições que incluem a esteatose, esteato-hepatite, fibrose e cirrose, na ausência de consumo significativo ou recente de álcool e com potencial progressão para carcinoma hepatocelular (EASL-EASD-EASO, 2016).

No entanto, devido à heterogeneidade fenotípica e à imprecisão de terminologias e definições envolvidas na NAFLD, uma reformulação de sua nomenclatura se fez necessária. Diante disso, o acrônimo MAFLD foi recentemente proposto por um consenso internacional de pesquisadores para o melhor entendimento e elaboração da pesquisa médica e de abordagens clínicas (ESLAM et al, 2020).

Embora a patogênese da MAFLD não seja ainda totalmente compreendida, diversas hipóteses atribuem à esteatose o primeiro e mais proeminente estágio para o desenvolvimento da doença (CHALASANI et al., 2018). A esteatose hepática, popularmente conhecida como fígado gorduroso, é caracterizada pela retenção de lipídios nos hepatócitos, principalmente na forma de triacilgliceróis (TAG), em quantidade superior a 5% do peso líquido das células e está presente em 100% dos casos de MAFLD. Ainda que seja o único estágio reversível, um quarto dos casos de esteatose se desenvolve para NASH, e destes, mais de um quarto progride para fibrose severa (HU et al., 2018).

Figura 1 – Espectro de condições que constituem a doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (MAFLD). Progressão esquemática da MAFLD (A). Seções histológicas representando o fígado normal, esteatose, esteato-hepatite e cirrose (B). CV, veia central; PT, tríade portal (veia porta, artéria hepática e ducto biliar).



Fonte: Traduzido de COHEN, HORTON, HOBBS, 2011.

O acúmulo de TAG é resultado de alterações no metabolismo lipídico intra e extra-hepático decorrentes principalmente da resistência à insulina (RI), que é o principal fator de risco da MAFLD (MARCHESINI et al., 1999) (Figura 2). TAG são gerados a partir de ácidos graxos livres (AGL) e suas principais fontes são o processo de lipólise do tecido adiposo, a síntese intracelular *de novo* e os lipídios da dieta, que são captados pelo fígado na forma de quilomícrons. Nos hepatócitos, os AGL podem ser oxidados, principalmente na β -oxidação mitocondrial ou esterificados na síntese de TAG, para o armazenamento em gotículas ou para a exportação associados à apolipoproteína B (ApoB) na forma de VLDL (LEONARDO; LORIA, 2002).

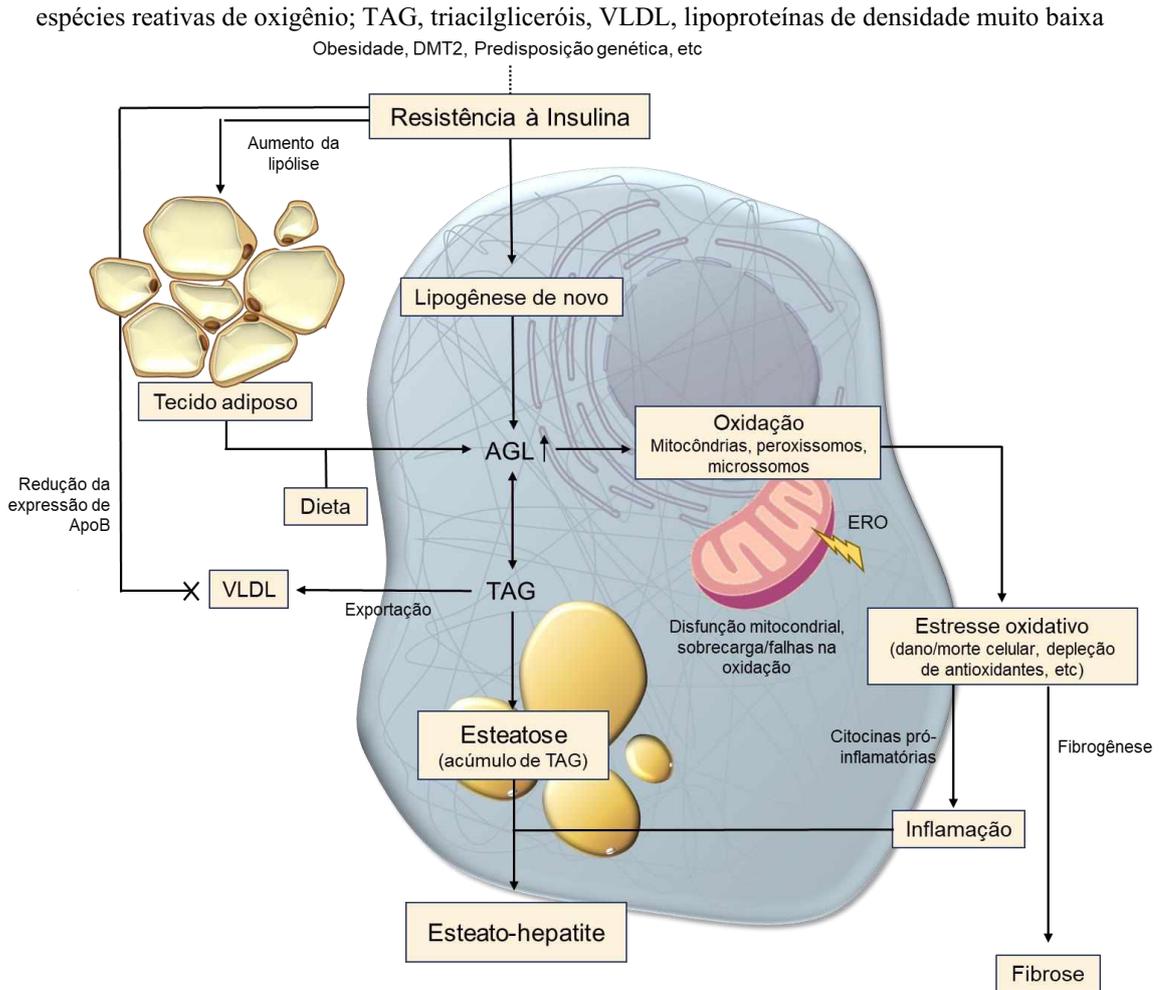
A RI é identificada como uma resposta biológica prejudicada à estimulação pela insulina dos tecidos-alvo, principalmente fígado, músculo e tecido adiposo. Com a disposição de glicose comprometida, ocorre um aumento compensatório de sua produção intracelular e a

consequente produção adicional de insulina nas células beta pancreáticas, levando aos estados de hiperglicemia e hiperinsulinemia. Diversas linhas de evidência indicam que a RI é seletiva e não afeta a síntese de lipídios do mesmo modo que afeta o metabolismo de carboidratos (LEITE et al., 2014). De fato, a hiperinsulinemia e a hiperglicemia decorrentes da RI promovem nos hepatócitos a lipogênese *de novo* através da regulação positiva de fatores de transcrição como o fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1c) e a proteína de ligação do elemento resposta de carboidrato (ChREBP) (BROWNING, HORTON, 2004). No tecido adiposo, a RI leva a uma deficiência na inibição da lipólise, com o consequente aumento do efluxo de AGL para o fígado. A RI ainda promove a disfunção do tecido adiposo levando à produção e secreção aumentada de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) (MILIĆ, LULIĆ, ŠTIMAC, 2014). Além disso, a RI ainda contribui para o acúmulo de TAG nos hepatócitos pela redução na expressão da ApoB, impedindo sua exportação para o tecido adiposo na forma de VLDL (VAZQUEZ et al., 2008; ANGULO, 2002).

Diante do papel central da esteatose hepática, Day e Jones (1998) propuseram inicialmente o modelo dos “dois *hits*” para elucidar o mecanismo etiopatogênico da MAFLD. Nessa hipótese, o acúmulo citoplasmático de TAG resultante da RI constitui o “primeiro *hit*”. Ainda que reversível, a esteatose representa um estado vulnerável para o desenvolvimento do “segundo *hit*”, que se caracteriza principalmente pelo estresse oxidativo ao desempenhar um papel central na progressão da doença através da indução de processos inflamatórios e necrose celular.

No entanto, apesar da relevância de ambos os fatores no desenvolvimento da MAFLD, o modelo dos “dois *hits*” se tornou simplista diante da complexidade de mecanismos envolvidos nos diversos fenótipos da doença. Logo, a compreensão atual sobre a etiopatogênese da MAFLD envolve a hipótese de “múltiplos *hits*” (KUPČOVÁ et al, 2019). Tais *hits* consistem em uma ação conjunta de fatores variados em indivíduos geneticamente predispostos, como aspectos nutricionais e epigenéticos, intermediários inflamatórios, hormônios secretados do tecido adiposo e a microbiota intestinal (MARCHISELLO et al., 2019; BUZZETTI, PINZANI, TSOCHATZIS, 2016).

Figura 2 – Fatores relacionados à patogênese e progressão da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo. AGL, ácidos graxos livres; ApoB, Apolipoproteína B; DMT2, diabetes *melittus* tipo 2; ERO,



A exclusão do consumo significativo de álcool (10 a 20 g de etanol por dia), de infecções virais ou do uso de drogas não é mais um pré-requisito para a caracterização da MAFLD, como era anteriormente para a definição da NAFLD (SINGAL et al., 2018; ESLAM et al., 2020). Com base na aceitação de que a MAFLD pode comumente coexistir com outras condições, seu diagnóstico é determinado pela observação de anormalidades associadas ao metabolismo. O critério primário para o diagnóstico positivo da MAFLD é a detecção de esteatose hepática, dada por evidências histológicas (biópsia), de imagem ou por biomarcadores hepáticos. Além deste parâmetro, deve-se observar pelo menos um dos seguintes critérios na saúde do paciente: sobrepeso/obesidade, diabetes *melittus* tipo 2 ou evidência de desregulação metabólica, definida por parâmetros como altos níveis séricos de colesterol e pressão arterial elevada (ESLAM, SANYAL, GEORGE, 2020).

A maioria dos indivíduos com MAFLD são clinicamente assintomáticos nos estágios iniciais da doença, o que pode dificultar seu diagnóstico precoce (KUPČOVÁ et al., 2019). O padrão ouro para a determinação da doença e único método capaz de determinar a gravidade

do dano hepático é a biópsia do fígado, que por ser um procedimento invasivo, não é um exame rotineiramente solicitado (NEWSOME et al., 2020). Exames de imagem, como a ultrassonografia, são recomendados na primeira linha de diagnóstico, mas também apresentam limitações como custo e em certos procedimentos, a impossibilidade de detecção da esteatose abaixo de 20% (ZHOU et al., 2019). Assim, testes alternativos para o diagnóstico não invasivo da MAFLD são baseados na avaliação dos níveis de biomarcadores de dano hepático, como alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST), que estão comumente elevadas no fenótipo da doença (BORLAK, CHOUGULE, SINGH, 2014).

A incidência da MAFLD tem crescido constantemente ao longo dos anos e estima-se que ela ultrapasse 25% da população adulta mundial. Apesar de frequente em todos os continentes, sua segunda maior taxa de prevalência foi encontrada na América do Sul, em 31% da população, dos quais o Brasil é grande contribuinte (YOUNOSSI et al., 2016). Em estudo realizado com uma população brasileira de meia-idade, Karnikowski et al. (2007) apontou que um terço dos observados expressavam o fenótipo da doença, indicando que sua prevalência no país é consideravelmente maior que a estimada em estudos precedentes. Ademais, em projeção para o ano de 2030, estima-se que a abrangência da MAFLD seja de 100,9 milhões de pessoas, correspondentes a um aumento de 21% em relação a 2015 (ESTES et al., 2017).

Atualmente, a MAFLD é a mais comum das doenças crônicas do fígado e se propaga paralelamente à incidência da obesidade. Sua alta prevalência tem sido influenciada por hábitos contemporâneos, difundidos principalmente na cultura ocidental, como comportamento sedentário, atividade física reduzida e a ingestão excessiva de alimentos calóricos e não saudáveis (INOUE et al., 2018). Apesar de seu grande impacto na saúde e economia mundial, a doença ainda não possui farmacoterapia aprovada e os tratamentos profiláticos se baseiam na redução de lipídios presentes na dieta e na prática de atividades físicas (YOUNOSSI et al., 2017). Assim, a investigação da MAFLD e o desenvolvimento de modelos de estudo são fundamentais para a elaboração de abordagens terapêuticas eficazes.

1.1.1 Estresse oxidativo

Mesmo em organismos saudáveis, o estresse oxidativo ocorre continuamente em níveis basais. Sies (1991) definiu primariamente o estresse oxidativo como um “distúrbio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor do primeiro, levando a potenciais

danos”. Mais recentemente, tem sido utilizado um conceito alternativo, que define o estresse oxidativo como uma “disfunção da sinalização e sistemas de controle redox” (JONES, 2006).

Protagonistas no estresse oxidativo, as ERO se referem tanto a radicais livres quanto a seus intermediários não radicalares. Por sua vez, radicais livres são definidos como qualquer espécie química que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, o(s) qual(is) lhe confere(m) sua alta reatividade (HALLIWELL, 1987). Apesar de poderem ser gerados a partir de diversos elementos, os que contêm nitrogênio e, principalmente oxigênio, são os mais relevantes em sistemas biológicos (MILLER, BUETTNER, AUST, 1990).

Existem diversas fontes de ERO no espaço intra e extracelular. Mesmo a níveis basais, espécies oxidantes são geradas normalmente pelo metabolismo aeróbico, e por isso, a mitocôndria é sua principal fonte de produção. Na cadeia respiratória mitocondrial, o oxigênio molecular é reduzido à água e esse processo leva à formação de intermediários reativos, como o ânion superóxido, o superóxido de hidrogênio e o radical hidroxil, correspondentes à redução de um, dois e três elétrons respectivamente. Além disso, moléculas oxidantes podem ser geradas a partir de diferentes tipos de radiação (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

As ERO desempenham diversas funções celulares importantes, como a ativação de proteínas cinase, estímulo à proliferação e diferenciação celular, defesa contra agentes infecciosos e morte celular por necrose ou apoptose (SARSOUR et al., 2009). Muitas dessas atividades são geradas pela ativação de fatores de transcrição sensíveis a processos redox, tais como o fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) e a proteína ativadora 1 (AP-1), que regulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias (LUGRIN et al., 2014). Outras fontes endógenas de ERO são enzimas envolvidas em reações redox, como a NADPH oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase e o citocromo P450 (STEINBRENNER, SIES, 2009).

Embora desempenhem importantes funções biológicas, a exposição às ERO frequentemente leva à perda da homeostase celular e até danos mais severos. A maioria dos prejuízos causados pelas espécies reativas envolvem primariamente os constituintes bioquímicos da célula, seja pela degradação ou simples alteração em estruturas e vias fisiológicas envolvidas, como a liberação de íons cálcio do retículo endoplasmático, desencadeamento da peroxidação lipídica em membranas celulares, mudanças conformacionais e consequente perda de função em peptídeos e a oxidação do DNA (ASHRAF, SHEIKH, 2015).

A homeostase de oxirredução é garantida pelos sistemas antioxidantes, cuja ação envolve a prevenção da formação de ERO, bloqueio ou captura dos radicais formados e processos de reparo, que removem biomoléculas danificadas, antes que sua agregação leve a

alterações no metabolismo celular (CHEESEMAN e SLATER, 1993). O sistema endógeno de defesa antioxidante inclui enzimas como a glutatona peroxidase, superóxido dismutase e catalase e componentes não enzimáticos, proteínas, como transferrina e ferritina e sequestradores de baixo peso molecular, como o ácido úrico, coenzima Q e o ácido lipoico. Por sua vez, os principais antioxidantes exógenos correspondem às vitaminas C e E (ácido ascórbico e α -tocoferol), carotenoides e aos compostos fenólicos (AGUILAR, NAVARRO, PEREZ, 2016).

O estresse oxidativo tem sido correlacionado a diversas desordens, como condições neurodegenerativas, câncer, doenças cardiovasculares, inflamatórias e do metabolismo, como diabetes e síndrome metabólica, seja como agente patogênico ou fator agravante (MAULIK et al., 2013). O papel central do estresse oxidativo na progressão da MAFLD é sustentado por estudos em modelos animais e humanos que demonstram a associação da esteatose com a maior produção de ERO e a disfunção mitocondrial (SUMIDA et al., 2013).

A maior disponibilidade de lipídios leva a um aumento nas vias reguladas pelo receptor ativado por proliferadores de peroxissomos alfa (PPAR- α), que aumentam a transcrição de genes envolvidos na β -oxidação. Além disso, a oxidação de AGL também se encontra elevada em vias alternativas, principalmente nos peroxissomos e microssomos (BROWNING; HORTON, 2004). Diversos estudos ainda comprovam a ocorrência da disfunção mitocondrial e deficiências em enzimas da β -oxidação peroxissomal em pacientes com MAFLD (FAN et al., 1998). Tais fatores conduzem a um aumento significativo da produção de ERO, citocinas pró-inflamatórias e de intermediários tóxicos. Dentre os danos causados pelas ERO, destacam-se a depleção de sistemas antioxidantes e danos progressivos na estrutura de biomoléculas úteis, levando ao acúmulo de mais espécies reativas (PARADIES et al., 2002).

Na mitocôndria, os principais constituintes afetados pelas ERO são a membrana e o DNA mitocondrial. A membrana mitocondrial contém uma concentração substancial de fosfolipídios contendo ácidos graxos poli-insaturados, que são mais suscetíveis ao dano oxidativo e levam à peroxidação lipídica (FERRAMOSCA; DI GIACOMO; ZARA, 2017). Por sua vez, a peroxidação desses componentes da membrana, especialmente o ácido docosahexanoico, leva a um maior comprometimento da atividade da cadeia respiratória, com a consequente superprodução de ERO (INFANTE; HUSZAGH, 2000). Esse ciclo vicioso ainda parece aumentar a proteólise pré-secretora de ApoB no retículo endoplasmático, contribuindo para o acúmulo de TAG (CAO; KAUFMAN, 2014).

Além disso, o estresse oxidativo promove a geração de diversos mediadores inflamatórios, como o TNF- α (KAKINO et al., 2018). Além dos processos de inflamação, o TNF- α também exerce um papel importante no desenvolvimento da RI e da via apoptótica através da ativação das caspases (AKASH; REHMAN; LIAQAT, 2018; OCEANDY et al., 2019). No entanto, devido ao gasto energético envolvido na apoptose dos hepatócitos, a morte celular por necrose e sem grande custo de energia é favorecida, desencadeando lesões no tecido hepático. Assim, diante dos sucessivos danos ao fígado, e da produção excessiva de ERO, citocinas pró-inflamatórias e produtos tóxicos da peroxidação lipídica, a fibrogênese é estimulada pela ativação das células estreladas do fígado (TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017; ANGULO et al., 2015). Em consequência do estado fibrótico e inflamatório do fígado, o risco de progressão para um estágio cirrótico terminal é aumentado, com potencial desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e em último caso a execução de transplante hepático (GE; RUNYON, 2016).

A elucidação dos mecanismos moleculares que levam ao acúmulo de lipídios, ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial favorece o desenvolvimento de intervenções preventivas da progressão da esteatose hepática (DONGIOVANNI et al., 2016). Flavonoides são uma das principais classes de antioxidantes naturais presentes na dieta humana e estão abundantemente presentes em plantas nativas do Brasil. A atividade destes compostos sobre a esteatose envolve diversos mecanismos, como o efeito sobre diferentes vias envolvidas na patogênese de doenças hepáticas, o controle da lipogênese *de novo* pela regulação de fatores de transcrição de proteínas lipogênicas, como SREBP-1 e PPAR α , além da alta capacidade de sequestro de radicais livres verificada na MAFLD (XIE, CHEN, 2013; VAN DE WIER et al., 2017).

Jiang et al. (2014) demonstraram que as antocianinas, uma importante subclasse de flavonoides podem ainda proteger as células hepáticas contra danos induzidos pelo estresse oxidativo através da inibição das vias apoptóticas da mitocôndria. Outros mecanismos parecem envolver a prevenção da despolarização mitocondrial induzida por hiperglicemia. Em estudo realizado em humanos, foi observado que a administração de vitamina E, outra importante molécula antioxidante, também melhora a condição da NASH através da redução dos níveis de ALT e AST, da esteatose hepática e de inflamação lobular (SANYAL, 2010).

Apesar de comprovada a eficácia de moléculas antioxidantes em diversos mecanismos envolvidos MAFLD, mais estudos ainda são necessários para a comprovação e direcionamento de terapias efetivas para os diversos fenótipos da doença. Assim, o

desenvolvimento de modelos de estudo da MAFLD se torna essencial para a investigação de produtos naturais promissores em seu tratamento.

1.1.2 Modelos de estudo da MAFLD

Diante das recentes atualizações, a MAFLD está sujeita a subclassificações baseadas em sua heterogeneidade fenotípica (ESLAM et al., 2020). Assim, o desenvolvimento de modelos de estudo é fundamental para o melhor entendimento das vias fisiopatológicas envolvidas na doença.

Ao longo dos anos, os mecanismos moleculares e vias de sinalização envolvidas na progressão da MAFLD foram primeiramente elucidados em modelos animais, genéticos ou induzidos por dieta, e confirmados através de estudos clínicos (KANURI e BERGHEIM, 2013). Para tanto, um bom modelo de estudo deve reunir as características histológicas e os distúrbios metabólicos associados à MAFLD (SCHATTENBERG, GALL, 2010), ainda que a maioria dos modelos animais disponíveis não seja totalmente capaz de simular todos os aspectos das condições clínicas humanas. De fato, as incompatibilidades fenotípicas encontradas em modelos animais são frequentemente atribuídas a diferenças fisiológicas interespecíficas e de base genética, haja vista que análises dos transcriptomas hepáticos de humanos, camundongos e ratos sugerem grandes divergências na função hepática (YU et al., 2010; SEOK et al., 2013). Além disso, a preocupação da comunidade científica é crescente diante da consideração ética do uso de animais em pesquisas, que se torna cada vez mais restrito.

Para superar tais limitações, muitos esforços têm sido empregados no desenvolvimento de abordagens *in vitro* baseados em tecidos humanos, com grande destaque para novas tecnologias, como o uso de modelos de tecido tridimensionais a partir da bioimpressão e de células-tronco pluripotentes induzidas. Entretanto, apesar da tentativa de recriarem a complexidade fisiológica humana e oferecerem dados pré-clínicos mais robustos, essas tecnologias ainda não foram bem estabelecidas e apresentam dificuldades quanto à sua reprodutibilidade, disponibilidade e custo (BENAM et al., 2015).

Assim, os modelos *in vitro* baseados em cultura bidimensional convencional, como culturas de células primárias e de linhagens imortalizadas, continuam sendo amplamente empregadas na pesquisa de doenças hepáticas. Culturas primárias de hepatócitos e outros tipos celulares representam modelos fisiologicamente relevantes para condições clínicas, porém, devido a questões éticas e à disponibilidade de amostras de fígado humano, além da

baixa estabilidade, esse método se torna dispendioso (DAMBACH, ANDREWS, MOULIN, 2005). Alternativamente, o cultivo de linhagens celulares imortalizadas demonstra uma alta capacidade replicativa, fenótipo estável, com maior facilidade de padronização e manutenção e tempo de vida prolongado (KANURI, BERGHEIM, 2013).

A linhagem HepG2 é a mais amplamente empregada no estudo de função e doenças hepáticas. É derivada de biópsias de um tipo diferenciado de carcinoma hepatocelular e apresenta características altamente proliferativas e não tumorigênicas, além de desenvolverem morfologia epitelial quando crescida em superfície sólida (ADEN et al., 1979). A partir de extensas caracterizações, constatou-se que a linhagem HepG2 expressa funções hepáticas diferenciadas, como a síntese e secreção de proteínas plasmáticas, metabolismo do colesterol e TAG, metabolismo e transporte de lipoproteínas, síntese de ácidos biliares, sinalização da insulina e síntese de glicogênio (JAVITT, 1990; MEIER et al., 2007).

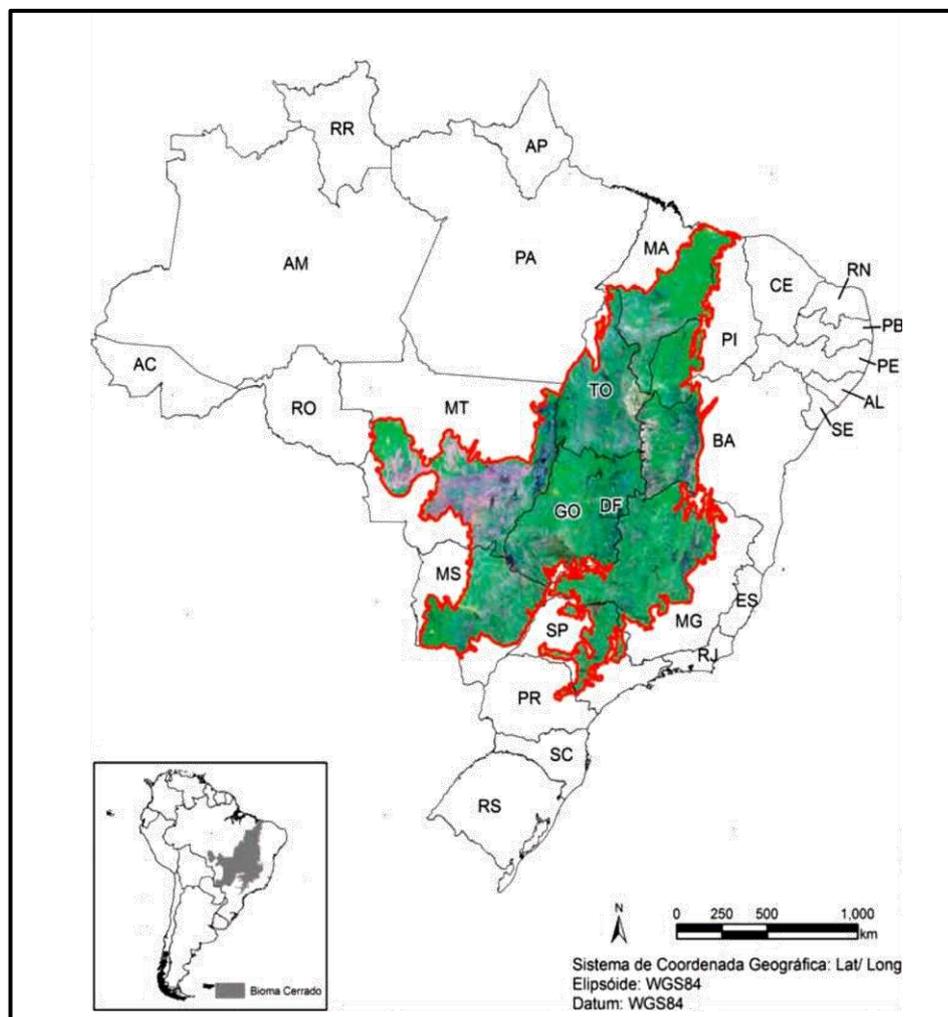
Em modelos da esteatose hepática, McMillian et al. (2001) foram pioneiros na utilização da cultura de células. Em seu estudo, o acúmulo de lipídios foi induzido em células da linhagem HepG2 através da adição de compostos conhecidamente esteatogênicos, como estrogênio e outros esteroides, e analisado por método fluorimétrico baseado no corante lipofílico *Nile red*. Mais tarde, outro grupo de pesquisadores desenvolveu um modelo de esteatose em células HepG2 através da incubação com os ácidos graxos palmítico e oleico em diversas concentrações e proporções. A partir da comparação com hepatócitos de cultura primária, investigados no mesmo estudo, Gómez-Lechón et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes à linhagem HepG2 quando analisados o conteúdo intracelular de TAG e a viabilidade celular. Desde então, as principais abordagens de modelos *in vitro* da MAFLD têm utilizado os ácidos palmítico e oleico para a indução de esteatose. São respectivamente ácidos graxos saturados (16:0) e monoinsaturados (18:1), sendo os mais abundantes na dieta e em níveis séricos no organismo humano (ABDELMAGID et al., 2015).

Muitos outros estudos têm sido desenvolvidos para uma investigação mais acurada da MAFLD e de possíveis agentes terapêuticos. Nesses esforços, grupos de pesquisadores têm demonstrado um efeito inibitório da esteatose hepática de extratos naturais ricos em compostos antioxidantes, a partir da redução do conteúdo de TAG e de marcadores do dano hepático em modelos *in vitro* induzidos por ácidos graxos (WANG et al., 2015; LIU et al., 2011). Apesar de achados como estes, os conhecimentos sobre a MAFLD e os efeitos terapêuticos de compostos bioativos naturais são ainda escassos e necessitam de maiores investigações.

1.2 Cerrado

Localizado predominantemente no Planalto Central do Brasil, o Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul (Figura 3). Ocupa originalmente uma área estimada superior a 2 milhões de km², equivalente a 23% do território nacional, que se estende sobre os estados do Amapá, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Piauí, Rondônia, Roraima, São Paulo e Tocantins, somando mais de 1400 municípios (BRASIL, 2020).

Figura 3 – Representação espacial da abrangência do Cerrado no Brasil



Fonte: BRASIL, 2015.

O Cerrado é um complexo vegetacional composto por formações florestais, savânicas e campestres distribuídas em 11 fitofisionomias determinadas primariamente pelo clima e eventos temporais (RIBEIRO e WALTER, 2008). Conseqüentemente, verifica-se uma significativa alternância de espécies entre diferentes fitofisionomias, dada a ampla

heterogeneidade de ecossistemas. O Cerrado é considerado, portanto, a savana mais rica do mundo e um *hotspot* mundial de biodiversidade, haja vista que abriga 5% da biodiversidade do planeta, que se reflete em uma imensidade de espécimes da flora e fauna. Pesquisadores constataram a presença de 11.627 espécies vegetais vasculares nativas, das quais 44% ocorrem de maneira endêmica no bioma (MENDONÇA et al., 2008; KLINK e MACHADO, 2005). Além disso, são encontradas cerca de 320.000 espécies animais na região (AGUIAR et al., 2004).

O clima do Cerrado predominante é do tipo estacional, caracterizado por um período chuvoso entre os meses de outubro e março, seguido de um período seco de abril a setembro. Ao longo do ano, apresenta temperaturas amenas, com média entre 22 e 27 °C e uma precipitação média de 1500 mm (RIBEIRO e WALTER, 2008).

No Cerrado, predominam-se os latossolos, caracterizados pelo baixo teor de fertilidade natural, alta acidez e alto teor de metais, como o alumínio (AB'SABER, 1983). A fim de contornar tais condições e tornar o solo produtivo, a agricultura comercial ocupou extensas parcelas do bioma nas últimas décadas a partir da mecanização e do uso indiscriminado de insumos químicos. A expansão da fronteira agrícola, cujo desenvolvimento se baseia no desmatamento desregrado de habitats naturais, gera um empobrecimento ecológico para dar lugar a pastagens e sistemas produtivos de monoculturas, em que se destaca a soja, principal item de exportação do Brasil.

No ano de 2004, as pastagens plantadas ultrapassavam 40% da área original do Cerrado (MACHADO et al., 2004). O mesmo estudo concluiu que 55% do bioma já haviam sido desmatados ou transformados pela ação humana, equivalendo a três vezes a área desmatada da Amazônia brasileira. Somente no ano de 2019, o Relatório Anual do Desmatamento no Brasil (AZEVEDO et al., 2019) apontou o Cerrado como o segundo bioma com maior índice de áreas desmatadas no território nacional, somando a perda de 408.646 hectares de vegetação natural.

Apesar da ampla biodiversidade e importância socioambiental, o Cerrado é o bioma com a menor proporção de áreas legalmente protegidas. Apenas 8,21% de sua extensão total estão sob proteção integral em unidades de conservação, o que propicia a prática predatória de exploração e conseqüentemente a degradação da diversidade local (ICMBIO, 2020). Nesse contexto, fez-se necessária a implementação de programas e iniciativas de preservação do bioma, como o Programa Cerrado Sustentável e o Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado (BRASIL, 2016).

No Cerrado, vivem cerca de 25 milhões de habitantes, dentre os quais estão os povos tradicionais, que utilizam recursos naturais como condição para sua reprodução cultural, social e econômica. Uma ampla variedade de plantas é utilizada por essas comunidades e pela população em geral: mais de 10 tipos de frutos comestíveis do Cerrado são frequentemente consumidos pela população local e comercializados em centros urbanos. Algumas delas, como a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), ainda apresentam propriedades terapêuticas úteis à saúde humana. Constata-se que mais de 220 espécies possuem uso medicinal, sendo empregadas em uma variedade de aplicações.

1.3 Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)

Hancornia speciosa Gomes, popularmente conhecida como mangabeira ou mangaveira, é uma árvore frutífera nativa do Brasil que também ocorre em países como Peru, Bolívia e Paraguai (FLORA DO BRASIL, 2020). No território brasileiro, sua distribuição é ampla e abrange os domínios fitogeográficos da Amazônia, Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica em todas as regiões do país.

Pertencente à família *Apocynaceae*, a mangabeira apresenta porte médio, com altura mediana de 4 a 7 m e copa ampla. O tronco é geralmente único, tortuoso ou reto, de caule rugoso e áspero. Em geral, as folhas são simples, opostas, uniformemente espaçadas, elípticas nas duas extremidades, com presença ou ausência de pelos (Figura 4). A inflorescência é composta de duas até cinco flores hermafroditas, brancas, tubulosas e perfumadas. O fruto do tipo baga é elipsoidal ou arredondado de 2,5 a 6,0 cm, amarelo com manchas ou estrias avermelhadas no exocarpo, com polpa carnosu-viscosa e ácida de sabor suave e doce (CORADIN, CAMILLO, PAREYN, 2018). No Cerrado, usualmente verifica-se apenas uma safra de frutos por ano entre os meses de outubro e dezembro.

Figura 4 – Ilustração botânica de *Hancornia speciosa* Gomes.

Fonte: Elaborado pelo autor

O nome do fruto, mangaba, é oriundo de um dialeto tupi-guarani e significa “coisa boa de comer”, refletindo ainda hoje suas principais aplicações tanto para consumo doméstico quanto em agroindústrias. Além do consumo *in natura*, sua polpa é utilizada no preparo de sucos, geleias, picolés, licores, compotas e diversas sobremesas e mais amplamente na produção de polpas congeladas e sorvetes. Sob o enfoque nutricional, a mangaba não apresenta alto valor energético, no entanto é rica em ferro, zinco, compostos fenólicos e tânico e pectina. Somados a tais compostos, as vitaminas C e E são ainda encontradas em maior teor do que na maioria das frutas consumidas pela população brasileira (CORADIN, CAMILLO, PAREYN, 2018).

Além disso, a mangabeira proporciona um amplo aproveitamento para comunidades locais, dado o emprego do látex como matéria-prima para a produção de borracha artesanal e do tronco como madeira e lenha, por exemplo. Ademais, as folhas, raízes, látex e cascas do tronco são popularmente empregados no preparo de chás e infusões para fins medicinais diversos, devido à eficácia no tratamento de feridas e lesões gástricas e a propriedades antioxidantes, anti-hipertensivas, anti-inflamatórias e antirreumáticas. O látex é utilizado para tratar úlceras, herpes, dermatoses e tuberculose. A casca, por sua vez, é empregada no

tratamento de afecções hepáticas e as folhas no preparo de chás indicados para cólica menstrual, enquanto o decocto da raiz é indicado como anti-hipertensivo e hipoglicemiante (PEREIRA, 2012). Estudos etnobotânicos também já apontaram a aplicação popular da mangabeira como anti-hiperlipidêmica, anorexígena, antidiabética e antiobesidade (SILVA et al., 2010).

Algumas dessas atividades já foram descritas na literatura científica para as folhas de *H. speciosa* Gomes, que são o alvo deste estudo. Análises preliminares verificaram o potencial anti-hipertensivo do extrato etanólico das folhas por meio da redução da resistência periférica induzida pela inibição da enzima conversora de angiotensina I, produção de óxido nítrico e um mecanismo que envolve o aumento da produção de peróxido de hidrogênio nas artérias mesentéricas de camundongos hipertensos (SILVA et al., 2011; 2016). PEREIRA et al. (2015) também demonstraram um potencial efeito antidiabético do extrato com base na inibição da enzima α -glucosidase e o aumento da captação de glicose pelos adipócitos em modelos também murinos. A atividade anti-inflamatória foi ainda avaliada pelo efeito inibitório de frações ricas em ciclitóis e flavonoides do extrato sobre o fator de transcrição NF- κ B, que é responsável pela sinalização de mediadores inflamatórios (ENDRINGER, PEZZUTO, BRAGA, 2009). Outras atividades constatadas envolvem o efeito inibidor da acetilcolinesterase, propriedades antioxidantes (MARQUES et al., 2015), antifúngicas, antivirais (BRANDÃO et al., 2010) e cicatrizantes (GELLER et al., 2015).

Estudos adicionais ainda identificaram a composição fitoquímica dos extratos de diferentes partes de *H. speciosa* Gomes e dentre eles, o das folhas, destacando-se compostos ciclitóis, como L-(+)-bornesitol e os ácidos quínico e clorogênico; flavonoides, tais como rutina, quercetina, diglicosídeo e triglicosídeo de kaempferol; triterpenos e esteroides (PEREIRA et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2016; BASTOS et al., 2017).

Os compostos bioativos de plantas, como os encontrados na mangabeira, representam uma abordagem terapêutica promissora para a MAFLD devido a atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e de modulação de genes e da função de proteínas envolvidas na patogênese da doença. De fato, existem diversas evidências de que várias classes de antioxidantes, como flavonoides, são capazes de reverter a esteatose hepática. Nesse sentido, a elucidação dos mecanismos bioquímicos associados ao potencial hepatoprotetor dos compostos bioativos pode levar à elaboração de terapias mais direcionadas e eficazes para a esteatose hepática. Mais especificamente, o Cerrado constitui uma fonte abundante de recursos naturais ainda inexplorados e a utilização de espécies nativas do bioma como objeto de estudo favorece,

além de aspectos clínicos envolvidos na doença, a valorização do conhecimento tradicional e o desenvolvimento econômico de culturas como a mangaba.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do extrato aquoso das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes sobre um modelo *in vitro* de esteatose hepática em células HepG2.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato;
- Determinar o efeito do extrato sobre a viabilidade celular;
- Em células HepG2 com acúmulo de lipídios induzido por ácidos graxos avaliar:
 - O efeito do extrato sobre o conteúdo de lipídios;
 - O dano celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras e preparo dos extratos

As folhas de *H. speciosa* foram coletadas na região de Patrocínio, MG. O cadastro de acesso ao patrimônio genético para fins de pesquisa científica para a espécie citada foi realizado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, sob o nº de cadastro A6A598B, atendendo aos requisitos do Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016, que regulamenta a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, a qual dispõe sobre a regularização de atividade de acesso ao patrimônio genético.

As folhas foram congeladas, liofilizadas e em seguida pulverizadas. A metodologia de extração aquosa das folhas foi desenvolvida com base nas informações de uso popular

associado à medicina tradicional (preparo de infusão das folhas). Para tanto, as folhas secas foram trituradas em moinho de facas e submetidas à infusão em água na proporção de 1:10 (g/mL) em banho-maria a 72 °C durante 10 minutos. Posteriormente, foi realizada filtração a vácuo. O extrato bruto foi então liofilizado e armazenado a 4 °C.

3.2 Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante do extrato das folhas de mangaba foi determinada pelo Índice ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), a partir da adaptação de metodologias descritas na literatura (HUANG et al., 2002; PRIOR, WU, SCHAICH, 2005; SILVA et al., 2007). Este método se baseia na medição do decaimento espectrofotométrico da fluorescência de uma sonda fluorescente mediante interação com o radical peroxil, o qual é gerado pela reação do AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)] com o oxigênio molecular.

Para a construção da curva de calibração, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8- ácido tetrametilcromano-2-carboxílico) foi utilizado como antioxidante de referência a concentrações de 2,5, 5,0, 10,0, 12,5 e 15,0 µg/mL. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços (branco opaco, Perkin Elmer), onde foram adicionados 50 µL de amostra diluída (concentrações), tampão fosfato-salino (PBS) ou padrão, 50 µL de fluoresceína (78 mM, em PBS), seguidos por período de incubação à 37 °C durante 15 min. Posteriormente, foram adicionados 25 µL do radical AAPH (diluído a 221 mM em PBS) e a fluorescência foi lida a 485 nm (excitação) e 535 nm (emissão) por 1h minuto a minuto em fluorímetro VICTOR™ X3. Os valores do índice ORAC foram então calculados pela Área Sob a Curva (AUC) do padrão e amostra. A curva padrão foi obtida ao traçar as concentrações de Trolox contra a AUC líquida das concentrações do extrato. O valor ORAC final foi determinado a partir da equação de regressão entre a concentração de Trolox e a AUC líquida e são expressas como equivalentes de Trolox (µM) por grama de extrato.

3.3 Cultura de células da linhagem HepG2

A linhagem de células derivadas de carcinoma hepatocelular humano HepG2 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio DMEM *low glucose* (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), estreptomicina (100 µg/ml) e penicilina (100 U/ml) à temperatura de 37°C, sob atmosfera a 5% de CO₂ em incubadora umidificada. Os subcultivos foram realizados em

intervalos de 2 a 3 dias, utilizando-se solução de tripsina/EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético).

3.4 Determinação da viabilidade celular

O efeito do extrato aquoso das folhas de mangaba sobre a viabilidade celular em linhagem celular HepG2 foi determinado pelo método MTT desenvolvido por Mosmann (1983). Este é um ensaio colorimétrico baseado na redução do sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio) a cristais de formazan por enzimas desidrogenases em células metabolicamente ativas.

As células (5×10^3) foram semeadas em microplacas de 96 poços com meio de cultura DMEM suplementado a 10% de SFB e 1% de antibióticos e incubadas por 24 horas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C, para adesão. Após esse período, os poços foram lavados com PBS e incubados com o extrato diluído (a concentrações finais de 31,25, 62,50, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL) em DMEM suplementado, mantidos novamente em incubadora umidificada. Os controles foram incubados somente com DMEM suplementado. Após o tempo determinado para cada avaliação (12, 24 ou 48h), o sobrenadante foi descartado e os poços lavados com PBS. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de solução de sal de MTT diluído em PBS à concentração de 5 mg/mL e 100 µL de meio DMEM, mantidos por 1h em incubadora umidificada. Concluído o tempo de incubação, a solução de MTT foi removida e adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido a cada poço para diluição dos cristais de formazan. Após homogeneização durante 10 min, a absorbância dos poços foi determinada em leitor de microplacas sob comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram obtidos a partir da análise dos controles, dada na equação a seguir e expressos em porcentagem de viabilidade celular:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{média da absorbância dos tratados}}{\text{média da absorbância dos controles}} \times 100$$

3.5 Indução da esteatose hepática

O procedimento para indução do acúmulo de lipídios na linhagem HepG2 foi realizado como descrito por FARIA (2020). Inicialmente, as células (5×10^5 células/mL) foram

semeadas em placa de 24 poços com meio DMEM suplementado (10% SFB e 1% antibióticos) e incubadas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C por 24h para adesão. Em seguida, o meio de cultura contendo SFB foi removido e os poços foram lavados com PBS e novamente incubados com meio DMEM não suplementado. Após 24h de privação de SFB, foi feita outra lavagem com PBS, seguida da adição das soluções veículo e de ácidos graxos (ácidos oleico e palmítico 2:1, à concentração final de 1,0 mM) nos devidos tratamentos. Nos tratamentos coincubados, o extrato aquoso das folhas de mangaba diluído em DMEM e filtrado em membrana de 0,22 µm foi adicionado em concentrações finais de 50 e 100 µg/mL.

A solução dos ácidos palmítico e oleico foi incubada a concentrações de 0,33 e 0,66 mM respectivamente, a partir de soluções estoque a 150 mM em etanol P.A., adicionadas em meio DMEM e albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA) a 4,5%. Para os controles, foi preparada uma solução de DMEM, 4,5% de BSA e etanol como veículo. As soluções foram filtradas em membrana de 0,22 µm para esterilização.

Após incubação de 24h, o sobrenadante de cada um dos poços foi coletado e armazenado a 4 °C para utilização no ensaio de aminotransferases, como descrito no item 3.6.

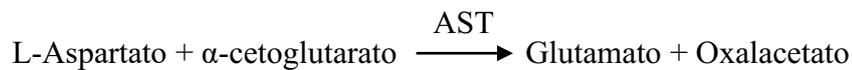
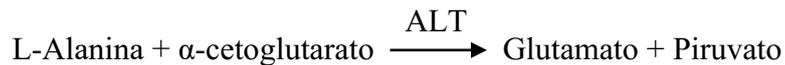
Para coloração dos lipídios acumulados, as células foram então lavadas com PBS e em seguida fixadas com solução de paraformaldeído 4% tamponado a 4 °C durante 15 min. Após repetidas lavagens com água destilada, uma solução de corante *Oil Red O* (0,5% em isopropanol) diluída em água destilada na proporção 1:1 foi adicionada aos poços e mantida por 50 min para coloração dos lipídios intracelulares. Posteriormente, a solução corante foi retirada e outras três lavagens foram feitas com água destilada e uma rápida lavagem adicional com isopropanol 60% para minimização do *background* causado pelo corante. Ambas as soluções de paraformaldeído e *Oil Red O* foram filtradas em membranas de 0,45 µm para remoção de resíduos insolúveis.

Para obtenção das fotomicrografias e melhor visualização dos núcleos, após a coloração com *Oil Red O* as células foram coradas com Hematoxilina de Meyer durante 1 min e em seguida lavadas por 5 cinco vezes em água corrente. As fotomicrografias foram então obtidas em microscópio óptico de contraste de fase invertido acoplado a câmera digital em ampliação de 400 vezes.

3.6 Determinação da atividade de aminotranferases

As atividades da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram determinadas por método colorimétrico utilizando-se Kits Labtest® (Lagoa Santa, MG, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

Ambos os ensaios se baseiam na reação de transferência de grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos a partir de substratos específicos, como mostram as reações a seguir:



O piruvato e o oxalacetato formados são medidos separadamente através da formação de hidrazona, que tem coloração amarelada intensa em meio alcalino.

O meio de cultura de cada um dos 24 poços da placa após a incubação descrita no item 3.5 foi utilizado como amostra. Para tanto, o sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de centrifuga, que foram por sua vez armazenados à 4 °C até a execução do ensaio, em um período inferior a 7 dias.

O procedimento experimental foi executado de acordo com as instruções do fabricante e as curvas de calibração foram preparadas com diluições de soluções padrão, que foram também lidas à 505 nm. Após análise de regressão polinomial de ordem 2, foram determinadas as equações das curvas, como se segue:

$$\text{Atividade (U/mL)} = a \times (\text{Abs})^2 + b \times (\text{Abs}) + c$$

As equações foram então aplicadas para determinar a atividade das amostras. Os resultados foram expressos em U/mL.

3.7 Análise estatística

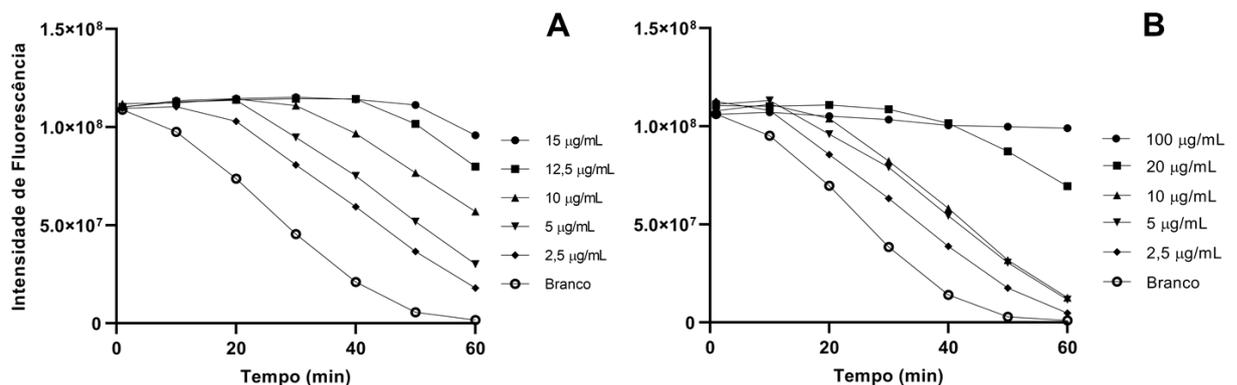
A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Kolmogorov–Smirnov. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância univariada ANOVA *one-way* seguida pelo teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$. Todos os dados apresentaram distribuição normal. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism* versão 8.4.3 (San Diego, Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada em cinco diferentes concentrações através do método ORAC. Na figura 5, estão representadas as curvas da cinética de decaimento da fluorescência na presença de Trolox nas concentrações de 2,5 a 15 $\mu\text{g/mL}$ e do extrato nas concentrações de 2,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. O Trolox é um análogo sintético da vitamina E, amplamente utilizado como padrão para avaliação do potencial antioxidante de misturas complexas (PUBCHEM, 2020). Os resultados indicam uma alta capacidade de sequestro do radical peroxila do extrato aquoso das folhas de *H. speciosa* e o perfil da curva de decaimento da amostra exibe um comportamento dose-dependente.

Figura 5 – Cinética de decaimento da fluorescência através do ensaio ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) durante 60 minutos na presença de (A) Trolox nas concentrações 2,5 a 15 $\mu\text{g/mL}$ e (B) do extrato aquoso das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes, nas concentrações de 2,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.



O extrato apresentou um valor médio de $260,04 \pm 65,76 \mu\text{M ET/g}$, revelando uma elevada capacidade antioxidante das folhas de mangaba. Em outro estudo, foram analisados os frutos de *H. speciosa* em diferentes estágios de maturação e os valores encontrados são relativamente inferiores quando comparados àqueles obtidos neste estudo para os extratos das folhas, com máxima expressão para a polpa do fruto, a $16,17 \mu\text{M ET/g}$ (PERFEITO, 2014).

Valores tão baixos podem ser explicados pela diferença entre o conteúdo de moléculas antioxidantes na folha e no fruto e pela não utilização de qualquer método de extração, que segundo Leite (2010), é um dos fatores que afetam drasticamente o resultado final.

Na literatura, são escassos os estudos de avaliação da capacidade antioxidante pelo método ORAC para outras partes de *H. speciosa*, que não o fruto. Isso se deve provavelmente à maior relevância econômica e aplicabilidade dos frutos e polpas na indústria e consumo caseiro. Mais especificamente, não foi encontrado nenhum estudo de determinação do potencial antioxidante do extrato aquoso das folhas de mangaba.

No mesmo trabalho citado anteriormente, a polpa de mangaba também mostrou a maior atividade antioxidante através do método DPPH, com 11,28 μM ET/g. Em outro estudo, Assumpção et al. (2014) avaliaram o potencial antioxidante do extrato metanólico do fruto da mangaba pelo método DPPH e os resultados foram expressos em IC_{50} , que representa a concentração mínima necessária para promover a redução de 50% do radical. Como resposta, foi encontrado um IC_{50} de 3050 g de fruto por g de DPPH, valor similar ao determinado por Rufino et al. (2010), de 3385 g/g DPPH para o extrato aquoso do fruto.

Gomes (2010) observou um alto potencial antioxidante contra o radical DPPH para o extrato metanólico das folhas e suas diferentes partições (diclorometano, acetato de etila e butanol), quando comparados ao padrão BHT (Hidroxitolueno butilado). O menor valor, e, portanto, o maior potencial sequestrante do radical, foi encontrado para a partição butanólica do extrato metanólico das folhas, com valor IC_{50} de 0,74 mg/mL. Este valor em muito se aproxima do observado para o padrão BHT, de 0,58 mg/mL, o que evidencia a eficiência das folhas de *H. speciosa* e do método de extração em questão.

A ausência de aplicação das folhas e outras partes de *H. speciosa* como objeto de estudo na literatura ressalta a importância de trabalhos como este. Por conseguinte, a complexidade e a diversidade encontrada nas variações regionais de cultivo da mangaba, que levam a variações na composição fitoquímica e estágios de desenvolvimento, as diferentes metodologias empregadas, como métodos de extração, radicais utilizados, mecanismos de reação e condições particulares da análise oferecem grande dificuldade na comparação entre os resultados obtidos e aqueles encontrados na literatura.

Comparativamente ao ensaio DPPH, o método ORAC apresenta diversas vantagens, sendo reconhecido no meio acadêmico e industrial por sua excelência na investigação da capacidade antioxidante (HUANG, OU, PRIOR, 2005). Dentre elas, ressalta-se a utilização e importância do radical peroxila como pró-oxidante, o qual é intermediário da peroxidação lipídica, principalmente em membranas celulares. Além disso, este método é capaz de detectar

ambos compostos hidrofílicos e lipofílicos, a depender do solvente utilizado (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005). Outra vantagem se dá pelo emprego da análise de fluorescência, sem que haja grandes interferências de compostos coloridos presentes nas amostras (LIMA, 2008). Ainda, segundo pesquisadores, o método ORAC é o que melhor representa a atividade antioxidante de fenóis em sistemas biológicos, uma vez que utiliza radicais livres biologicamente relevantes e integra o tempo e grau de atividades dos agentes antioxidantes (AWIKA et al., 2003).

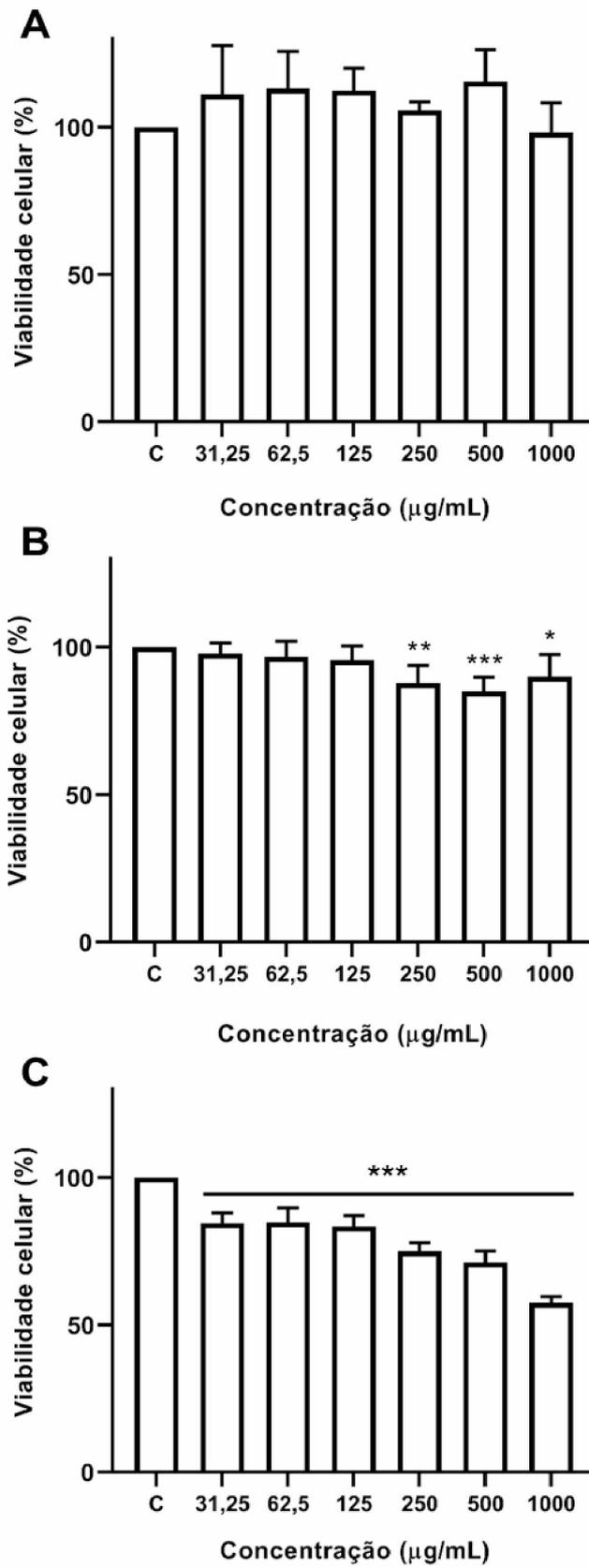
4.2 Determinação da viabilidade celular

O teste do efeito do EAM sobre a viabilidade celular na linhagem HepG2 foi realizado pelo método MTT e os resultados estão representados na figura 6. Quando comparados com o controle, nenhuma das concentrações do extrato apresentou alteração significativa da viabilidade celular no período de 12 h, o que se repetiu nas concentrações de 31,25, 62,5 e 125 µg/mL ao tempo de 24 h. No entanto, nas demais concentrações do EAM (250, 500 e 1000 µg/mL), foram observadas reduções pequenas, mas significativas. Em contrapartida, no período de 48 h, todas as concentrações testadas promoveram reduções significativas da viabilidade celular.

De acordo com a norma 10993-5 da Organização Internacional de Normalização (ISO, 2009), que trata dos testes de citotoxicidade *in vitro*, um composto apresenta potencial citotóxico quando induzir a redução da viabilidade celular a menos de 70% da viabilidade do grupo controle. Nessa perspectiva, somente na concentração de 1000 µg/mL no intervalo de 48 h, que reduziu a viabilidade celular das células HepG2 a 60,9%, o extrato pôde ser considerado citotóxico.

Figura 6 – Determinação da viabilidade celular do extrato aquoso das folhas de *H. speciosa* Gomes em células HepG2 pelo método MTT após 12 (A), 24 (B) e 48 (C) horas de incubação nas concentrações de 31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL. Todas as análises foram feitas em sextuplicata. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. (*), (**) e (***) representam diferença estatística em relação ao grupo controle para

valor de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.



Os resultados obtidos corroboram os estudos elaborados por Ribeiro et al. (2012), que avaliaram a atividade citotóxica de extratos de diversas partes de *H. speciosa* Gomes sobre linhagens tumorais de carcinoma de cólon (HCT-8), melanoma (MDA-MB-435) e glioblastoma (SF-295). Dentre os extratos das folhas, obtidos por extração metanólica, hexânica, e por partição de acetato de etil e de clorofórmio do extrato metanólico, nenhum apresentou efeito antiproliferativo à concentração de 50 µg/mL durante 72 h de incubação. Analogamente, o ensaio realizado por Endringer et al. (2009) com compostos bioativos isolados do extrato etanólico das folhas de *H. speciosa* à concentração final de 20 µg/mL também não demonstrou efeitos inibitórios sobre a proliferação de linhagens tumorais, dentre elas, a linhagem HepG2.

O método MTT é um dos mais amplamente utilizados para estudos de viabilidade celular, proliferação, quimio e radiosensibilidade *in vitro* (MOSMANN, 1983). Comparado a outros ensaios, ele apresenta vantagens como simplicidade e rapidez. Quando reduzido por desidrogenases e agentes redutores presentes em células metabolicamente ativas, o sal de MTT, hidrossolúvel e de cor amarelada, é transformado em um produto de formazan com coloração azul-violeta insolúvel em água. O meio de cultura é então removido e os depósitos de formazan são extraídos e avaliados colorimetricamente. A quantidade de cristais formados se correlaciona positivamente com o número de células e sua respectiva atividade, fazendo com que o valor da absorbância seja proporcional ao número de células sobreviventes (STOCKERT et al., 2018).

Para avaliação do efeito do extrato sobre o acúmulo de lipídios em doses seguras, as concentrações de 50 e 100 µg/mL foram escolhidas e utilizadas na coincubação com os ácidos graxos.

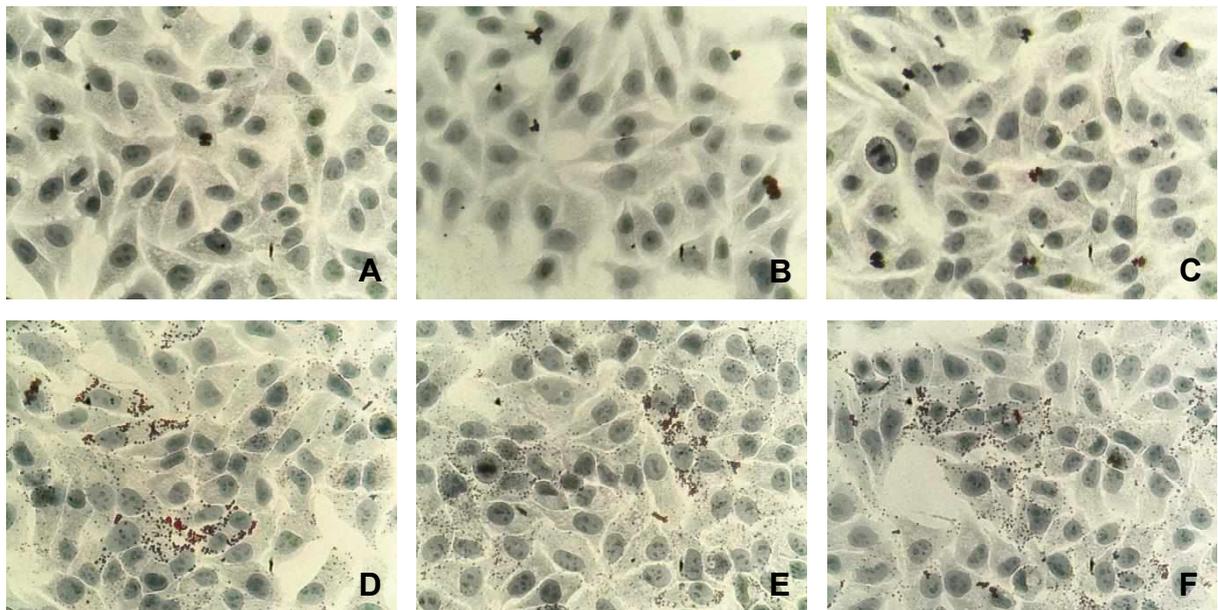
4.3 Indução da esteatose hepática

Neste estudo, o acúmulo de lipídios foi induzido em células HepG2 tratadas com a mistura dos ácidos palmítico e oleico. Além disso, foi realizada coloração com *Oil Red O*, que cora lipídios neutros de vermelho.

Como pode-se observar na figura 7, como esperado, um grande número de gotículas lipídicas coradas em vermelho estão dispostas no espaço intracelular das células tratadas com os ácidos graxos, o que demonstra a eficácia da incubação com os AG em induzir a esteatose. No entanto, ao microscópio não foram observadas diferenças na presença de gotículas

lipídicas nas células tratadas com os ácidos graxos em coincubação com o EAM nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 7 – Fotomicrografias representativas da coloração com *Oil Red O* e Hematoxilina de Meyer em células HepG2 no controle (A); controle coincubado com extrato aquoso das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (EAM) na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (B); e 100 $\mu\text{g/mL}$ (C); tratamento com ácidos graxos palmítico e oleico (AG) nas concentrações de 0,33 e 0,66 mM, respectivamente (D); e tratamento AG coincubado com EAM na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (E); e 100 $\mu\text{g/mL}$ (F). Lipídios intracelulares foram corados em vermelho. Aumento de 400 \times .



O modelo de esteatose utilizado foi baseado em estudos preliminares que apontam um claro aumento dose e tempo-dependente do acúmulo de lipídios em relação à mistura de ácidos graxos, que se mostra mais efetiva do que a utilização dos ácidos graxos individualmente (FARIA, 2020; GÓMEZ-LECHÓN et al., 2007). Gómez-Lechón et al. (2007) encontraram níveis intracelulares de lipídios em hepatócitos de cultura primária e células HepG2 bem próximos aos achados no fígado humano esteatótico após adição dos ácidos oleico e palmítico e definiram a concentração de 1 mM na proporção 2:1 como a condição mais promissora do modelo. Ambos são ácidos graxos livres de cadeia longa e os mais abundantes no fígado de indivíduos normais e de pacientes da MAFLD. Diversas pesquisas evidenciam um maior efeito esteatótico do ácido oleico em contraposição a um maior efeito apoptótico do ácido palmítico.

Alguns estudos têm reportado os efeitos inibitórios de moléculas antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, sobre o acúmulo de lipídios em hepatócitos. Foi

demonstrado que a rutina, um polifenol, pode reduzir significativamente a síntese de TAG e os níveis de colesterol. Em modelo da esteatose hepática em células HepG2, o extrato de mirtilo (*blueberry*) rico em compostos fenólicos demonstrou um efeito supressor do acúmulo de TAG.

Outro estudo realizado em condições semelhantes às desenvolvidas neste trabalho avaliou os efeitos da coincubação do extrato de *honeysuckle* (*Lonicera caerulea*) sobre a esteatose induzida em HepG2 (PARK et al., 2019). De modo análogo, as diferentes concentrações do extrato utilizadas não apresentaram alterações significativas na coloração com *Oil Red O*. No entanto, foi observada uma expressiva redução no conteúdo intracelular de TAG em relação ao modelo sem extrato, junto à redução significativa da expressão de RNA mensageiros de fatores de transcrição importantes na progressão da MAFLD, como SREBP-1c e PPAR- γ .

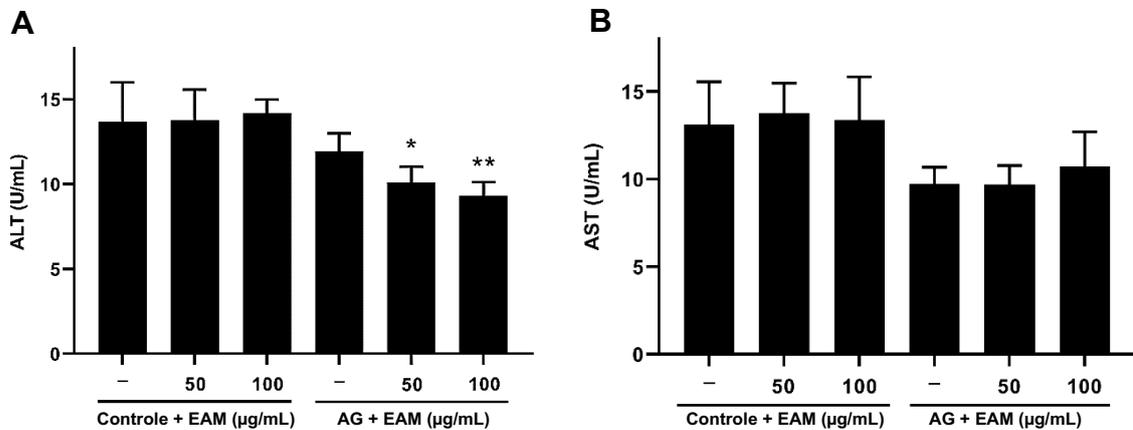
No robusto estudo realizado por Xia et al. (2019), a adição de um flavonoide isolado, a α -naftoflavona, promoveu reduções significativas e dose-dependentes no conteúdo de TAG e de colesterol total. Por outro lado, nenhuma alteração na análise espectrofotométrica do corante *Oil Red O* foi observada para os tratamentos. Além disso, análises de PCR em tempo real e *Western blotting* indicaram uma redução significativa na expressão de TNF- α a níveis pré e pós-traducionais. Outros ensaios demonstraram que a adição de α -naftoflavona pode ainda atenuar o estresse oxidativo e a resistência à insulina causados pela sobrecarga de lipídios. Assim, mais parâmetros são necessários para a avaliação do efeito de um produto natural sobre a esteatose hepática e condições adjacentes.

4.4 Determinação da atividade de aminotransferases

As aminotransferases ALT e AST são enzimas intracelulares encontradas em diversos órgãos, mas especialmente no fígado humano e sua liberação do espaço intracelular é indicativa de dano e morte hepatocelular. Por isso, a análise dos níveis séricos de ALT e AST é frequentemente utilizada no diagnóstico não invasivo de doenças hepáticas, incluindo a MAFLD (BROTOS e SIKARIS, 2013).

Como mostra a figura 8, os tratamentos com extrato nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ promoveram reduções significativas nos níveis de ALT no sobrenadante celular do grupo tratado com ácidos graxos. No entanto, não foram observadas alterações significativas nos níveis de AST.

Figura 8 – Níveis de alanina aminotransferase (A) e aspartato aminotransferase (B) no sobrenadante celular do tratamento controle e com ácidos graxos palmítico e oleico (AG) nas concentrações de 0,33 e 0,66 mM coincubados com o extrato aquoso das folhas de *H. speciosa* Gomes (EAM) nas concentrações de 0, 50 e 100 µg/mL em células da linhagem HepG2. Todas as análises foram feitas em quadruplicada. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. (*) e (**) representam diferença estatística em relação ao grupo controle para valores de $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente.



Estes resultados indicam que não houve dano significativo nas células com esteatose hepática, induzida por AG. Entretanto, a redução dos níveis de ALT observada na coincubação dos ácidos graxos com o EAM pode indicar um potencial efeito protetor contra o dano hepático. Diferentemente da AST, a ALT é encontrada unicamente no espaço citoplasmático e por isso estaria mais sujeita à ação do extrato que eventualmente é incorporado pelas células e cuja extensão não atinge organelas, como as mitocôndrias, onde a AST está mais presente. (BORLAK, CHOUGULE, SINGH, 2014).

Em estudo similar do modelo *in vitro* da esteatose hepática em células HepG2, Faria (2020) também não observou alteração significativa nos níveis de ALT e AST sobre concentrações de 1 e 2 mM dos ácidos oleico e palmítico (2:1). Concomitantemente, a viabilidade celular e citotoxicidade, determinadas pelos métodos MTT e da enzima lactato-desidrogenase, não sofreram alterações significativas em decorrência da sobrecarga lipídica. No entanto, foram observados níveis reduzidos de glutathione, o principal antioxidante produzido pelas células, indicando uma depleção dos sistemas de defesa antioxidante.

Em outro modelo da MAFLD na linhagem HepG2, pesquisadores verificaram que a condições de hiperglicemia (meio de cultura a 4,5 g/L), os níveis de ALT e ALP (fosfatase-alcalina), outra enzima marcadora de dano hepático, se encontravam significativamente elevados quando comparados à condição normoglicêmica (1 g/L), equivalentes à adotada neste trabalho (SU et al., 2019). Neste mesmo estudo, também foram avaliadas a

citotoxicidade e atividade metabólica através dos métodos da lactato-desidrogenase e MTT, nas quais não se observou nenhuma diferença significativa em ambos os tratamentos.

No estudo de Xia et al. (2019) citado anteriormente e que demonstrou resultados promissores da adição de α -naftoflavona sobre o modelo *in vitro* da esteatose hepática, reduções significativas foram também observadas nos níveis de ALT e AST em um caráter dose-dependente. No entanto, apesar de semelhante, este estudo apresenta várias divergências em relação ao trabalho discutido aqui, o que dificulta a extrapolação dos resultados. Dentre tais divergências, é possível destacar o desenho experimental da incubação de α -naftoflavona, que foi adicionada durante as 24h finais do tratamento de 48h com ácido oleico na concentração de 0,1 mM.

Neste trabalho, foi observado pela primeira vez o efeito *in vitro* das folhas de mangaba sobre a esteatose hepática. Ainda assim, é importante ressaltar que o efeito do extrato sobre o acúmulo de lipídios foi avaliado de maneira qualitativa e, por isso, estudos complementares precisam ser realizados para sua melhor compreensão e caracterização. São múltiplas as possibilidades de estudo de um possível agente terapêutico em modelos *in vitro*, como a aplicação de um tratamento anterior, simultâneo e posterior à indução do fenótipo da doença. Desse modo, torna-se ainda mais evidente a necessidade de se realizar ensaios adicionais para a análise de parâmetros mais robustos acerca do efeito do extrato sobre a esteatose induzida *in vitro* e o estresse oxidativo associado.

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o extrato aquoso das folhas de *H. speciosa* Gomes apresenta um alto potencial antioxidante *in vitro* sem alterar a viabilidade de células HepG2 em 12 e 24 horas. No entanto, não foram observadas diferenças na presença de gotículas lipídicas nas células com esteatose induzida por ácidos graxos após coincubação com o extrato. Ainda assim, o tratamento com o EAM reduziu significativamente os níveis de ALT, indicando um possível efeito hepatoprotetor. Para a continuidade do estudo, investigações mais robustas, como a análise quantitativa de lipídios e da expressão de moléculas e vias bioquímicas envolvidas no espectro da MAFLD, se fazem necessárias para a avaliação do potencial terapêutico das folhas de mangabeira.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. N. O domínio dos cerrados: introdução ao conhecimento. **Fundação Centro de Formação do Servidor Público**, v. 3, n.4, p. 41-55, 1983.
- ABDELMAGID, S. A.; CLARKE, S. E.; NIELSEN, D. E.; BADAWI, A.; EL-SOHEMY, A.; MUTCH, D. M.; MA, D. W. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p., 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0116195.
- ADEN, D. P.; FOGEL, A.; PLOTKIN, S.; DAMJANOV, I.; KNOWLES, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. **Nature**, v. 282, n. 5739, p. 615–616, 1979. DOI:10.1038/282615a0
- AGUIAR, L. M. S.; MACHADO, R. B.; MARINHO-FILHO, J. A diversidade biológica do Cerrado. In: Aguiar, L. M. S. & Camargo, A. J. A. InCerrado: ecologia e caracterização. Planaltina: Embrapa-CPAC, 2004.
- AGUILAR, T. A. F.; NAVARRO, B. C. H.; PÉREZ, J. A. M. **Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress**. Em: A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2. 2016. DOI: 10.5772/65715.
- ANGULO, P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1221–1231, 2002. DOI: 10.1056/nejmra011775
- ANGULO, P.; KLEINER, D. E.; DAM-LARSEN, S.; ADAMS, L. A.; BJORNSSON, E. S.; CHARATCHAROENWITTHAYA, P.; MILLS, P. R.; KEACH, J. C.; LAFFERTY, H. D.; STAHLER, A.; HAFLIDADOTTIR, S.; BENDTSEN, F. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Gastroenterology**, v.149, n. 2, p. 389–397, 2015. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.04.043.
- ASHRAF, N. U.; SHEIKH, T. A. Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. **Free Radical Research**, v. 49, n. 12, p. 1405-1418, 2015. DOI: 10.3109/10715762.2015.1078461.
- ASSUMPCÃO, C. F.; BACHIEGAI, P.; MORZELLEII, M. C.; NELSON, D. L.; NDIAYE, E. A.; RIOS, A. O. R.; SOUZA, E. C. Characterization, antioxidant potential and cytotoxic study of mangaba fruits. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1297-1303, 2014. DOI: 10.1590/0103-8478cr20130855
- AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WU, X.; PRIOR, R. L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6657–6662, 2003. DOI: 10.1021/jf034790i

AZEVEDO, T. R.; ROSA, M. R.; SHIMBO, J. Z.; MARTIN, E.V.; OLIVEIRA, M. G. Relatório Anual do Desmatamento no Brasil. São Paulo: MapBiomias, 2019. 49 p. Relatório. BASTOS, K.; DIAS, C., NASCIMENTO, Y.; DA SILVA; M., LANGASSNER, S.; WESSJOHANN, L.; TAVARES, J. Identification of Phenolic Compounds from *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) Leaves by UHPLC Orbitrap-HRMS. **Molecules**, v. 22(1), p. 143, 2017. DOI: 10.3390/molecules22010143

BENAM, K. H.; STEPHANIE DAUTH, S.; HASSELL, B.; HERLAND, A.; JAIN, A.; JANG, K. J.; KARALIS, K.; KIM, H. J.; MACQUEEN, L.; MAHMOODIAN, R.; MUSAH, S.; TORISAWA, Y.; VAN DER MEER, A. D.; VILLENAVE, R.; YADID, M.; PARKER, K. K.; INGBER, D. E. Engineered *in vitro* disease models. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, n. 1, p. 195–262, 2015. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012414-040418

BORLAK, J.; CHOUGULE, A.; SINGH, P. K. How useful are clinical liver function tests in *in vitro* human hepatotoxicity assays? **Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 784-795, 2014. DOI:10.1016/j.tiv.2014.03.006

BRANDÃO, G.C.; Kroon, E.G.; Santos, J.R.d.; Stehmann, J.R.; Lombardi, J.A.; Oliveira, A.B.D. Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil: Part 2. Screening Bignoniaceae species. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, p. 742–750, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Mapeamento do uso e cobertura da terra do Cerrado projeto TerraClass Cerrado 2013**. Brasília: MMA, 2015. Disponível em: <http://www.dpi.inpe.br/tccerrado/Metodologia_TCCerrado_2013.pdf> Acesso em: 13 nov. 2020.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **O Bioma Cerrado**. 2020. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente: **Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado**. Brasília, 2016. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/images/arquivo/80120/Anexo%20I%20-%20PLANO%20OPERATIVO%20DO%20PPCERRADO%20-%20GPTI%20_%20p%20site.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2020.

BROWNING, J. D.; HORTON, J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest**, v. 114, p. 147-152, 2004. DOI: 10.1172/JCI22422

BYRNE, C. D.; TARGHER, G. NAFLD: a multisystem disease. **J Hepatol**, v. 62, n., p. 47-64, 2015.

CAI, S.; HUANG, C.; JI, B.; ZHOU, F.; WISE, M. L.; ZHANG, D.; YANG, P. *In vitro* antioxidant activity and inhibitory effect, on oleic acid-induced hepatic steatosis, of fractions and subfractions from oat (*Avena sativa* L.) ethanol extract. **Food Chemistry**, v. 124, n., p. 900–905, 2010.

CAO, S. S.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 21, n. 3, p. 396-413, 2014.

CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J. E.; CHARLTON, M.; CUSI, K.; RINELLA, M.; HARRISON, S. A.; BRUNT, E. M.; SANYAL, A. J. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 4, p. 328–357, 2018. DOI: 10.1002/hep.29367.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. An introduction to free radical biochemistry. **British Medical Bulletin**, v. 49, n. 3, p. 481–493, 1993. DOI:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625

CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F.G.C. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste**. Brasília, DF: MMA, 2018. (Série Biodiversidade; 51). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/191191/1/Mangaba.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1519-1523, 2011.

DAMBACH, D.M.; ANDREWS, B.A.; MOULIN, F. New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: Use of in vitro models. **Toxicol. Pathol.**, v. 33, n., p. 17–26, 2005.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: A tale of two “hits”? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842–845, 1998. DOI: 10.1016/s0016-5085(98)70599-2

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, p. 1818-1892, 2013. DOI: 10.1089/ars.2012.4581

DONGIOVANNI, P.; LANTI, C.; RISO, P.; VALENTI, L. Nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. **J Nutr Biochem**, v. 29, n., p. 1-11, 2016. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2015.08.024

DOS SANTOS NEVES, J.; FRANCHIN, M.; ROSALEN, P.L.; OMAR, N.F.; DOS SANTOS, M.A.; PASCHOAL, J.A.R.; NOVAES, P.D. Evaluation of the osteogenic potential of *Hancornia speciosa* latex in rat calvaria and its phytochemical profile. **Journal of Ethnopharmacology**, v.183, p. 151–158, 2016.

EASL, EASD, EASO. European Association for the Study of the Liver, European Association for the Study of Diabetes, European Association for the Study of Obesity. Clinical Practice Guidelines for the management of nonalcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, v. 64, n., p. 1388–1402, 2016.

ENDRINGER, D. C.; PEZZUTO, J. M.; BRAGA, F. C. NF-κB inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 1064–1069, 2009. DOI:10.1016/j.phymed.2009.03.022

ESLAM, M., SANYAL, A. J., GEORGE, J. MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. **Gastroenterology**, 2020. DOI:10.1053/j.gastro.2019.11.312.

ESLAM, M.; NEWSOME, P. N.; SARIN, S. K.; QUENTIN, M. A.; TARGHER, G.; GOMEZ, M. R.; SAGI, S. Z.; WONG, V. W. S.; DUFOUR, J. F.; SCHATTENBERG, J. M.; KAWAGUCHI, T.; ARRESE, M.; VALENTI, L.; SHIHA, G.; TIRIBELLI, C.; YKI-JÄRVINEN, H.; FAN, J. G.; GRØNBÆK, H.; YILMAZ, Y.; PINTO, H. C.; OLIVEIRA, C. P.; BEDOSSA, P.; ADAMS, L. A.; ZHENG, M. H.; FOUAD, Y.; CHAN, W. K.; SANCHEZ, N. M.; AHN, S. H.; CASTERA, L.; BUGIANESI, E.; RATZIU, V.; GEORGE, J. A new definition for metabolic associated fatty liver disease: an international expert consensus statement. **Journal of Hepatology**, v. 73, n., p. 202-209, 2020. DOI:10.1016/j.jhep.2020.03.039

ESTES, C.; RAZAVI, H.; LOOMBA, R.; YOUNOSSI, Z.; SANYAL, A. J. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. **Hepatology**, v. 67, 1, p. 123-133, 2017.

FAN, C. Y.; PAN, J.; USUDA, N.; YELDANDI, A. V.; RAO, M. S.; REDDY, J. K. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase: implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. **J Biol Chem**, v. 273, n. 25, p. 15639-15645, 1998.

FARIA, B. Q. Padronização de um modelo in vitro da doença hepática gordurosa associada ao metabolismo e caracterização do estresse oxidativo. 2020. 55 f. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2020.

FERRAMOSCA, A.; DI GIACOMO, M.; ZARA, V. Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: New insights and updates. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 23, 4146-4157, 2017.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15558>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

GELLER, F.C.; TEIXEIRA, M.R.; PEREIRA, A.B.D.; DOURADO, L.P.A.; SOUZA, D.G.; BRAGA, F.C.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of the wound healing properties of *Hancornia speciosa* leaves. **Phyther. Res.**, v. 29, p.1887–1893, 2015.

GE, P. S.; RUNYON, B. A. Treatment of Patients with Cirrhosis. **The New England journal of medicine**, v. 375, n. 8, p. 767-777, 2016.

GOMES, W. F. **Estudo químico de recursos naturais renováveis do estado do Sergipe: *Hancornia speciosa* Gomes**. 198 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2010.

GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; DONATO, M. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, A.; JIMÉNEZ, N.; CASTELL, J. V.; O'CONNOR, J.E. A human hepatocellular in vitro model to investigate

steatosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 165, n. 2, p. 106–116, 2007.
DOI:10.1016/j.cbi.2006.11.004

GUO, L.; DIAL, S.; SHI, L..... Similarities and differences in the expression of drugmetabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. **Drug Metab Dispos**, v. 39, n., p. 528–538, 2011.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB J.**, v. 1, n., p. 358-364, 1987.

HAUGABOOK, S. J.; FERRER, M.; OTTINGER, E. A. *In vitro* and *in vivo* translational models for rare liver diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 2018. DOI:10.1016/j.bbadis.2018.07.029

HSU, C. L.; YEN, G. C. Effect of gallic acid on high fat dietinduced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n., p. 727–735, 2007.

HU, X. Y.; LI, Y.; LI, L. Q.; ZHENG, Y.; LV, J. H.; HUANG, S. C.; ZHANG, W.; LIU, L.; ZHAO L.; LIU, Z.; ZHAO, X. J. Risk factors and biomarkers of non-alcoholic fatty liver disease: an observational cross-sectional population survey. **BMJ Open**, v. 8, n. 4, p., 2018. DOI: 10.1136/ bmjopen-2017-019974

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4437–4444, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

ICMBio: Cadastro Nacional e Unidades de Conservação. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, DF. Disponível em:
<<https://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/cerrado>>. Acesso em: 26 jun. 2020.

INFANTE JP, HUSZAGH VA. Secondary carnitine deficiency and impaired docosahexaenoic (22: 6n-3) acid synthesis: a common denominator in the pathophysiology of diseases of oxidative phosphorylation and beta-oxidation. **FEBS Lett**, v. 468, n., p. 1-5, 2000. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01083-8

JAVITT, N. B. HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. **FASEB J**, v. 4, n., p. 161–168, 1990.

JIANG, X.; TANG, X.; ZHANG, P.; LIU, G.; GUO, H. Cyanidin-3-O-βglucoside protects primary mouse hepatocytes against high glucose-induced apoptosis by modulating mitochondrial dysfunction and the PI3K/Akt pathway. **Biochem Pharmacol**, v. 90, n., p. 135-144, 2014. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.04.018

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9, p. 1865–1879, 2006. DOI:10.1089/ars.2006.8.1865

KAKINO, S.; OHKI, T.; NAKAYAMA, H.; YUAN, X.; OTABE, S.; HASHINAGA, T.; WADA, N.; KURITA, Y.; TANAKA, K.; HARA, K.; SOEJIMA, E.; TAJIRI, Y.; YAMADA, K. Pivotal Role of TNF- α in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Murine Model. **Horm Metab Res**, v. 50, n. 1, p. 80-87, 2018.

KANURI, G.; BERGHEIM, I. *In vitro* and *in vivo* models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 11963–11980, 2013. DOI: 10.3390/ijms140611963

KARNIKOWSKI, M.; CÓRDOVA, C.; OLIVEIRA, R. J.; KARNIKOWSKI, M. G. O.; NÓBREGA, O. T. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. **Sao Paulo Med J.**, v. 125, 6, p. 333-7, 2007.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, p. 707-713, 2005.

KUPČOVÁ, V.; FEDELEŠOVÁ, M.; BULAS, J.; KOZMONOVÁ, P.; TURECKÝ, L. Overview of the pathogenesis, genetic, and non-invasive clinical, biochemical, and scoring methods in the assessment of NAFLD. **Int J Environ Res Public Health**, v. 16, n. 19, p. 3570, 2019. DOI: 10.3390/ijerph16193570.

LEONARDUZZI, G.; SCAVAZZA, A.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E.; CAMANDOLA, S.; VOGEL, S.; DARGEL, R.; POLI, G. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. **FASEB J.**, v. 11, n., p. 851-857, 1997. DOI: 10.1096/fasebj.11.11.9285483.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação de compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.).** 219 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIU, Y.; WANG, D.; ZHANG, D.; LV, Y.; WEI, Y.; WU, W.; ZHOU, F.; TANG, M.; MAO, T.; LI, M.; JI, B. Inhibitory Effect of Blueberry Polyphenolic Compounds on Oleic Acid-Induced Hepatic Steatosis in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 22, p. 12254–12263, 2011. DOI: 10.1021/jf203136j

LONARDO, A.; LORIA, P. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 36, n., p. 514-515. DOI: 10.1053/jhep.2002.34443.

LUDWIG, J.; VIGGIANO, T. R.; MCGILL, D. B.; OH, B. J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clin. Proc.**, v. 55, n., p. 434–438, 1980.

LUGRIN, J.; ROSENBLATT-VELIN, N.; PARAPANOV, R.; LIAUDET, L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biol Chem**, v. 395, n. 2, p. 203-230. 2014. DOI: 10.1515/hsz-2013-0241.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P.; CALDAS, E.; GONÇALVES, D.; SANTOS, N.; TABOR, K.; STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **Conservation International do Brasil**, Brasília, 2004.

MARCHESINI, G.; BRIZI, M.; MORSELLI-LABATE, A. M.; BIANCHI, G.; BUGIANESI, E.; MCCULLOUGH, A. J.; FORLANI, G.; MELCHIONDA, N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. **The American Journal of Medicine**, v. 107, n. 5, p. 450–455, 1999. DOI:10.1016/s0002

MARQUES, S.P.D.; DE OLIVEIRA, I.R.; OWEN, R.W.; TREVISAN, M.T.S. Antioxidant capacity, angiotensin I converting enzyme (ACE) and acetylcholinesterase inhibition by extracts of the leaves and bark of *Hancornia speciosa* Gomes. **Hum. J.**, v. 4, p.171–183, 2015.

MAULIK, N.; MCFADDEN, D.; OTANI, H.; THIRUNAVUKKARASU, M.; PARINANDI, N. L. Antioxidants in Longevity and Medicine. Editorial, 3 p. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013. DOI:10.1155/2013/820679

MCMILLIAN, M. K.; GRANT, E. R.; ZHONG, Z.; PARKER, J. B.; LI, L.; ZIVIN, R. A.; BURCZYNSKI, M. E.; JOHNSON, M. D. (2001). Nile red binding to HepG2 cells: an improved assay for in vitro studies of hepatosteatosis. **In vitro & molecular toxicology**, v. 14, n. 3, p. 177–190, 2001. DOI:10.1089/109793301753407948

MEIER, M.; KLEIN, H. H.; KRAMER, J.; DRENCKHAN, M.; SCHUTT, M. Calpain inhibition impairs glycogen syntheses in HepG2 hepatoma cells without altering insulin signaling. **Journal of Endocrinology**, v. 193, n.1, p. 45–51, 2007. DOI:10.1677/joe.1.07087.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JUNIOR, M.C.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E. & FAGG, C.W. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. p. 423-1279. In: S.M. Sano; Almeida, S.P. & J.F. Ribeiro (eds.). Cerrado: ecologia e flora. v. 2. Brasília, Embrapa Informação e Tecnologia, 2008.

MESQUITA, M. L. de; PAULA, J. E. de; PESSOA, C.; MORAES, M. O. de; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439-445, 2009.

MILLER, D. M.; BUETTNER, G. R.; AUST, S. D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. **Free Radic.Biol.Med.**, v. 8, n., p. 95-108, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. DOI:10.1016/0022-1759(83)90303-4

NCI, National Cancer Institute. EUA, 2015. Division of Cancer Treatment and Diagnosis. Disponível em: <https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm>. Acesso em: 26 out. 2020.

OLIVEIRA, C. R.; MENEZES, A. C. S.; MORAES, M. O.; VIEIRA, L. M.; PEREIRA, A. G., LIMA, R. S.; SANTOS, M. L. 2012. Avaliação citotóxica em três linhagens de células

tumorais das frações obtidas da casca do caule de *Salacia crassifolia* (MART. ex. Schult.) G. Dom. (Celastraceae). **Revta. Colomb. Cienc. Quím. Farm**, v. 41, n. 2, p. 133-142, 2012.

PARADIES, G.; PETROSILLO, G.; PISTOLESE, M.; RUGGIERO, F. M. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. **Gene**, v. 286, p. 135-141, 2002. DOI: 10.1016/S0378-1119(01)00814-9

PEREIRA, A.B.D. **Contribuição para a padronização química de *Hancornia speciosa* Gomes: desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação de marcadores químicos**. 2012. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PEREIRA, A.C.; PEREIRA, A.B.; MOREIRA, C.C.L.; BOTION, L.M.; LEMOS, V.S.; BRAGA, F.C.; CORTES, S.F. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. **J. Ethnopharmacol.**, v. 161, p. 30–35, 2015.

PERFEITO, D. G. A. **Processamento da polpa de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2014. 194 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2014.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005. DOI: 10.1021/jf0502698

PUBCHEM. **Trolox**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trolox>>. Acesso em: 28 out. 2020.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A Colorimetric Method for the Determination of Serum Glutamic Oxalacetic and Glutamic Pyruvic Transaminases. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 28, n. 1, p. 56-63, 1957. DOI: 10.1093/ajcp/28.1.56

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As Principais Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de; RIBEIRO, J. F. (Ed.). **Cerrado: ecologia e flora**, v. 2. 876 p. Brasília: EMBRAPA-CERRADOS, 2008.

RIBEIRO, S. S.; DE JESUS, A. M.; DOS ANJOS, C. S.; DA SILVA, T. B.; SANTOS, A. D. C.; DE JESUS, J. R.; ANDRADE, M. S.; SAMPAIO, T. S.; GOMES, W. F.; ALVES, P. B.; CARVALHO, A. A.; PESSOA, C.; MOARES, M. O.; PINHEIRO, M. L. B.; PRATA, A. P. N.; BLANK, A. F.; MANN, R. S.; MOARES, V. R. S.; COSTA, E. V. NOGUEIRA, P. C. L.; BEZERRA, D. Evaluation of the Cytotoxic Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. **Planta Med**, v. 78, n. 14, p. 1601–1606, 2012. DOI:10.1055/s-0032-1315043

RUFINO, M. DO S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18

non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.01.037

SANYAL, A. J.; CHALASANI, N.; KOWDLEY, K. V.; MCCULLOUGH, A.; DIEHL, A. M.; BASS, N. M.; TETRI, B. A. N.; LAVINE, J. E.; TONASCIA, J.; UNALP, A.; NATTA, M. V.; CLARK, J.; BRUNT, E. M.; KLEINER, D. E.; HOOFNAGLE, J. H.; ROBUCK, P. R. Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n., p. 1675-1685, 2010. DOI: 10.1056/NEJMoa0907929.

SARSOUR, E. H.; KUMAR, M. G.; CHAUDHURI, L.; KALEN, A. L.; GOSWAMI, P. C. Redox control of the cell cycle in health and disease. **Antioxid. Redox. Signal**, v. 11, n., p. 2985-3011, 2009.

SCHATTENBERG, J. M.; GALLE, P. R. Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man. **Digestive Diseases**, v. 28, n. 1, p. 247–254, 2010. DOI: 10.1159/000282097

SEOK, J.; WARREN, H. S.; CUENCA, A. G.; MINDRINOS, M. N.; BAKER, H. V.; XU, W. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 9, p. 3507–3512, 2013. DOI:10.1073/pnas.1222878110

SILVA, E.; SOUZA, J.; ROGEZ, H.; REES, J.-F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007.

SILVA, G.C.; BRAGA, F.C.; LEMOS, V.S.; CORTES, S.F. Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. **Phytomedicine**, v. 23, p. 214–219, 2016.

SILVA, G.C.; BRAGA, F.C.; LIMA, M.P.; PESQUERO, J.L.; LEMOS, V.S.; CORTES, S.F. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, p. 709–713, 2011.

SILVA, M.A.B.; MELO, L.V.L.; RIBEIRO, R.V.; SOUZA, J.P.M.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O.; SILVA, R.M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p.549-562, 2010.

SINGAL, A. K.; BATALLER, R.; AHN, J.; KAMATH, P. S.; SHAH, V. H. ACG clinical guideline: alcoholic liver disease. **Am J Gastroenterol**, v. 113, n., p. 175-194, 2018.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1790, n., p. 1478-85, 2009.

STOCKERT, J. C.; HOROBIN, R. W.; COLOMBO, L. L.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 3, p. 159-167, 2018.

SUMIDA, Y.; NIKI, E.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. **Free Radic Res**, v. 47, p. 869-880, 2013. DOI: 10.3109/10715762.2013.837577

TSUCHIDA, T.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 7, p. 397-411, 2017.

VAN DE WIER, B.; KOEK, G. H.; BAST, A.; HAENEN, G. R. The potential of flavonoids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 57, n., p. 834-855, 2017. DOI: 10.1080/10408398.2014.952399

VAZQUEZ I. N.; VELEDO, S. F.; KRAMER, D. K.; BEDMAR, R. V.; GUERRA, L. G.; LORENZO, L. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. **Arch Physiol Biochem**, v. 114, n. 3, p. 183-194, 2008. DOI: 10.1080/13813450802181047

XIE, Y.; CHEN, X. Structures required of polyphenols for inhibiting advanced glycation end products formation. **Curr Drug Metab**, v. 14, n., p. 414-431, 2013. DOI: 10.2174/1389200211314040005

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y.; HENRY, L.; WYMER, M.. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence and outcomes. **Hepatology**, v. 64, p. 73-84, 2016.

YU, Y.; PING, J.; CHEN, J.; JIAO, L.; ZHENG, S.; HAN, Z. G.; HAO, P.; HUANG, J. A comparative analysis of liver transcriptome suggests divergent liver function among human, mouse and rat, **Genomics**, v. 96, n., p. 281- 289, 2010.

ZHOU, J. H.; CAI, J. J.; SHE, Z. G.; LI, H. L. Noninvasive evaluation of nonalcoholic fatty liver disease: Current evidence and practice. **World J. Gastroenterol**, v. 25, n., p. 1307-1326, 2019. DOI: 10.3748/wjg.v25.i11.1307.