

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ICBIM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
ESTRUTURAL APLICADAS – PPGBC

JOED PIRES DE LIMA JÚNIOR

*Anacardium humile* COMO UMA NOVA FONTE DE MOLÉCULAS  
ANTIOXIDANTES, ANTIGLICANTES E INIBIDORAS DE  $\alpha$ -AMILASE  
COM POTENCIAL PARA O CONTROLE DO ESTRESSE OXIDATIVO E  
DO DIABETES MELLITUS

UBERLÂNDIA

2021

JOED PIRES DE LIMA JÚNIOR

*Anacardium humile* COMO UMA NOVA FONTE DE MOLÉCULAS  
ANTIOXIDANTES, ANTIGLICANTES E INIBIDORAS DE  $\alpha$ -AMILASE  
COM POTENCIAL PARA O CONTROLE DO ESTRESSE OXIDATIVO E  
DO DIABETES MELLITUS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

UBERLÂNDIA

2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

L732 2021	<p>Lima Júnior, Joed Pires de, 1994- Anacardium humile como uma nova fonte de moléculas antioxidantes, antiglicantes e inibidoras de a-amilase com potencial para o controle do estresse oxidativo e do diabetes mellitus [recurso eletrônico] / Joed Pires de Lima Júnior. - 2021.</p> <p>Orientador: Foued Salmen Espindola. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.453">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.453</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Citologia. I. Espindola, Foued Salmen ,1957-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 576.3</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural  
 Aplicadas

Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 004/2021, do PPGBC				
Data:	13/08/2021	Hora de início:	[hh:mm] 14:05	Hora de encerramento:	16:40h
Matrícula do Discente:	11912BCE002				
Nome do Discente:	Joed Pires de Lima Júnior				
Título do Trabalho:	Anacardium humile como uma nova fonte de moléculas antioxidantes, antiglicantes e inibidoras de $\alpha$ -amilase com potencial para o controle do estresse oxidativo e do diabetes				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Produtos naturais; Diabetes; Estresse oxidativo; Biologia molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	-				

Reuniu-se de forma Virtual, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: os Doutores: **Prof. Anderson Luiz Ferreira – UFCat; Allisson Benatti Justino – UFU e Prof. Foued Salmen Espindola – UFU**, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). **Foued Salmen Espindola**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

**Aprovado**

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Foued Salmen Espíndola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 13/08/2021, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **ANDERSON LUIZ FERREIRA, Usuário Externo**, em 13/08/2021, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Allisson Benatti Justino, Usuário Externo**, em 13/08/2021, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2969003** e o código CRC **0AC684A0**.

---

## AGRADECIMENTOS

Expresso aqui meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente nesse grandioso caminho de aprendizado que consistiu o meu mestrado, desde o primeiro momento, de chegada em uma nova cidade, uma nova universidade, novos colegas e amigos, até os últimos detalhes da correção deste trabalho. Gostaria de manifestar todo o meu carinho àqueles que fizeram parte dessa jornada, em especial:

Aos meus pais, Lucrécia e Joed, pela educação e valores a mim passados, sendo parte crucial da formação do sujeito que aqui vos escreve.

Às minhas irmãs Amanda e Lívia, pela parceria e colaboração, tornando mais leve o caminho até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, que demonstrou toda sua grandeza como profissional e pessoa neste tempo de parceria. Agradeço a confiança depositada em mim e ao meu trabalho. Foi uma honra partilhar este momento com um profissional tão competente e atencioso.

Ao Me. Rodrigo Rodrigues Franco, um grande professor que não mediu esforços para transmitir seus conhecimentos sobre as técnicas e protocolos do laboratório, bem como todo seu saber científico. Sem dúvidas, a conclusão do presente trabalho só foi possível graças ao incalculável esforço e dedicação deste incrível profissional. Sentirei falta dos momentos divertidos que passamos juntos. De fato, demos boas risadas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI), pela parceria e companheirismo. Sentirei saudades do ‘grupo fitness’ e das partidas de vôlei ao final da tarde.

Aos meus poucos, porém valorosos, amigos da vida, pelos momentos de distração, pelo apoio e por serem um acalento em momentos obscuros.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas (PPGBC) pelo apoio e oportunidades a mim oferecidas.

À Profa. Izabela Barbosa Moraes (Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB) pela coleta e processamento das folhas de *Anacardium humile*.

Aos membros da banca Dr. Allisson Benatti Justino e Dr. Anderson Luiz Ferreira por se dispuserem a participar deste momento de conclusão de mais um ciclo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, permitindo a minha dedicação integral aos estudos e a pesquisa.

*“Afinal, o que que te causa? O que faz causa da sua vida? O que te move? O que ecoa em você? O que ressoa? A partir dessa pedrinha, desse grão de areia, se forma a pérola. É o mais interessante e é o que nos resta, talvez. É preciso alguma coragem para querer viver.”*

**Maria L. Homem – Psicanalista/Escritora**

## RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica de grande interesse médico e tem sido considerada um grave problema de saúde pública em todo o mundo. A utilização de produtos naturais para o tratamento de doenças é uma prática milenar e pode ser considerada uma alternativa conveniente para o controle do diabetes e suas complicações. *Anacardium humile* é uma planta típica do Cerrado brasileiro utilizada na medicina popular em razão de suas propriedades antidiarreica, expectorante, antidiabética e anti-inflamatória. No entanto, são escassos os estudos que abordam as propriedades biológicas desta espécie. Este estudo teve como objetivo analisar *in vitro* e *ex vivo* a capacidade antioxidante e antiglicante do extrato etanólico de *A. humile*, suas frações orgânicas e três moléculas (catequina, quercetina e ácido gálico – CQA), seus potenciais para inibir as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, como também seus efeitos citotóxicos em macrófagos RAW 264,7. A metodologia adotada consistiu na obtenção do extrato etanólico de *A. humile* e suas frações orgânicas que foram testadas, juntamente a CQA, quanto suas atividades antioxidante, antiglicante e inibitória de enzimas envolvidas da digestão de carboidratos. Além disso, CQA e as três frações de *A. humile* que demonstraram os melhores resultados frente aos testes supracitados, foram testadas quanto suas capacidades de inibir a oxidação em tecido hepático. Ainda, os compostos bioativos presentes nas frações das folhas de *A. humile* foram elucidados por análise em HPLC-ESI-MS/MS. As análises mostraram notável atividade antioxidante nas frações DCM ( $1264,85 \pm 76,90 \mu\text{mol ET/g ORAC}$ ;  $216,71 \pm 1,04 \mu\text{mol ET/g FRAP}$  e  $\text{IC}_{50} 3,03 \pm 0,08 \mu\text{g/mL DPPH}$ ) e AcOEt ( $1300,11 \pm 33,04 \mu\text{mol ET/g ORAC}$ ;  $236,21 \pm 23,86 \mu\text{mol ET/g FRAP}$  e  $\text{IC}_{50} 3,03 \pm 0,14 \mu\text{g/mL DPPH}$ ), e em CQA, principalmente no ácido gálico ( $1291,19 \pm 8,41 \mu\text{mol ET/g ORAC}$ ;  $1103,52 \pm 31,48 \mu\text{mol ET/g FRAP}$  e  $\text{IC}_{50} 0,78 \pm 0,11 \mu\text{g/mL DPPH}$ ). Quanto à atividade antiglicante, as amostras à concentração de  $40 \mu\text{g/mL}$  inibiram mais de 88% da glicação no método BSA/FRU. Nos métodos BSA/MGO e ARG/MGO, catequina e as frações Hex, DCM e AcOEt obtiveram os melhores resultados. Somente CQA apresentaram resultados significativos no modelo LYS/MGO. Todas as frações, exceto Hex, inibiram significativamente a enzima  $\alpha$ -amilase ( $\text{IC}_{50}$  DCM  $0,56 \pm 0,10$ ; AcOEt  $0,84 \pm 0,01$ ; ButOH  $0,74 \pm 0,03$  e H<sub>2</sub>O  $0,79 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ ). A inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase só foi observada na fração AcOEt ( $\text{IC}_{50} 275,40 \pm 12,31 \mu\text{g/mL}$ ). Testes com tecido hepático revelaram notório potencial de CQA e das frações DCM, AcOEt e ButOH para inibir a produção de EROs e a peroxidação lipídica, além de preservar grupos tióis. Moléculas de grande potencial antioxidante como catequina, quercetina, ácido gálico, kaempferol, luteolina e  $\beta$ -criptoxantina, foram identificadas nas frações. Dessa forma, conclui-



se que as frações do extrato etanólico de *A. humile* apresentam atividades antioxidante e antiglicante promissoras, além de proeminente capacidade para inibir a enzima  $\alpha$ -amilase. Assim, este estudo apresenta novas informações e estimula futuras pesquisas que possam elucidar as propriedades biológicas de *A. humile* e seu potencial para controlar DM e suas complicações.

**Palavras-chave:** Diabetes *mellitus*. Estresse oxidativo. *Anacardium humile*.

## ABSTRACT

Diabetes *mellitus* (DM) is a chronic disease of great medical interest and it has been considered a serious public health problem worldwide. The use of natural products to treat diseases is an ancient practice and can be considered a convenient alternative for controlling diabetes and its complications. *Anacardium humile* is a typical plant from the Brazilian savanna used in folk medicine due to its anti-diarrheal, expectorant, anti-diabetic and anti-inflammatory properties. However, few studies address the biological properties of this species. This study aimed to analyze *in vitro* and *ex vivo* the antioxidant and antiglycant capacity of the ethanolic extract of *A. humile*, its organic fractions and three molecules (catechin, quercetin and gallic acid - CQA), their potential to inhibit the enzymes  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase, as well as their cytotoxic effects on RAW 264.7 macrophages. The adopted methodology consisted of obtaining the ethanolic extract of *A. humile* and its organic fractions, which were tested, together with CQA, for their antioxidant, antiglycant and glycolytic enzyme inhibitory activities. In addition, CQA and the three *A. humile* fractions that showed the best results in the abovementioned assays were tested for their ability to inhibit oxidation in liver tissue. Furthermore, the bioactive compounds present in the fractions of *A. humile* leaves were elucidated by HPLC-ESI-MS/MS analysis. The analyses showed remarkable antioxidant activity in DCM ( $1264.85 \pm 76.90$   $\mu\text{mol ET/g ORAC}$ ;  $216.71 \pm 1.04$   $\mu\text{mol ET/g FRAP}$  and  $\text{IC}_{50}$   $3.03 \pm 0.08$   $\mu\text{g/mL DPPH}$ ) and AcOEt ( $1300.11 \pm 33.04$   $\mu\text{mol ET/g ORAC}$ ;  $236.21 \pm 23.86$   $\mu\text{mol ET/g FRAP}$  and  $\text{IC}_{50}$   $3.03 \pm 0.14$   $\mu\text{g/mL DPPH}$ ) fractions, and in CQA, mainly in gallic acid ( $1291.19 \pm 8.41$   $\mu\text{mol ET/g ORAC}$ ;  $1103.52 \pm 31.48$   $\mu\text{mol ET/g FRAP}$  and  $\text{IC}_{50}$   $0.78 \pm 0.11$   $\mu\text{g/mL DPPH}$ ). As for the antiglycant activity, the samples at the concentration of  $40$   $\mu\text{g/mL}$  inhibited more than 88% of the glycation in the BSA/FRU method. In the BSA/MGO and ARG/MGO methods, catechin and the Hex, DCM and AcOEt fractions obtained the best results. Only CQA showed significant results in the LYS/MGO model. All fractions, except Hex, significantly inhibited the  $\alpha$ -amylase enzyme ( $\text{IC}_{50}$  DCM  $0.56 \pm 0.10$ ; AcOEt  $0.84 \pm 0.01$ ; ButOH  $0.74 \pm 0.03$  and  $\text{H}_2\text{O}$   $0.79 \pm 0.06$   $\mu\text{g/mL}$ ). Inhibition of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme was only observed in the AcOEt fraction ( $\text{IC}_{50}$   $275.40 \pm 12.31$   $\mu\text{g/mL}$ ). Tests with liver tissue revealed a notorious potential of the DCM, AcOEt and ButOH fractions, as well as CQA, to inhibit the production of ROS and lipid peroxidation, in addition to preserving thiol groups. Molecules with great antioxidant potential such as catechin, quercetin, gallic acid, kaempferol, luteolin and  $\beta$ -cryptoxanthin were identified in the fractions. In conclusion, the ethanolic extract fractions of *A. humile* present promising antioxidant and antiglycant activities, in addition to a prominent capacity to inhibit the  $\alpha$ -amylase enzyme.

Thus, this study presents new information and encourages further research to elucidate the biological properties of *A. humile* and its potential to control DM and its complications.

**Key-words:** Diabetes *mellitus*. Oxidative stress. *Anacardium humile*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Processo de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs).....	23
Figura 2 – Rendimento do EE-Ah e de suas frações orgânicas .....	46
Tabela 1 – Conteúdo de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados em EE-Ah e suas frações orgânicas .....	47
Figura 3 – Análise da inibição das enzimas $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -glicosidase por EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA .....	48
Figura 4 – Potencial antiglicante de EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA .....	49
Figura 5 – Potencial antioxidante de EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA .....	50
Figura 6 - Avaliação das propriedades antioxidantes das frações orgânicas de <i>A. humile</i> e CQA em ensaio <i>ex vivo</i> de estresse oxidativo em tecido hepático .....	52
Figura 7 – Viabilidade celular das frações DCM, AcOEt e ButOH, e de CQA .....	53
Figura 8 – Moléculas de importante potencial antioxidante encontradas nas frações de DCM, AcOEt e ButOH por HPLC-ESI-MS/MS .....	54
Tabela 2 – Compostos identificados nas frações DCM, AcOEt e ButOH do extrato etanólico das folhas de <i>A. humile</i> por HPLC-ESI-MS/MS.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Ångström
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AcOEt	Fração de acetato de etila
AGEs	Produtos finais de glicação avançada ( <i>Advanced glycation end products</i> )
AG-f	Fração enriquecida com $\alpha$ -glicosidase do pó cetônico de rato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ARG	Arginina
ASC	Área sob a curva
BSA	Albumina de soro bovino
ButOH	Fração de n-butanol
CAT	Catalase
CEL	N <sup>ε</sup> -(carboxietil)-lisina
CEUA	Comissão de ética na utilização de animais
CML	N <sup>ε</sup> -(carboximetil)lisina
CQA	Catequina, quercetina e ácido gálico
DCFH-DA	Dicloro-dihidro-fluoresceína
DCM	Fração de diclorometano
DCV	Doenças cardiovasculares
DHAP	Di-hidroxiacetona
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMEM	Meio eagle modificado por dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT1	Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1
DMT2	Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 2
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DRC	Doença renal crônica
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC	Equivalente de catequina
ECRs	Espécies carbonilas reativas

EE-Ah	Extrato etanólico de <i>Anacardium humile</i>
EGCG	Epigallocatequina-galato
EQ	Equivalente de quercetina
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET	Equivalente de Trolox
EUA	Estados Unidos da América
eV	Elétron-volt
FRAP	Capacidade de redução do ferro ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> )
FRU	Frutose
g	Gramma
GalG2CNP	2-cloro-4-nitrofenil-4-β-D galactopiranosilmaltosídeo
GLT	Glutathione
GLUT4	Transportador de glicose 4
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSH	Glutathione oxidada
H <sub>2</sub> O	Fração de água
Hex	Fração de hexano
HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa com ionização por eletrospray ( <i>High Performance Liquid Chromatography/ Electro spray Ionization Tandem Mass Spectrometry</i> )
HSA-f	Fração enriquecida com α-amilase
IC <sub>50</sub>	Metade da concentração inibitória máxima
IDF	Federação Internacional do Diabetes ( <i>International Diabetes Federation</i> )
kV	Quilovolt
L	Litro
LYS	Lisina
m/z	Massa/carga do íon molecular
MES	Ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico
mg	Miligrama
MG-H1	Hidroimidazolona 1
MGO	Metilglioxal

mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica ( <i>non-alcoholic fatty liver disease</i> )
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica ( <i>non-alcoholic steatohepatitis</i> )
°C	Graus Celsius
ORAC	Capacidade de sequestro do radical peróxil ( <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> )
PA	Porcentagem de atividade
PBS	Tampão fosfato-salino
PKC	Proteína quinase C
p-NPG	4-nitrofenil $\alpha$ -D-glicopiranosídeo
PNPMF	Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos
Q-TOF	<i>Quadrupole time of flight</i>
RAGE	Receptor para os produtos finais de glicação avançada ( <i>Receptor for advanced glycation end products</i> )
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema único de saúde
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
THO	Tecido hepático oxidado
THP	Tetrahidropirimidina
TPTZ	2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazina
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Diabetes <i>mellitus</i> e suas complicações.....	19
2.2	Estresse oxidativo e diabetes <i>mellitus</i> .....	21
2.3	Diabetes <i>mellitus</i> e enzimas envolvidas na digestão de carboidratos.....	25
2.4	Danos em tecido hepático relacionados ao diabetes <i>mellitus</i> e ao estresse oxidativo...	26
2.5	Uso de plantas medicinais no controle do diabetes <i>mellitus</i> e do estresse oxidativo....	27
2.6	<i>Anacardium humile</i> .....	32
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Objetivos gerais.....	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Coleta e identificação do material vegetal.....	35
4.2	Preparação do extrato e frações das folhas de <i>A. humile</i> .....	35
4.3	Prospecção fitoquímica.....	36
4.3.1	Determinação do conteúdo de flavonoides .....	36
4.3.2	Determinação do conteúdo de taninos condensados.....	36
4.3.3	Determinação do conteúdo de fenóis totais.....	37
4.4	Análise de inibição enzimática.....	37
4.4.1	Inibição da $\alpha$ -amilase.....	37
4.4.2	Inibição da $\alpha$ -glicosidase.....	38
4.5	Análise da inibição da formação de AGEs.....	38
4.5.1	Modelo BSA-Frutose.....	39
4.5.2	Modelo BSA-Metilglioxal.....	39
4.5.3	Modelo Arginina-Metilglioxal.....	39
4.5.4	Modelo Lisina-Metilglioxal.....	40
4.6	Atividade antioxidante.....	40



4.6.1	ORAC.....	40
4.6.2	FRAP.....	41
4.6.3	DPPH.....	41
4.7	Análise <i>ex vivo</i> em tecido hepático.....	42
4.7.1	Processamento do tecido hepático.....	42
4.7.2	Atividade antioxidante (FRAP).....	42
4.7.3	Inibição da peroxidação lipídica.....	43
4.7.4	Conteúdo de grupos tióis.....	43
4.7.5	Inibição da produção de EROs.....	43
4.8	Viabilidade celular.....	44
4.9	Análise por HPLC-ESI-MS/MS.....	44
4.10	Análise estatística.....	45
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Rendimento do extrato e frações.....	46
5.2	O extrato das folhas de <i>A. humile</i> e suas frações orgânicas apresentam notável quantidade de fenóis totais e flavonoides.....	46
5.3	<i>A. humile</i> apresenta potencial inibitório frente a enzima $\alpha$ -amilase.....	47
5.4	O extrato de <i>A. humile</i> e suas frações orgânicas diminuem a glicação proteica e a formação de AGEs.....	48
5.5	Potencial antioxidante do extrato das folhas de <i>A. humile</i> e de suas frações orgânicas.....	49
5.6	O extrato de <i>A. humile</i> e suas frações orgânicas preservam grupos tióis e previnem a peroxidação lipídica e a produção de EROs em tecido hepático.....	51
5.7	O extrato de <i>A. humile</i> e suas frações orgânicas não apresentam citotoxicidade em macrófagos RAW 264,7.....	52
5.8	Análise do extrato etanólico de <i>A. humile</i> e de suas frações orgânicas por HPLC-ESI-MS/MS.....	53
6	DISCUSSÃO.....	57
7	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE A – Material suplementar.....	86

## 1 INTRODUÇÃO

A hiperglicemia bem como o estresse oxidativo e a glicação proteica são fatores de crucial importância no desenvolvimento do diabetes *mellitus* do tipo 2 (DMT2) e de suas complicações (NOWOTNY et al., 2015). A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), fortemente associado à hiperglicemia, está intimamente relacionado à deficiência na secreção de insulina e a resistência a esse hormônio, produção irregular de glicose hepática, estresse dicarbonil e liberação de mediadores inflamatórios (MEY; HAUS, 2018; NEWSHOLME et al., 2016; REHMAN; AKASH, 2017). Além disso, a produção de EROs favorece o surgimento de produtos finais de glicação avançada (AGEs – do inglês *advanced glycation end products*). Este grupo de compostos heterogêneos, formado excessivamente sob condições hiperglicêmicas, tem papel fundamental na resistência à insulina, disfunção e morte de células  $\beta$ -pancreáticas e no surgimento de complicações advindas do DMT2, como a nefro e retinopatia diabética, doenças isquêmicas do coração e aterosclerose (NOWOTNY et al., 2015).

A alta prevalência de DMT2 no mundo todo e a consequente mortalidade e comorbidade causada pela doença têm levantado esforços na busca de tratamentos efetivos que possam prevenir ou atenuar os efeitos danosos provocados pela enfermidade (KAHN; COOPER; DEL PRATO, 2014). Por séculos as plantas medicinais têm sido empregadas para o tratamento do diabetes *mellitus* e, atualmente, a medicina tradicional é frequentemente empregada como terapia complementar para o controle e gerenciamento do DMT2 e de suas complicações, visto que estes produtos naturais possuem propriedades antidiabéticas, além de baixos níveis de toxicidade (FRANCO et al., 2018; OTA; ULRICH, 2017).

*Anacardium humile* St. Hil (Anacardiaceae), popularmente conhecido como cajuí, cajuzinho-do-mato ou cajuzinho-do-cerrado é uma planta encontrada majoritariamente no Cerrado brasileiro e é comumente utilizada na medicina popular devido suas propriedades antidiabética, anti-inflamatória, anticâncer e antidiarreica (LUIZ-FERREIRA et al., 2008; URZÊDA et al., 2013). Alguns estudos já revelaram o potencial de *A. humile* para controlar os níveis de glicose sanguínea (URZÊDA et al., 2013) e de diminuir processos de oxidação e a produção de radicais livres (PORTO et al., 2016). Além disso, autores como Royo e outros (2015), Pereira e outros (2011) e Luiz-Ferreira e outros (2010) revelaram o potencial antifúngico, bactericida e gastroprotetor de *A. humile*.

Moléculas encontradas em plantas medicinais como os polifenóis, flavonoides, ácidos fenólicos e terpenos têm se mostrado como importantes protagonistas no tratamento de doenças metabólicas como o DMT2. Dentre as propriedades destas moléculas, destacam-se o potencial para reduzir a glicação proteica (PATIL; MESHARAM; GACCHE, 2016; PIWOWAR; RORBACH-DOLATA; FECKA, 2019), inibir enzimas relacionadas à digestão de carboidratos como  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (JIANG et al., 2017; JUSTINO et al., 2020), e diminuir o estresse oxidativo, agindo como *scavengers* de radicais livres (GONZÁLEZ-BURGOS; GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012; VAN HUNG, 2016). Todas essas características contribuem para explicar o notório potencial terapêutico observado nesses produtos naturais. Segundo Royo e outros (2015), *A. humile* possui em sua composição flavonoides, alcaloides, taninos e terpenos. Além disso, Luiz-Ferreira e outros (2008) identificaram no extrato metanólico de *A. humile* moléculas de grande potencial antioxidante e antiglicante como catequina, quercetina e ácido gálico.

Embora *A. humile* seja conhecida popularmente pelos seus atributos medicinais, poucos estudos se empenharam em identificar as propriedades biológicas e farmacológicas desta planta. Por este motivo, o presente trabalho objetiva investigar o potencial antidiabético do extrato etanólico de *A. humile*, de suas frações orgânicas e de três moléculas (adquiridas comercialmente) encontradas nas frações por análise de espectrometria de massas (catequina, quercetina e ácido gálico). Para tal, modelos experimentais *in vitro* e *ex vivo* foram empregados para avaliar o potencial antioxidante, antiglicante e inibidor de enzimas das amostras. Dessa forma, este estudo fornece informações acerca da capacidade de *A. humile* de inibir enzimas envolvidas na digestão de carboidratos e diminuir o estresse oxidativo e a glicação proteica, o que viabiliza a condução de novos estudos que utilizem modelo animal e que possam contribuir para a completude das informações inicialmente exposta neste trabalho.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Diabetes *mellitus* e suas complicações

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica crônica caracterizada pela falta parcial ou total da produção do hormônio insulina, desencadeando um quadro de hiperglicemia (AL-AWAR et al., 2016). O aumento global de casos de DM e das complicações que acompanham a doença representa uma grande ameaça à saúde humana (ZHENG; LEY; HU, 2018). Segundo dados da Federação Internacional do Diabetes (IDF- International Diabetes Federation), 351,7 milhões de pessoas, entre 20 e 64 anos, foram diagnosticadas ou subdiagnosticadas com DM em 2019. As estimativas para o ano de 2045 é de que 486,1 milhões de pessoas sofram com a enfermidade e que cerca de 845 bilhões de dólares sejam gastos para o gerenciamento da doença. O DM e suas complicações têm contribuído significativamente para o aumento do índice de mortalidade bem como para a diminuição da expectativa de vida no mundo todo. Conforme os dados da IDF, em 2019 4,2 milhões de pessoas morreram em decorrência das complicações causadas pelo DM. Além disso, são inúmeros os casos de invalidez em indivíduos entre 15 e 69 anos que convivem com DM (VOS et al., 2015).

As células  $\beta$ -pancreáticas produzem o hormônio insulina e desempenham papel principal na manutenção adequada dos níveis de glicose no sangue. Essas células endócrinas, presentes nas ilhotas pancreáticas, são capazes de responder de forma rápida ao aumento da concentração de glicose no sangue por meio da secreção de insulina armazenada, enquanto realiza a produção de mais insulina (MOINI, 2019a). A perda progressiva e a disfunção das células  $\beta$ -pancreáticas são características importantes na patofisiologia do DM, responsáveis por ocasionar múltiplas complicações e danos teciduais (MASINI et al., 2017; REMEDI; EMFINGER, 2016).

O diabetes *mellitus* do tipo 1 (DMT1) e o diabetes *mellitus* do tipo 2 (DMT2) são as variações mais comuns do DM (AL-AWAR et al., 2016). DMT1 consiste em uma doença autoimune crônica caracterizada pela deficiência absoluta da secreção de insulina endógena pelas células  $\beta$ -pancreáticas (ILONEN; LEMPAINEN; VEIJOLA, 2019). Embora a etiologia da DMT1 tenha caráter autoimune, mediada por ataques de células T às células  $\beta$ -pancreáticas, a doença envolve relações complexas entre fatores ambientais, microbioma, metabolismo e genoma (DIMEGLIO; EVANS-MOLINA; ORAM, 2018). DMT1 acomete principalmente crianças e jovens adultos, contudo a doença pode surgir em qualquer idade (BUZZETTI; ZAMPETTI; MADDALONI, 2017).

O DMT2 é o tipo mais comum, afetando mais de 90% dos casos de DM no mundo. O número de casos da doença tem aumentado significativamente nos últimos anos devido principalmente a fatores como o aumento da população obesa e com sobrepeso, adoção de estilo de vida sedentário e dieta desbalanceada, além do envelhecimento da população (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017; ZHENG; LEY; HU, 2018; ZHOU et al., 2016). Os adultos são os mais acometidos por esse tipo da doença, no entanto, devido ao sedentarismo e ao aumento do índice de obesidade infantil nas últimas décadas, tem-se observado um número crescente de crianças portadoras da enfermidade (MOINI, 2019b). A principal característica do DMT2 consiste na deficiência relativa da produção de insulina, causada pela resistência de órgãos a esse hormônio e pela disfunção de ilhotas pancreáticas (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017). Como consequência à resistência à insulina, a produção de glicose no fígado é aumentada, ao passo que a captação de glicose por células adiposas e musculares é diminuída (ZHENG; LEY; HU, 2018). Além disso, a deficiência na produção de insulina, causada pela disfunção das células  $\beta$ -pancreáticas, promove um desequilíbrio no nível de glicose no organismo e o consequente surgimento do quadro hiperglicêmico (REAVEN, 1988).

A hiperglicemia em casos de doenças crônicas como DM é desencadeada por um processo multifatorial que inclui desbalanço dos processos de síntese e degradação de glicogênio (gliconeogênese e glicogenólise, respectivamente), assim como ineficiente utilização da glicose por adipócitos e miócitos (ECHOUFFO-TCHEUGUI; GARG, 2017). O quadro hiperglicêmico em DMT2 é responsável pelo desenvolvimento de diversas complicações que contribuem para o aumento dos casos de mortalidade, invalidez e diminuição da expectativa de vida (ZHENG; LEY; HU, 2018).

Segundo Zheng, Ley e Hu (2018), as complicações do DMT2 podem ser divididas em complicações macrovasculares, como doenças cardiovasculares (DCV), e microvasculares, afetando os rins, retina e sistema nervoso. Portadores de DMT2 são normalmente acometidos por DCVs mais severas e precoces quando comparados a indivíduos não diabéticos (BECKMAN et al., 2013; BOOTH et al., 2006). Segundo The Emerging Risk Factors (2010), pessoas diabéticas são duas vezes mais propensas a adquirir DCV do que indivíduos sem a doença, independentemente da idade, hábito tabagista e hipertensão arterial. Além disso, as chances de morte por DCV também são aumentadas em indivíduos com DMT2 (SESHASAI et al., 2011).

As doenças renais são bastante comuns em indivíduos diabéticos (VAN DIEREN et al., 2010) e algumas estimativas sugerem que de 20 a 40% dos pacientes com DM

desenvolverão doença renal crônica (DRC) (SULAIMAN, 2019). Segundo Fuller e outros (2001), a taxa de falência renal entre pacientes com DMT2 é de aproximadamente 6 em cada 1000, onde cerca de um terço desses indivíduos morrem e dois terços se tornam dependentes de diálise. Apesar de a fisiopatologia da nefropatia diabética ainda não ser totalmente compreendida, a literatura defende que o aumento descontrolado da glicemia é um fator crucial no surgimento da doença (MEZA LETELIER et al., 2017). Além disso, alguns trabalhos demonstraram que os AGEs e o estresse oxidativo, processos associados ao DM, são peças-chave no desenvolvimento de lesão renal (JHA et al., 2016; OSSANI et al., 2019; SANAJOU et al., 2018).

A retinopatia diabética e a neuropatia diabética compreendem outras complicações microvasculares que comumente acometem indivíduos portadores de DM. A retinopatia diabética consiste em uma desordem da microvasculatura da retina e é considerada uma das principais causas de perda da visão em indivíduos acima de 40 anos (CHEUNG; MITCHELL; WONG, 2010). Quanto à neuropatia diabética, esta é responsável por umas das principais causas de desabilitação em indivíduos com DM, podendo levar a quadros de dor intensa, diminuição da motilidade e amputação de membros (DEWANJEE et al., 2018). Estimativas apontam que cerca de 66% e 59% de indivíduos com DMT1 e DMT2, respectivamente, tenham tendência a desenvolver neuropatia diabética (TRACY; DYCK, 2008). Ademais, o DM pode influenciar, seja direta ou indiretamente, em outras desordens que acometem os sistemas hepático, digestivo e musculoesquelético (ZHENG; LEY; HU, 2018), além de aumentar os riscos de desenvolvimentos de câncer no fígado, pâncreas e endométrio (GIOVANNUCCI et al., 2010).

## **2.2 Estresse oxidativo e diabetes *mellitus***

O estresse oxidativo consiste em um desbalanço entre a produção de radicais livres e oxidantes, tais como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs, respectivamente), e a capacidade do organismo de combatê-los, promovendo o acúmulo de pró-oxidantes em células e tecidos (PIZZINO et al., 2017). Os EROs mais comuns são: íon superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peroxila ( $RO^{\cdot}$ ); enquanto o óxido nítrico ( $NO_2^{\cdot-}$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e óxido nitroso ( $N_2O$ ) são os ERNs mais comuns (MOLDOGAZIEVA et al., 2018). As células, em sua maioria, possuem um complexo sistema de defesa contra espécies reativas que envolvem componentes enzimáticos como a catalase

(CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), e componentes não enzimáticos como a glutathione (GLT) e a ferritina (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003). Entretanto, quando a produção de espécies reativas se eleva acima da faixa fisiológica, o sistema de defesa antioxidante endógena é sobrecarregado, favorecendo o estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

A produção excessiva de oxidantes, sobretudo de EROs, desencadeia efeitos danosos em diversas moléculas como proteínas, lipídios e lipoproteínas, e em estruturas celulares como membranas e ácido desoxirribonucleico (DNA) (DROGE, 2002; HALLIWELL, 2007), além de favorecer a apoptose celular (NITA; GRZYBOWSKI, 2016; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). Ainda, o excesso da produção de espécies reativas, quando não controlada, pode desencadear doenças crônicas e degenerativas como desordens neurológicas, doenças cardiovasculares, respiratórias e renais, síndromes metabólicas e câncer, além de acelerar o processo de envelhecimento (ARAÚJO; MARTINS; BORBA, 2016; PIZZINO et al., 2017).

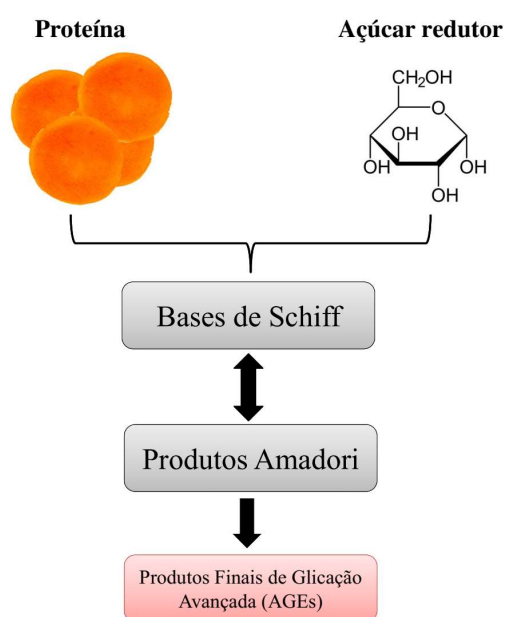
A condição hiperglicêmica em indivíduos diabéticos possui um papel preponderante no aumento da produção de radicais livres e, conseqüentemente, no desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo (IKEBUCHI et al., 2010). Segundo Brownlee (2001), a hiperglicemia pode aumentar a produção de EROs por vias metabólicas como a via do poliol, hiperatividade da via da hexosamina, aumento da formação de AGEs e ativação de seus receptores, ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) e diminuição das defesas antioxidantes. Além disso, a hiperglicemia também atua na geração de radicais livres por meio da peroxidação de ácidos graxos (GUNAWARDENA et al., 2019; SHIRZAIY; DALIRSANI, 2019; TSAI et al., 1994), causando danos às membranas celulares e ao DNA (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016).

O estresse oxidativo é considerado um dos principais fatores causais da deficiência da secreção de insulina, bem como da resistência a esse hormônio (REHMAN; AKASH, 2017). O excesso da produção de espécies reativas pode ativar vias moleculares que prejudicam a neogênese, proliferação e diferenciação das células  $\beta$ -pancreáticas, além de favorecer a apoptose (KESHTKAR et al., 2019). Dessa forma, a quantidade e eficácia dessas células são diminuídas e a produção de insulina é comprometida. Além disso, o excesso de espécies reativas dificulta a inclusão de vesículas de pró-insulina para a membrana plasmática e a sua conseqüente exocitose para a circulação. Pessler, Rudich e Bashan (2001) propuseram que o estresse oxidativo também está relacionado com a diminuição da expressão gênica do

transportador de glicose 4 (GLUT4), processo que diminui a disponibilidade desse receptor e promove a hiperglicemia.

Similarmente, o estresse oxidativo tem sido relacionado ao surgimento de complicações do DMT2 como a nefropatia, retinopatia, neuropatia e doenças vasculares (HENRIKSEN; DIAMOND-STANIC; MARCHIONNE, 2011). A apoptose e necrose, causadas por excessiva produção de EROS em células  $\beta$ -pancreáticas, desempenham papel fundamental no desenvolvimento de complicações do DMT2, visto que estes processos de morte celular culminam em danos teciduais em órgãos como coração, retina, rins e sistema nervoso (LIANG et al., 2017; VOLPE et al., 2018).

Uma grande quantidade de radicais livres é produzida por meio de reações espontâneas não enzimáticas entre açúcares redutores e proteínas, promovendo a rápida formação de bases de Schiff instáveis que são posteriormente rearranjadas, formando os produtos Amadori reversíveis e mais estáveis. Estes produtos sofrem modificações irreversíveis causadas por oxidação, desidratação e polimerização, resultando na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs – do inglês *Advanced Glycation End Products*) (Fig. 1) (HORI et al., 1996; SHAHAB et al., 2018). A elevada produção de radicais livres é um dos grandes responsáveis por catalisar e estimular a produção e acúmulo de AGEs, ao passo que a glicação proteica atua no aumento do estresse oxidativo. Assim, a relação entre o estresse oxidativo e a produção de AGEs gera um processo de retroalimentação sinérgica, importante em processos de aceleração de condições patológicas (RUNGRATANAWANICH et al, 2021; URIBARRI et al., 2007).



**Fig. 1** Processo de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Fonte: adaptado de Videira e Castro-Caldas (2018).



De acordo com Nowotny e outros (2015), os AGEs são compostos gerados de forma mais acentuada em situações de hiperglicemia e são considerados um fator pivotante no desenvolvimento do DMT2 e de suas complicações. A primeira relação entre glicação proteica e diabetes foi relatada por Rahbar (1968), e desde então se estabeleceu que a glicação ocorre predominantemente no N-terminal de valina na cadeia  $\beta$  (BUNN et al., 1975) e que os produtos Amadori são formados a partir da reação de Maillard (HODGE, 1953). Nesta reação não enzimática o grupo carbonila de um açúcar redutor reage com o grupo amino de uma proteína, lipídio ou ácido nucleico, formando bases de Schiff. Visto que os produtos Amadori formados nessa reação são relativamente instáveis, outras reações podem ocorrer paralela e consecutivamente, favorecendo a geração de AGEs (NOWOTNY et al., 2015). Os danos causados por AGEs estão relacionados com a capacidade dessas moléculas de alterar as estruturas e funções das proteínas. Tais modificações podem afetar a matriz extracelular e causar alterações na diferenciação, adesão e migração de células, além de promover a morte celular (NOWOTNY et al., 2015).

A resposta à insulina também pode ser afetada pela produção de AGEs, fator que favorece o desenvolvimento e o agravamento do DMT2 e suas complicações. Estudos propõem que a resistência à insulina pode ser induzida pela glicação direta deste hormônio (ABDEL-WAHAB et al., 1996; HUNTER et al., 2003), favorecendo a perda ou diminuição de sua função (BOYD et al., 2000). Hunter e outros (2003) demonstraram que cerca de 9% do nível total de insulina se apresentava na forma glicada em indivíduos portadores de DMT2. Além disso, Lim e outros (2008) evidenciaram que células  $\beta$ -pancreáticas tratadas com AGEs apresentaram alto índice de morte celular, o que sustenta a hipótese da influência da glicação proteica no aumento da hiperglicemia e, portanto, no desenvolvimento e manutenção do DMT2.

A produção de AGEs não ocorre somente pela ação direta de açúcares redutores, mas também pela formação e acumulação de moléculas dicarbonil altamente reativas. Tais moléculas, denominadas espécies carbonílicas reativas (ECRs), são responsáveis por desencadear um quadro de estresse dicarbonílico quando um desbalanço na produção de ECRs é estabelecido. As ECRs compreendem as moléculas glyoxal (GO), 3-deoxiglicosona (3-DGO) e metilglioxal (MGO), sendo este último considerado um dos principais precursores da geração de AGEs (BELLIER et al., 2019). A interação de MGO e aminoácidos resultam na formação de AGEs específicos como a hidroximidazolona 1 (MG-H1) e a tetrahidropirimidina (THP) quando MGO reage com arginina, e N<sup>ε</sup>-(carboxietil)-lisina (CEL) quando a interação ocorre com lisina (VISTOLI et al., 2013). Dobler e outros (2006) propuseram que MG-H1 pode causar

danos na parede vascular e inibir a angiogênese. Além disso, Morcos e outros (2008) indicaram que elevados níveis de MG-H1 foram responsáveis pelo aumento da produção de EROs mitocondrial e elevação do estresse oxidativo. Também, THP se mostrou uma peça importante na patofisiologia da aterosclerose em indivíduos portadores do DMT1 (VAN EUPEN et al., 2013).

Grande parte da formação de MGO se dá por meio de bioprodutos da glicólise através da degradação não enzimática de glicose-3-fosfato e fosfato de di-hidroxiacetona (DHAP) (MAESSEN; STEHOUWER; SCHALKWIJK, 2015). Dessa forma, as vias de formação de MGO estão diretamente interligadas ao quadro hiperglicêmico em indivíduos diabéticos (RAMACHANDRA BHAT et al., 2019). Apesar da baixa produção endógena dessa molécula dicarbonílica (cerca de 0,1% do fluxo de glicotrioses), sua produção demanda atenção devido sua alta reatividade e efeito sob proteínas e ácidos nucleicos (MAESSEN; STEHOUWER; SCHALKWIJK, 2015).

### **2.3 Diabetes *mellitus* e enzimas envolvidas na digestão de carboidratos**

O metabolismo de carboidratos é a principal forma de obtenção de energia em humanos (LUDWIG et al., 2018). Como previamente discutido, o DMT2 é uma doença que possui como característica fundamental a manifestação de um quadro hiperglicêmico. À vista disso, uma das estratégias adotadas para o combate do DMT2 e de suas complicações fundamenta-se no gerenciamento da hiperglicemia pós-prandial por meio da inibição da absorção de carboidratos (ALQAHTANI et al., 2019). Em humanos, o amido advindo da dieta é sucessivamente hidrolisado em pequenos oligômeros pela enzima  $\alpha$ -amilase presente na saliva e no suco pancreático (NICHOLS et al., 2003). O processo de hidrólise promovido pela enzima provoca o rompimento de ligações  $\alpha$ -1,4, gerando produtos tais como maltose, maltotriose e dextrinas (MIAO et al., 2015). Esses oligossacarídeos são posteriormente degradados por enzimas  $\alpha$ -glicosidases (maltases, sacares e lactases), presentes no intestino delgado, em monossacarídeos como a glicose, frutose e galactose que são absorvidas e disponibilizadas na corrente sanguínea. Dessa forma, as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase possuem papel crucial na disponibilização de glicose no sangue e, conseqüentemente, no desenvolvimento do quadro hiperglicêmico em indivíduos diabéticos (KAJARIA et al., 2013).

## 2.4 Danos em tecido hepático relacionados ao diabetes *mellitus* e ao estresse oxidativo

Além de todas as complicações advindas do DMT2 já mencionadas, a doença também está associada a diversas anormalidades hepáticas, tais como fibrose, cirrose, carcinomas hepatocelulares, deposição de glicogênio anormal, níveis anormais de enzimas hepáticas, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD – do inglês *non-alcoholic fatty liver disease*), doença hepática aguda e hepatite viral (AHMADIEH; AZAR, 2014; TOLMAN et al., 2007). Ainda, o quadro hiperglicêmico pode favorecer a apoptose de hepatócitos, contribuindo para a morbidade e mortalidade de pacientes diabéticos (CHANDRASEKARAN et al., 2010).

Numerosos estudos relacionaram a produção de EROs em DMT2 com lesões em tecido hepático (CHEN et al., 2019; CHEN, ZE et al., 2020; LI et al., 2015; MASARONE et al., 2018). Segundo Larter e Farrell (2006) e Leclercq e outros (2007), a resistência à insulina, principal causa da hiperglicemia, é o fator central dos danos em tecido hepático em indivíduos diabéticos. Visto que o fígado compreende um tecido de grande sensibilidade à insulina, este órgão é um dos mais susceptíveis aos efeitos do estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia (LECLERCQ et al., 2007). A patogênese das doenças hepáticas integra o estresse oxidativo e seus consequentes danos, como alterações em proteínas, lipídios e DNA, bem como a modulação de vias de sinalização (FARZAEI et al., 2018).

A NAFLD, caracterizada pelo acúmulo de gordura nos hepatócitos (esteatose hepática) sem evidência de consumo alcoólico, consiste em uma das principais causas de doenças hepáticas crônicas (BYRNE; TARGHER, 2015; FERNÁNDEZ-IGLESIAS; HIDE; GRACIA-SANCHO, 2017). Apesar do deficiente conhecimento acerca da progressão da NAFLD, alguns autores defendem que a resistência à insulina, sedentarismo, adiposidade abdominal e dieta rica em gordura saturada e carboidratos estão diretamente relacionados com a doença (FERNÁNDEZ-IGLESIAS; HIDE; GRACIA-SANCHO, 2017).

Um dos mecanismos patogênicos da NAFLD está relacionado a hiperinsulinemia (resistência aumentada à insulina), que propicia o aumento da síntese *de novo* de ácidos graxos e o consequente aumento do influxo dessas moléculas para o fígado. O processo catabólico dos ácidos graxos leva, através de diferenciados mecanismos, à produção de EROs e ERNs, os quais favorecem a morte de hepatócitos e o surgimento da esteato-hepatite não alcoólica (NASH – do inglês *non-alcoholic steatohepatitis*) (CORTEZ-PINTO; DE MOURA; DAY, 2006; REINIERS et al., 2013). Em NAFLD, a produção de EROs está relacionada ao aumento da  $\beta$ -oxidação nas mitocôndrias e ao consequente desbalanço na produção de NADH, propiciando a

geração do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (CHEN, Z. et al., 2020; MURPHY, 2008). Ademais, a produção de EROs também ocorre por meio da oxidação de ácidos graxos extramitocondrial ( $\omega$ -oxidação), no retículo endoplasmático, por ação da família de enzimas CYP (CYP4A e CYP2E1) (REINIERS et al., 2014). Outro fator crucial na produção de radicais livres em indivíduos com NAFLD consiste no desbalanço dos níveis de glutathiona. Alguns estudos sugerem que os níveis de GSH (glutathiona reduzida) no fígado são diminuídos durante a progressão da NAFLD, seguido pela diminuição da razão GSH/GSSH (glutathiona oxidada) (HARDWICK et al., 2010; KUMAR et al., 2013; MALAGUARNERA et al., 2005).

## **2.5 Uso de plantas medicinais no controle do diabetes *mellitus* e do estresse oxidativo**

O atual método de tratamento do DM se baseia na utilização de uma ampla classe de medicamentos disponíveis no mercado. Estas drogas atuam por diferentes mecanismos que podem agir na redução dos níveis de glicose no sangue (sulfonilureias); redução da gliconeogênese hepática e restabelecimento da sensibilidade à insulina (biguanidas); inibição de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos (inibidores de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase); aumento da secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas (secretagogos não sulfonilureias); e aumento da sensibilidade dos tecidos muscular e adiposo à insulina (tiazolidinedionas) (SALEHI et al., 2019). Contudo, apesar da ampla utilização dos medicamentos supracitados, estes apresentam diversas desvantagens como o desenvolvimento de resistência medicamentosa e a consequente diminuição de sua eficiência, surgimento de efeitos adversos e, em determinados casos, toxicidade (DEY; ATTELE; YUAN, 2002; SALEHI et al., 2019). A vista disso, a busca por novas drogas para a controle e gerenciamento de doenças é de grande valia e desperta grande interesse em diversos campos de pesquisa. Os produtos naturais, principalmente os de origem vegetal, se apresentam como candidatos promissores para o desenvolvimento de medicamentos com potencial terapêutico no tratamento do DM2 e de suas complicações (SALEHI et al., 2018; SHARIFI-RAD et al., 2018).

A utilização de produtos naturais na terapêutica de doenças possui diversas vantagens visto que apresentam baixo custo, efeitos colaterais mais brandos, alta disponibilidade, além de prover uma rica fonte de compostos químicos bioativos que exibem importantes efeitos farmacológicos (PRAKASH MISHRA et al., 2018; SALEHI et al., 2019; SHARMA; ARYA, 2011). Em diversas comunidades, a medicina tradicional é considerada fonte de saúde primária, sendo que cerca de 60% da população mundial (80% da população de países em

desenvolvimento) dependem diretamente da utilização de produtos naturais para fins medicinais (SHRESTHA; DHILLION, 2003). No Brasil, o governo federal, por meio do Decreto n.º 5.813, de 22 de junho de 2006, aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o intuito de fornecer melhor acesso da população às plantas medicinais e fitoterápicos. Por meio do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), esta Política busca promover ações relacionadas ao uso sustentável da biodiversidade brasileira, bem como o acesso da população às plantas medicinais e fitoterápicas no Brasil, fomentando o uso seguro e racional desses recursos naturais (BRASIL, 2009). Além disso, o programa ressalta a importância da inclusão das plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) e defende que:

[...] a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e a Política nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, aprovada por meio da portaria nº 971, de 03 de maio de 2006 e da portaria n.º 1600, de 17 de julho de 2006, que definem diretrizes, linhas de ações e responsabilidades para inclusão das Plantas Medicinais/Fitoterapia, Homeopatia, Medicina Tradicional Chinesa/Acupuntura, Termalismo Social/Crenoterapia e Medicina Antroposófica, como opções terapêuticas no sistema público de saúde são estratégias importantíssimas para o SUS (BRASIL, 2009).

Historicamente, diversas espécies de plantas têm sido empregadas no tratamento do DM. A primeira planta medicinal com propriedade antidiabética foi a *Galega officinalis* L., da família Fabaceae. Esta espécie, popularmente conhecida como galega ou arruda de cabra, foi primeiramente prescrita na idade média para o tratamento do DM, sendo que a galegina, molécula posteriormente isolada dessa planta, foi considerada o principal componente responsável pela diminuição da hiperglicemia (BEDEKAR; SHAH; KOFFAS, 2010; RIOS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015).

O grande potencial farmacológico das plantas medicinais para tratamento do DM tem sido atribuído à presença de compostos fitoquímicos que atuam no organismo por diversos mecanismos (ODEYEMI; BRADLEY, 2018). Os metabólitos especializados, são numerosos compostos químicos produzidos pelas plantas através de vias metabólicas derivadas da via metabólica primária (HUSSEIN; EL-ANSSARY, 2018). Estes compostos possuem diversos efeitos biológicos que, segundo Hussein e El-Anssary (2018), fornecem a base científica para o uso de produtos naturais na medicina tradicional.

Os polifenóis compreendem uma importante classe de metabólitos especializados que apresentam grande potencial terapêutico (HUSSEIN; EL-ANSSARY, 2018). Estas moléculas são altamente distribuídas entre as plantas, com mais de 8 mil estruturas já identificadas (TANASE; COSARCA; MUNTEAN, 2019). As substâncias fenólicas apresentam uma grande

variedade de compostos e podem ser classificadas de acordo com sua estrutura química como flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenas, cumarinas, taninos e lignanas (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Estas moléculas estão presentes em cereais, frutas, legumes, vegetais e nozes (AURA, 2008), e seu consumo tem sido interligado ao tratamento de numerosas doenças crônicas, cardiovasculares, neurodegenerativas, além de alguns cânceres, osteoporose e DMT2 (ANANTHARAJU et al., 2016; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2010; VAN HUNG, 2016). Demais bioatividades destas moléculas compreendem o potencial antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano e antiproliferativo (AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016; VAN HUNG, 2016; VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Visto a potencialidade dos polifenóis no tratamento de diversas enfermidades, numerosos estudos se propuseram a ilustrar a capacidade dos agentes multifuncionais presentes nestas moléculas de retardar o aparecimento ou a progressão de patologias (FRAGA et al., 2019; LI, Z. et al., 2020; SILVA et al., 2019; XIONG et al., 2020; YAMAGATA, 2019). Os polifenóis mostraram-se eficazes no melhoramento da sensibilidade à insulina (DE BOCK et al., 2013; PAQUETTE et al., 2017), na proteção de células  $\beta$ -pancreáticas contra estresse oxidativo e apoptose, na inibição de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos e da formação de AGEs, bem como na ativação de vias relacionadas à captação de glicose pelos tecidos adiposo e muscular (BAHADORAN; MIRMIRAN; AZIZI, 2013; XIAO; HÖGGER, 2015). Não obstante, compostos polifenólicos se destacaram na prevenção de complicações associadas ao DMT2, tais como retinopatia, doenças cardiovasculares, nefropatia e neuropatia (ARYAEIAN; SEDEHI; ARABLOU, 2017; BAHADORAN; MIRMIRAN; AZIZI, 2013). Em uma revisão de literatura, Kim, Keogh e Clifton (2016) expõem diversos estudos *in vivo* que sustentam as propriedades antidiabéticas de alguns polifenóis, exaltando seu potencial para a prevenção e gerenciamento do DMT2 e de suas complicações. Além disso, Cao e outros (2019) demonstraram o potencial antidiabético de compostos fenólicos em estudos com humanos e em ensaios clínicos. De acordo com este estudo, dietas ricas em polifenóis apresentaram notórios benefícios em indivíduos com DMT2, apesar de os mecanismos que envolvem o potencial terapêutico dos polifenóis serem ainda pouco conhecidos.

Todavia, numerosos estudos empenharam-se em elucidar os potenciais mecanismos de ação que tornaram os polifenóis uma ferramenta valiosa no tratamento do DMT2 e de suas complicações. Segundo Kim, Keogh e Clifton (2016), o efeito hipoglicêmico de compostos fenólicos estão relacionados com sua capacidade de inibir enzimas salivares e pancreáticas, tais como  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, promovendo a diminuição da absorção de carboidratos pelo

organismo. Miao e outros (2015) afirmam que a inibição da  $\alpha$ -amilase pelos polifenóis é resultado das interações entre as moléculas polifenólicas e o sítio ativo da enzima, promovida por forças hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Em consonância, Li e outros (2009) afirmaram que a interação entre flavonoides e  $\alpha$ -amilase se dá majoritariamente por forças hidrofóbicas e, em menor participação, por ligações de hidrogênio. Em uma análise de *docking* entre  $\alpha$ -amilase e glicosídeos de quercetina, Kim e outros (2010) encontraram que resíduos de aminoácidos da enzima participa em ligações de hidrogênio e em interações  $\pi$ - $\pi$  com o esqueleto carbônico dos flavonoides. Segundo os autores, o resíduo TYR59 da enzima interage com os anéis A-, B- e C- da isoquercetina e com os anéis A- e C- da quercetina por meio de interações  $\pi$ - $\pi$ . Quanto a inibição da  $\alpha$ -glicosidase, em uma análise de cinética enzimática e modelamento molecular, Şöhretoğlu e Sari (2019) propuseram que características estruturais dos flavonoides, tais como ligação dupla entre os carbonos C-2 e C-3 e a presença de um grupo hidroxila livre no carbono C-4, são fatores cruciais para a inibição enzimática. Além disso, por meio dos estudos de modelamento molecular realizados pelos autores, pôde-se afirmar que grupos hidroxilas nos carbonos C-3 e C-7, a presença do oxigênio carbonil no carbono C-4 e grupos hidroxilas no anel B são componentes chaves para que a ligação flavonoide-enzima seja estabelecida.

Os polifenóis, similarmente, têm sido relacionados com o aumento da captação tecidual de glicose em vários estudos (COSTABILE et al., 2019; DONADO-PESTANA et al., 2021; LI, D. et al., 2020; OOI et al., 2018; PINENT et al., 2004; UEDA-WAKAGI et al., 2015; XIA et al., 2021; ZHANG et al., 2010). Em um ensaio conduzido por Ooi e outros (2018), foi mostrado que o glicosídeo fenólico curculigosídeo e a fração de acetato de etila do extrato do rizoma de *Molineria latifolia* aumentaram a captação de glicose pelo aumento da disponibilidade de GLUT4 na membrana plasmática de células adipócitas 3T3-L1. Ao nível molecular, os autores acreditam que este efeito seja ao menos parcialmente mediado pela ativação das cascatas de sinalização da proteína quinase B (AKT) e da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Ademais, Kurimoto e outros (2013) mostraram que a soja preta (*Glycine max* L), rica em antocianinas e procianidinas, diminuiu os níveis de glicose no sangue e aumentou a sensibilidade à insulina pela ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no músculo esquelético e fígado de ratos diabéticos. Além disso, *G. max* foi atuante na ‘up-regulation’ de GLUT4 no músculo esquelético, bem como na ‘down-regulation’ da gliconeogênese no fígado de ratos diabéticos.

Os flavonoides também se demonstraram eficazes na proteção de células  $\beta$ -pancreáticas contra a glicotoxicidade associada ao DMT2. Cai e Lin (2009) mostraram que o

polifenol epigallocatequina-galato (EGCG) e o flavonoide rutina foram eficazes na atenuação da glicocitotoxicidade induzida em células  $\beta$ -pancreáticas. Os resultados deste estudo revelaram que EGCG e rutina preservam a maquinaria de secreção de insulina e estimulam a sinalização do substrato do receptor de insulina 2 (IRS2) em células pancreáticas de ratos. Os autores defendem que estes efeitos são devido à ativação da AMPK e à consequente diminuição da atividade de enzimas lipogênicas e melhoramento da função mitocondrial.

A literatura possui um grande acervo de estudos que relacionam os polifenóis e o controle do estresse oxidativo. Segundo Olszowy (2019), a capacidade antioxidante de moléculas fenólicas está relacionada com o número e distribuição de grupos hidroxila nos anéis da estrutura molecular. A configuração dos grupos hidroxila no anel B é vista como a característica mais determinante no processo de *scavenging* de EROs e ERNs (BURDA; OLESZEK, 2001; KERRY; RICE-EVANS, 1999; SEKHER PANNALA et al., 2001; TREML; ŠMEJKAL, 2016), visto que estes grupos doam hidrogênio e elétrons para radicais hidroxil, peroxil e peroxinitrito, os estabilizando, além de propiciar a formação de radicais relativamente estáveis (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Ainda, a estrutura 3'4'-catecol posicionada no anel B se mostra efetivamente eficaz na inibição da peroxidação lipídica. A presença de grupos 3-OH livres e a possibilidade de conjugação entre os anéis dos flavonoides, segundo Burda e Oleszek (2001), contribui significativamente para a atividade antioxidante destas moléculas. Além disso, os polifenóis podem inibir processos de oxidação por sua capacidade de quelar e/ou reduzir íons metálicos (OLSZOWY, 2019), característica de grande importância visto que processos oxidativos ocorrem com maior velocidade na presença de metais iônicos tais como o cobre e o ferro (CHOE; MIN, 2009). Como proposto por Gülçin (2006), compostos que apresentam dois ou mais grupos -OH, -SH, -COOH, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, C=O, NR<sub>2</sub>, -S- e -O- podem atuar como quelantes de íons metálicos.

A atividade de enzimas envolvidas em processos de oxidação em organismos vivos também pode ser influenciada por compostos fenólicos. Alguns flavonoides demonstraram capacidade de ativar enzimas como glutathione S transferase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, importantes no processo de defesa antioxidante (MARTÍN et al., 2010; MASELLA et al., 2004; PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011). Yeh e Yen (2006) mostraram que polifenóis como o ácido gálico, ácido ferúlico, ácido gentísico e ácido cumárico culminaram no aumento da atividade da superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase no fígado e intestino delgado de ratos saudáveis. De Oliveira e Silva e outros (2012),



similarmente, observaram aumento da atividade de enzimas antioxidantes em ratos tratados com extrato aquoso de *Halimeda opuntia* rico em polifenóis.

Potencial anti-inflamatório também é atribuído aos compostos polifenólicos (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019; TEJADA et al., 2018; ZHANG; TSAO, 2016). O efeito anti-inflamatório dos polifenóis está relacionado à sua atividade de sequestro de radicais livres (*scavenger*), regulação da atividade celular em células inflamatórias, modulação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico (fosfolipase A2 e COX) e da arginina (NOS), além da modulação da produção de outras moléculas pró-inflamatórias (HUSSAIN et al., 2016). Os mecanismos moleculares que conferem aos polifenóis o potencial anti-inflamatório estão relacionados à capacidade dessas moléculas de inibir o NF- $\kappa$ B, a proteína ativadora 1 (AP-1) e enzimas associadas à processos inflamatórios, tais como COX-2, LOX e iNOS. Além disso, os polifenóis ativam enzimas antioxidantes, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), a proteína quinase C e o fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2 (Nrf2) (SANTANGELO et al., 2007). Ademais, ensaios com fitoquímicos naturais mostraram o potencial destas moléculas de modular diferentes mediadores inflamatórios tais como os metabólitos derivados do ácido araquidônico, diversos peptídeos, aminoácidos excitatórios e citocinas (HUSSAIN et al., 2016).

## **2.6 *Anacardium humile***

A espécie *Anacardium humile* St. Hil, pertencente à família Anacardiaceae, é conhecida popularmente por cajuí, cajuzinho-do-cerrado, cajuzinho-do-mato, cajuzinho-do-campo, cajueirão anão ou cajueiro-do-campo. Presente principalmente no Cerrado brasileiro, essa espécie possui hábito arbustivo com cerca de 25 a 50 cm, no entanto, sua parte subterrânea pode atingir vários metros. As folhas de *A. humile* são simples, coriáceas, obovais, penínervas e com nervuras salientes. Suas flores apresentam coloração vermelho-rosadas e seus frutos são acinzentados em formato de rim. Seu pseudofruto (pedúnculo desenvolvido), por vezes denominado de fruto, apresenta polpa carnosa e coloração avermelhada ou amarelada (GRANDI, 2014; LUIZ-FERREIRA, 2005).

A utilização de *A. humile* é muito ampla, sendo seu pseudofruto utilizado na fabricação de sucos, doces, bem como na produção de plástico e verniz. Inserido na medicina popular, essa espécie tem sido empregada no tratamento de inflamações e do DM devido sua aclamada propriedade hipoglicemiante (LUIZ-FERREIRA, 2005). Além disso, a infusão de suas folhas e cascas são utilizadas como antidiarreico, devido à forte presença de taninos, e o suco do

pseudofruto é empregado como antissifilítico. As principais formas de utilização das partes vegetais de *A. humile* consistem na decocção e infusão de folhas e cascas, assim como na extração de seu suco (LUIZ-FERREIRA, 2005; POTT; POTT, 1994).

Luiz-Ferreira e outros (2010) mostraram o potencial gastroprotetor do extrato etanólico das folhas de *A. humile* em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto. Segundo os autores, o extrato reduziu significativamente o dano gástrico provocado pelo etanol. Ainda, Luiz-Ferreira e outros (2010) indicaram, através de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), a presença de diversos compostos nas folhas de *A. humile*, como derivados do ácido gálico, catequinas e flavonoides. Em consonância, Royo e outros (2015) indicaram a presença de taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas e esteroides em extrato hidroalcolico de *A. humile*. Este estudo também demonstrou a capacidade antifúngica do extrato que inibiu a atividade de *Candida albicans*. Pereira e outros (2011) avaliaram o potencial de dois extratos (etanólico e butanólico) e uma fração (hexânica) das folhas de *A. humile* quanto seus potenciais bactericidas. Segundo os autores, os extratos e a fração foram eficazes na inibição de bactérias como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus aureus* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Ademais, atividade anti-helmíntica foi relatada por Nery e outros (2010) que demonstraram a eficácia dos extratos aquoso e etanólico de *A. humile* em inibir a atividade de helmintos do gênero Strongyloides.

*A. humile* também se mostrou eficaz no controle da hiperglicemia em modelo de diabetes induzida por aloxana em ratos wistar. Segundo Urzêda e outros (2013), o extrato aquoso de hastes de *A. humile* diminuiu significativamente os níveis de glicose no sangue, além de favorecer a perda de peso nos animais tratados com a planta. Os autores ainda levantam a possibilidade de os componentes do extrato inibir a secreção de  $\alpha$ -amilase no intestino. Ainda, em um estudo com extrato hidroacetônico do fruto de *A. humile*, Porto e outros (2016) mostraram relevante presença de compostos fenólicos e alta capacidade antioxidante da espécie, confirmada pelos testes ABTS (sequestro do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), FRAP (capacidade de redução do ferro) e DPPH (sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

O objetivo deste estudo consiste em investigar, mediante ensaios *in vitro* e *ex vivo*, o extrato etanólico de *A. humile*, suas frações orgânicas e três moléculas (catequina, quercetina e ácido gálico – CQA) adquiridas comercialmente de Sigma-Aldrich, quanto suas capacidades antioxidante, antiglicante e inibitória de enzimas relacionadas à hiperglicemia. Além disso, este trabalho correlacionará as moléculas encontradas nas frações orgânicas do extrato de *A. humile* com o elevado potencial antioxidante e antiglicante.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Preparar o extrato etanólico de *A. humile* (EE-Ah), bem como realizar o fracionamento do extrato a partir de solventes orgânicos (hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol);
- Determinar o teor de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados contidos no EE-Ah e em suas frações orgânicas;
- Investigar o potencial antioxidante do EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA pelos métodos de ORAC, FRAP e DPPH;
- Avaliar a capacidade antiglicante do EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA por meio de quatro métodos: BSA/Fructose, BSA/Metilglioxal, Arginina/Metilglioxal e Lisina/Metilglioxal;
- Determinar o potencial inibitório do EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA frente às enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase;
- Investigar, através de ensaios *ex vivo*, a capacidade das três melhores frações e CQA de inibir a peroxidação lipídica e a produção de EROs, bem como preservar grupos tióis;
- Averiguar a toxicidade celular das três melhores frações e CQA por meio do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em macrófagos RAW 264,7;
- Determinar, por análise em HPLC-ESI-MS/MS, as moléculas presentes nas três frações que se demonstrarem mais efetivas nos ensaios realizados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *A. humile* foram coletadas no mês de outubro de 2017 em uma área do bioma Cerrado na Fundação Mundo Lindo, localizado no Vale da Boa Esperança em Barreiras-BA (Brasil), com altitude de 513 metros e coordenadas 12°09'0,9" S e 45°09'02,9" O. Um voucher do espécime coletado foi depositado no herbário da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB) sob o código de registro BRBA 7556. A espécie foi identificada pela curadora do herbário, Juliana Gastaldello Rando. A pesquisa com *A. humile* foi registrada na plataforma eletrônica do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o código AF2242E.

### 4.2 Preparação do extrato e frações das folhas de *A. humile*

Para a obtenção do extrato etanólico, 400 g de folhas secas de *A. humile* foram trituradas e submetidas a maceração estática em dois litros de etanol 98% (1:5 m/v) por sete dias em temperatura ambiente. A solução obtida foi filtrada em filtro de papel (Melitta® n.º 103) e o solvente remanescente foi removido por rotaevaporação (Buchi Rotavapor R-215, Suíça) a 40 °C sob pressão reduzida. O extrato etanólico das folhas de *A. humile* (EE-Ah) foi congelado a -20 °C e posteriormente liofilizado (L101, Liotop, Brasil) para a completa remoção da água remanescente. Para a obtenção das frações orgânicas, 4 g de EE-Ah foram diluídos em uma solução hidrometanólica 90% (4 mL de água destilada e 36 mL de metanol) e em seguida a mistura foi submetida ao processo de particionamento líquido-líquido, utilizando solventes orgânicos (40 mL por três vezes) em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. A fração de água compreende o resíduo final do processo de fracionamento. Os solventes remanescentes dos processos de fracionamento foram removidos por rotaevaporação (40 °C) (Buchi Rotavapor R-215, Suíça) e as frações obtidas foram congeladas a -20 °C e liofilizadas (L101, Liotop, Brasil). O EE-Ah e as frações orgânicas de *A. humile* foram armazenadas a -20 °C até o momento de sua utilização.

### 4.3 Prospecção fitoquímica

A análise fitoquímica do EE-Ah e de suas frações orgânicas (Hex – fração de hexano, DCM – fração de diclorometano, AcOEt – fração de acetato de etila, ButOH – fração de n-butanol e H<sub>2</sub>O – fração de água) foi realizada seguindo o método descrito por Zou e outros (2011). Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços e todas as frações foram diluídas em etanol à concentração de 5 mg/mL.

#### 4.3.1 Determinação do conteúdo de flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi determinado a partir de um ensaio espectrofotométrico baseado na formação de um complexo pela reação do íon de alumínio (Al<sup>3+</sup>) com grupos carbonila e hidroxila de flavonas e flavonóis (POPOVA et al., 2004). EE-Ah e suas frações orgânicas foram incubados com solução de NaNO<sub>2</sub> 5% e água destilada por 6 minutos a 25 °C na ausência de luz. A mistura foi posteriormente incubada com AlCl<sub>3</sub> 10% por 6 minutos a 25 °C e a absorbância foi mensurada a 510 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). O conteúdo de flavonoides das amostras foi calculado a partir de uma curva analítica construída utilizando quercetina (serialmente diluída a partir da concentração de 2 mg/mL) como padrão. Os resultados são apresentados em miligramas equivalentes de quercetina por grama (mg EQ/g).

#### 4.3.2 Determinação do conteúdo de taninos condensados

A determinação do conteúdo de taninos condensados (proantocianidinas) se deu pela quantificação colorimétrica de condensados formados pela reação da vanilina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído) com taninos em HCl (SCHOFIELD et al., 2001). EE-Ah e suas frações orgânicas foram incubados com uma solução metanólica de vanilina 4% e HCl por 15 minutos a 25 °C e a absorbância foi mensurada a 500 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). O conteúdo de taninos condensados foi calculado a partir de uma curva analítica construída utilizando catequina (serialmente diluída a partir da concentração de 2 mg/mL) como padrão. Os resultados são apresentados em miligramas equivalentes de catequina por grama (mg EC/g).

### 4.3.3 Determinação do conteúdo de fenóis totais

Para determinar a quantidade de fenóis totais, utilizou-se o reagente Folin-Ciocalteu que reduz na presença de polifenóis e forma produtos de reação que podem ser quantificados por análise colorimétrica (GALVÃO et al., 2018). EE-Ah e suas frações orgânicas foram incubados com Folin-Ciocalteu 10% por 6 minutos a 25 °C. A mistura foi posteriormente incubada com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% na ausência de luz por 2h a 25 °C e a absorbância foi mensurada a 765 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). O conteúdo de fenóis totais foi calculado a partir de uma curva analítica construída utilizando ácido gálico (serialmente diluído a partir da concentração de 2 mg/mL) como padrão. Os resultados são apresentados em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama (mg EAG/g).

### 4.4 Análise de inibição enzimática

Os ensaios de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase foram baseados nos métodos descritos por Franco e outros (2019b). EE-Ah, suas frações orgânicas, CQA e acarbose (controle positivo) foram serialmente diluídos em etanol a partir da concentração de 30 mg/mL para determinação do IC<sub>50</sub>. A porcentagem de inibição (I) foi calculada usando a seguinte equação:

$$I(\%) = \frac{A \text{ controle} - A \text{ amostra}}{A \text{ controle}} \times 100$$

*Equação 1*

onde *A amostra* representa a área sob a curva calculada usando a absorbância obtida na presença das frações/CQA e *A controle* é a área sob a curva calculada usando a absorbância obtida na ausência das frações/CQA.

#### 4.4.1 Inibição da $\alpha$ -amilase

A inibição da enzima  $\alpha$ -amilase foi avaliada pelo método que utiliza fração enriquecida com  $\alpha$ -amilase (HSA-f), obtida pela técnica de cromatografia de troca iônica em resina Q-sefarose (SANTOS et al., 2012), e 2-cloro-4-nitrofenil-4- $\beta$ -D galactopiranosilmaltosideo (GalG2CNP) como substrato. HSA-f foi diluída em tampão MES (ácido 2-(N-morfolino)-

etanossulfônico) 50 mM, preparado com cloreto de cálcio 5 mM, tiocianato de potássio 140 mM e cloreto de sódio 300 mM, pH 6,0. EE-Ah, suas frações orgânicas, CQA e o controle positivo (acarbose), previamente diluídos, foram incubados com HSA-f (1:10) por 30 minutos a 37 °C. Logo, o substrato Gal2CNP foi adicionado e a absorbância das amostras foi mensurada a 405 nm por 3 minutos em intervalos de 1 minuto (Versamax, Molecular Devices, EUA). Etanol foi usado como controle negativo.

#### 4.4.2 Inibição da $\alpha$ -glicosidase

EE-Ah, suas frações orgânicas, CQA e o controle positivo (acarbose) foram incubados com glutatona reduzida (diluída em tampão fosfato 50 mM, pH 6,8) e fração enriquecida com  $\alpha$ -glicosidase do pó cetônico de ratos (AG-f) (TOMA et al., 2014) por 20 minutos a 37 °C. A AG-f foi obtida por meio da homogeneização de 400 mg de pó cetônico de intestino de rato em 6 mL de solução aquosa de cloreto de sódio (0,9% m/v). Em seguida, o substrato 4-nitrofenil  $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (p-NPG) foi adicionado (SHAN et al., 2016) e a absorbância das amostras foi mensurada a 405 nm por 30 minutos (Versamax, Molecular Devices, EUA). Etanol foi usado como controle negativo.

#### 4.5 Análise da inibição da formação de AGEs

Os ensaios para determinar a capacidade de inibição da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) se basearam nos métodos descritos por Wang e outros (2011). A utilização de albumina de soro bovino (BSA), lisina e arginina nos ensaios de antiglicação permitem avaliar todos os estágios e alvos da glicação proteica (WANG et al., 2011). EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA foram serialmente diluídos em etanol a partir da concentração de 15 mg/mL para determinação do IC<sub>50</sub>. A porcentagem de inibição (I) foi calculada usando a seguinte equação:

$$I(\%) = 100 - \left( \frac{F \text{ amostra} - F \text{ branco}}{F \text{ controle} - F \text{ branco}} \times 100 \right)$$

Equação 2

onde *F controle* representa o valor da fluorescência na ausência das amostras/controlado positivo, *F amostra* é o valor da fluorescência na presença das amostras/controlado positivo e *F branco* é o valor da fluorescência na ausência do agente promotor da glicação (frutose ou metilglioxal)

e das amostras/controle positivo. Quercetina e tampão fosfato foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

#### **4.5.1 Modelo BSA-Frutose**

A análise de antiglicação utilizando BSA e frutose permite avaliar todos os estágios do processo de glicação proteica (WANG et al, 2011). EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA foram incubados com frutose 1,25 M e BSA a 50 mg/mL (preparado em tampão fosfato 200 mM, pH 7,4, e azida 0,02%) por 72h a 37 °C na ausência de luz. Logo, ácido tricloroacético 20% foi adicionado e a mistura foi centrifugada a 10.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido com tampão fosfato. A intensidade da fluorescência das amostras foi mensurada a 350nm<sub>ex</sub>/420nm<sub>em</sub> (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Etanol e quercetina foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Frutose foi substituída por tampão fosfato na amostra branco.

#### **4.5.2 Modelo BSA-Metilglioxal**

O modelo que utiliza BSA e metilglioxal (MGO) permite avaliar os estágios intermediários da glicação proteica (WANG et al, 2011). EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA foram incubados com BSA 50 mg/mL (preparado em tampão fosfato 200 mM, pH 7,4, e azida 0,02%) e MGO 53,3 mM por 72h a 37 °C na ausência de luz. Logo, ácido tricloroacético 20% foi adicionado e a mistura centrifugada a 10.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido com tampão fosfato. A intensidade da fluorescência das amostras foi mensurada a 340nm<sub>ex</sub>/380nm<sub>em</sub> (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Etanol e quercetina foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. MGO foi substituído por tampão fosfato na amostra branco.

#### **4.5.3 Modelo Arginina-Metilglioxal**

O ensaio de glicação com o modelo de arginina e MGO permite avaliar o processo de inibição da ligação do composto carbonílico de alta reatividade com o aminoácido (WANG et al, 2011). EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA foram incubados com arginina 106,6 mM (preparado em tampão fosfato 200 mM, pH 7,4, e azida 0,02%) e MGO 5,3 mM por 72h a 37



°C na ausência de luz. A intensidade da fluorescência foi mensurada a 340nm<sub>ex</sub>/380nm<sub>em</sub> (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Etanol e quercetina foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. MGO foi substituído por tampão fosfato na amostra branco.

#### 4.5.4 Modelo Lisina-Metilglioxal

A utilização de lisina e MGO no teste de antiglicação permite avaliar a formação de AGEs derivados de lisina como Nε-(carboxietil)lisina (CEL) e Nε-(carboximetil)lisina (CML) (GAENS et al., 2014). EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA foram incubados com lisina 106,6 mM (preparado em tampão fosfato 200 mM, pH 7,4, e azida 0,02%) e MGO 5,3 mM por 72h a 37 °C na ausência de luz. A intensidade da fluorescência foi mensurada a 340nm<sub>ex</sub>/380nm<sub>em</sub> (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Etanol e quercetina foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente. MGO foi substituído por tampão fosfato na amostra branco.

#### 4.6 Atividade antioxidante

Para analisar o potencial antioxidante do EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA, foram adotados os métodos descritos por Franco e outros (2019b). As diluições das amostras e do controle positivo em etanol foram realizadas conforme o método seguido: 10 mg/mL para o ensaio de capacidade de redução do ferro (FRAP – do inglês *Ferric reducing antioxidant power*) e sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); e 100 µg/mL para o teste de capacidade de sequestro do radical peroxil (ORAC – do inglês *Oxygen radical absorbance capacity*). As amostras foram serialmente diluídas a partir da concentração de 10 mg/mL para a determinação do IC<sub>50</sub> no ensaio DPPH. Os resultados foram apresentados em porcentagem da capacidade antioxidante para o ensaio DPPH e micromol equivalentes de Trolox (µmol ET/g) para os ensaios FRAP e ORAC.

##### 4.6.1 ORAC

O ensaio ORAC baseia-se na análise da capacidade de um composto antioxidante de diminuir a taxa de decaimento da fluorescência promovida pela oxidação de um substrato (sonda fluorescente) pelo radical peroxil produzido via 2,2'azobis (2-amidinopropano) dicloridrato (LITESCU et al., 2014). EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA foram incubados

com fluoresceína 0,085 mM por 15 minutos à temperatura ambiente. Logo, 2,2'azobis (2-amidinopropano) dicloridrato 153 mM foi adicionado à mistura e a fluorescência (485 nm<sub>ex</sub>/528 nm<sub>em</sub>) foi mensurada por 90 minutos a 37 °C (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Os reagentes utilizados neste ensaio foram diluídos em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4. A capacidade antioxidante das amostras foi calculada a partir de uma curva analítica construída usando Trolox como padrão. Tampão fosfato e ácido ascórbico foram usados como controles negativo e positivo, respectivamente.

#### 4.6.2 FRAP

O ensaio FRAP consiste na análise do potencial redutor de um composto antioxidante pela sua reação com o complexo Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (forma férrica). Esta interação culmina na produção do complexo de coloração azul-escuro Fe<sup>2+</sup>-TPTZ (forma ferrosa) que pode ser quantificada por colorimetria (ANTOLOVICH et al., 2002). EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA foram misturados com reagente FRAP (tampão acetato de sódio 300 mM (pH 3,6), 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM e cloreto férrico 20 mM – 10:1:1) e incubados por 6 minutos a 37 °C. A absorbância foi mensurada a 593 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). Uma curva analítica, construída com Trolox como padrão, foi utilizada para determinar a capacidade antioxidante. Tampão acetato de sódio e ácido ascórbico foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

#### 4.6.3 DPPH

O ensaio com o radical livre DPPH baseia-se na transferência de elétrons, promovendo a formação de uma solução violeta. Na presença de antioxidantes, o DPPH é reduzido formando uma solução incolor (HUANG; OU; PRIOR, 2005). EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA foram misturados com solução metanólica de DPPH 60 mM e incubados a 30 °C por 20 minutos na ausência de luz. Posteriormente, a absorbância foi mensurada a 517 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). A capacidade antioxidante foi calculada a partir da seguinte equação:

$$DPPH (\%) = \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle} - A_{branco}} \times 100$$

Equação 3

onde *A amostra* representa a absorvância do DPPH + amostra/controle positivo, *A controle* é a absorvância da solução de DPPH e *A branco* representa a absorvância da amostra em metanol (sem DPPH). Metanol e ácido ascórbico foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente.

## 4.7 Análise *ex vivo* em tecido hepático

### 4.7.1 Processamento do tecido hepático

As análises *ex vivo* foram conduzidas adotando o método de indução de oxidação tecidual por Fe<sup>2+</sup>-ascorbato descrito por Justino e outros (2019). Camundongos C57BL/6 utilizados para este ensaio foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), possuíam de 6-8 semanas de vida e pesavam cerca de 20g. Os camundongos foram mantidos em condição padrão de temperatura (23-26°C), água e alimento *ad libitum*. Para a realização do experimento, estes animais foram eutanasiados (CEUA n.º 105/18) e o fígado removido e armazenado a -70 °C até o momento da realização dos ensaios. As amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato-salino (PBS) (1:10) e então centrifugadas a 3.000xg por 10 minutos a 4 °C. Para os testes de oxidação *ex vivo*, o sobrenadante obtido após centrifugação foi incubado por 60 minutos a 37 °C com sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub>) 0,01 mM e ácido ascórbico 0,1 mM somente (Tecido Hepático Oxidado – THO), e com a adição simultânea das frações orgânicas de *A. humile* (DCM, AcOEt, ButOH) e CQA nas concentrações de 500, 50 e 5 µg/mL. Estas amostras, submetidas ao processo de oxidação tecidual, e uma amostra controle (somente PBS), foram usadas para os testes descritos abaixo.

### 4.7.2 Atividade antioxidante (FRAP)

A análise da capacidade antioxidante total em tecido hepático foi realizada por meio do ensaio FRAP. Para tal, as amostras foram incubadas com tampão acetato de sódio 300 mM (pH 3,6), TPTZ 10 mM e cloreto de ferro (FeCl<sub>3</sub>) 20 mM (10:1:1) por 6 minutos a 37 °C e a absorvância foi mensurada a 593 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA) (FRANCO et al., 2020). A porcentagem de atividade (PA) foi calculada por meio da seguinte equação:

$$PA(\%) = \frac{A \text{ controle} - A \text{ amostra}}{A \text{ controle}} \times 100$$

Equação 4

onde *A controle* representa o valor da absorbância da amostra branco e *A amostra* é a absorbância das amostras/controle. As amostras tratadas (THO + frações de *A. humile*/CQA) foram comparados com uma amostra sem tratamento (somente THO).

#### 4.7.3 Inibição da peroxidação lipídica

Este ensaio foi conduzido seguindo o método modificado descrito por Justino e outros (2018). As amostras foram incubadas com ácido tricloroacético (TCA) 10% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% por 15 minutos em banho-maria a 100 °C. Logo, a mistura foi centrifugada a 3.000xg por 10 minutos e a absorbância foi mensurada a 532 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). A porcentagem da atividade foi calculada por meio da Equação 4, onde *A controle* representa o valor da absorbância da amostra branco e *A amostra* é a absorbância das amostras/controle.

#### 4.7.4 Conteúdo de grupos tióis

Para a análise da capacidade de preservação de grupos tióis, as amostras foram incubadas com tampão fosfato 1 mM (pH 7,4) e solução de ácido ditionitrobenzóico (DTNB) 10 mM (diluído em tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 8,0) por 30 minutos e a absorbância foi mensurada a 412 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA) (AKSENOV e MARKESBERY, 2001). A porcentagem de atividade foi calculada a partir da Equação 4, onde *A controle* representa o valor da absorbância da amostra branco e *A amostra* é a absorbância das amostras/controle.

#### 4.7.5 Inibição da produção de EROs

As amostras foram incubadas com acetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH-DA) 10µM e tampão tris-HCl 5 mM (pH 7,4) por 3 minutos a 37 °C e a intensidade da fluorescência foi mensurada a 474nm<sub>ex</sub>/530nm<sub>em</sub> (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Os resultados são apresentados como área sob a curva (ASC) calculada por meio da seguinte equação:

$$ASC = \frac{A \text{ controle} - A \text{ amostra}}{A \text{ controle}} \times 100$$

Equação 5

onde *A controle* representa o valor da absorbância da amostra branco e *A amostra* é a absorbância das amostras/controle.

#### 4.8 Viabilidade celular

Macrófagos RAW 264,7 cultivados em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (10%; Gibco), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) foram utilizados para avaliar o potencial citotóxico das frações e de CQA. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços onde as células ( $0,05 \times 10^6$  por poço) foram tratadas com três concentrações (10, 1 e 0,1 µg/mL) de CQA e das frações DCM, AcOEt e ButOH por 24h. Em seguida, as células foram incubadas com 100 µL de solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) à concentração de 5 mg/mL por 2h. Logo, dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado e a absorbância mensurada a 570 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). A viabilidade celular foi calculada considerando as células não tratadas com as frações/CQA como 100% de viabilidade.

#### 4.9 Análise por HPLC-ESI-MS/MS

A identificação dos compostos presentes nas três frações que obtiveram os melhores resultados nos ensaios conduzidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa com ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MS/MS) (Agilent Q-TOF, modelo 6520). O sistema de solventes usado consistiu em uma solução de metanol-água (4:1) com taxa de fluxo configurada em 200 µl/h. Nitrogênio gasoso foi usado como gás de secagem, com taxa de fluxo configurada em 8 L/minuto, e como gás nebulizador a 58 psi. A temperatura do nebulizador foi configurada em 200 °C e um potencial de 4,5 kV foi empregado no capilar. A energia de impacto do elétron foi configurada em 20, 25 e 30 eV. As configurações do HPLC foram: coluna modelo Agilent Zorbax 50 x 2,1 mm, partículas de 1,8 µm e diâmetro do poro de 110 Å; fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) (A) e metanol (B). O sistema solvente de gradiente foi configurado em: 2% (0 minuto); 98% (0 – 15 minutos); 100% (15 – 17 minutos); 2% (17 – 22 minutos), com fluxo de 0,35 mL/minuto e detecção nos comprimentos de onda UV de 280 e 360 nm. Os dados foram obtidos nos modos negativo e positivo com ajuste para uma faixa de 20 – 1000 m/z. Para a análise dos resultados obtidos por HPLC-ESI-MS/MS, foi utilizado o *software* Agilent Mass Hunter, e os íons

moleculares e os seus fragmentos foram comparados com dados da literatura. Para a identificação das moléculas presentes nas frações testadas (DCM, AcOEt e ButOH), foram utilizados os dados do erro obtido a partir dos valores teóricos e observados de m/z.

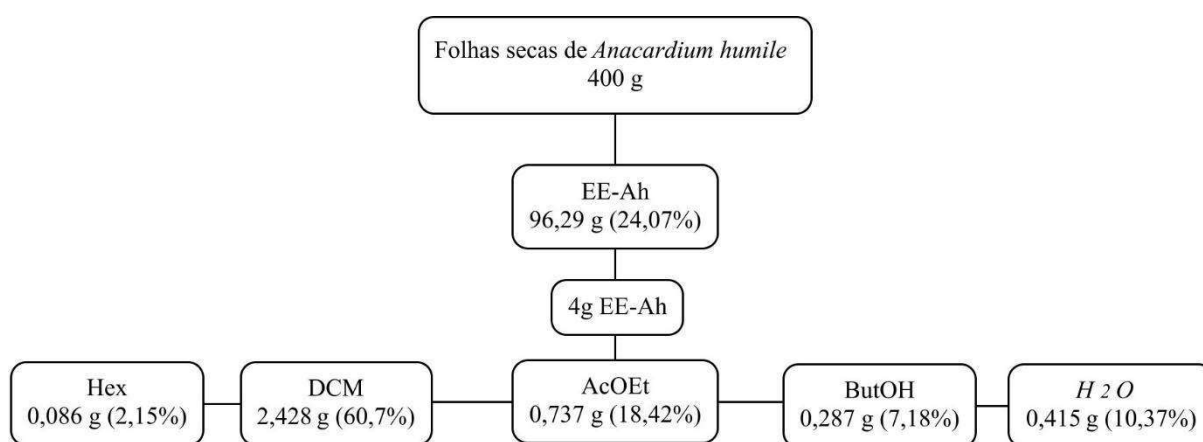
#### **4.10 Análise estatística**

As análises estatísticas bem como a plotagem dos gráficos foram feitas no *software* GraphPad Prism 9.0<sup>®</sup>. Os testes foram executados em triplicata e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. O teste paramétrico one-way ANOVA, teste Tukey de múltiplas comparações e o teste de Dunnett foram usados para calcular a significância das diferenças. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando  $P < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Rendimento do extrato e frações

O rendimento obtido do processo de extração e fracionamento das folhas de *A. humile* são exibidos na Fig. 2. Foram utilizados 400 g de folhas secas e trituradas de *A. humile* para obtenção do EE-Ah e o rendimento alcançado foi de 24,07% (96,29 g). Para o fracionamento do EE-Ah, 4 g do extrato foram utilizados e os rendimentos alcançados foram: 2,15% Hex; 60,7% DCM; 18,42% AcOEt; 7,18% ButOH; e 10,37% H<sub>2</sub>O.



**Fig. 2** Rendimento do EE-Ah e de suas frações orgânicas. EE-Ah: extrato etanólico de *A. humile*; Hex: fração de hexano; DCM: fração de diclorometano; AcOEt: fração de acetato de etila; ButOH: fração de n-butanol; e H<sub>2</sub>O: fração de água. *Nota:* A massa obtida após o fracionamento é apresentada em gramas (g) e o rendimento é mostrado em porcentagem (%).

### 5.2 O extrato das folhas de *A. humile* e suas frações orgânicas apresentam notável quantidade de fenóis totais e flavonoides

O conteúdo de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados presentes em EE-Ah e suas frações orgânicas são mostrados na Tabela 1. Todas as frações, exceto Hex, apresentaram quantidade de fenóis totais acima de 115 mg EAG/g. Quanto ao conteúdo de flavonoides, as frações AcOEt, DCM e ButOH apresentaram os maiores valores ( $58,41 \pm 0,11$ ;  $55,18 \pm 2,66$  e  $43,18 \pm 3,39$  mg EQ/g, respectivamente). Já os taninos condensados estavam presentes em maior quantidade nas frações H<sub>2</sub>O, AcOEt e ButOH ( $17,68 \pm 3,18$ ;  $13,44 \pm 2,78$  e  $13,31 \pm 3,84$  mg/EC, respectivamente).

**Tabela 1** Conteúdo de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados em EE-Ah e suas frações orgânicas.

Amostras	Fenóis totais (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	Taninos condensados (mg EC/g)
EE-Ah	165,49 ± 3,49 <sup>a</sup>	28,83 ± 0,00 <sup>a</sup>	21,90 ± 1,30 <sup>a</sup>
Hex	28,04 ± 3,23 <sup>b</sup>	14,80 ± 3,07 <sup>b</sup>	0,01 ± 0,03 <sup>b</sup>
DCM	115,22 ± 5,26 <sup>c</sup>	55,18 ± 2,66 <sup>c</sup>	7,32 ± 1,16 <sup>bc</sup>
AcOEt	138,62 ± 2,76 <sup>c</sup>	58,41 ± 0,11 <sup>c</sup>	13,44 ± 2,78 <sup>ac</sup>
ButOH	118,46 ± 13,79 <sup>c</sup>	43,18 ± 3,39 <sup>d</sup>	13,31 ± 3,84 <sup>ac</sup>
H <sub>2</sub> O	134,10 ± 6,45 <sup>c</sup>	10,14 ± 1,00 <sup>b</sup>	17,68 ± 3,18 <sup>a</sup>

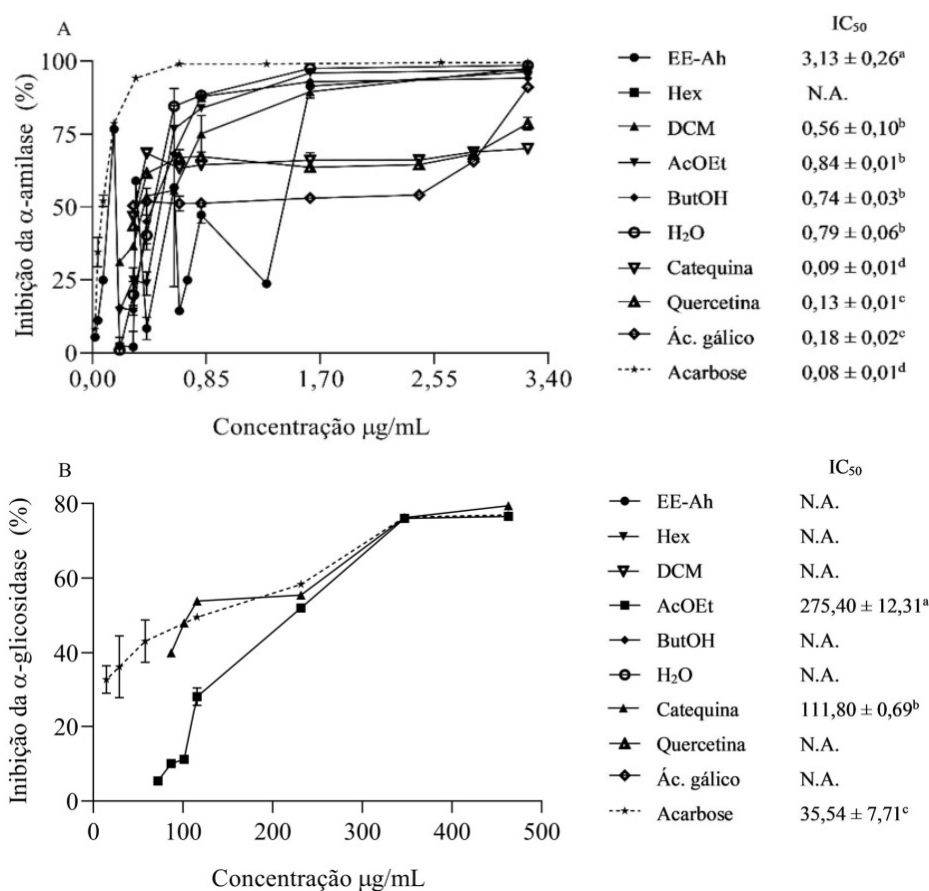
Nota: EE-Ah: extrato etanólico de *A. humile*; Hex: fração de hexano; DCM: fração de diclorometano; AcOEt: fração de acetato de etila; ButOH: fração de n-butanol; e H<sub>2</sub>O: fração de água. Valores são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa na mesma coluna (p<0,05).

### 5.3 *A. humile* apresenta potencial inibitório frente a enzima $\alpha$ -amilase

Uma análise da capacidade de EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA para inibir as enzimática  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase foi conduzida e os resultados são apresentados na Fig. 3. Quanto ao efeito inibitório em  $\alpha$ -amilase, o controle positivo acarbose foi capaz de inibir a enzima em 99,52% ± 0,15 à concentração de 3,25  $\mu$ g/mL, enquanto as frações de EE-Ah, exceto Hex, inibiram mais de 94% à mesma concentração (H<sub>2</sub>O: 98,54% ± 0,14; DCM: 97,55% ± 0,42; AcOEt: 96,98% ± 0,11 e ButOH 94,18% ± 0,66). Dentre as frações, DCM apresentou o menor valor de IC<sub>50</sub> (0,56 ± 0,10  $\mu$ g/mL), seguida por ButOH (0,74 ± 0,03  $\mu$ g/mL) (Fig. 3A). O extrato bruto (3,13 ± 0,26  $\mu$ g/mL) exibiu a menor capacidade inibitória de  $\alpha$ -amilase. Catequina (0,09 ± 0,01  $\mu$ g/mL) apresentou o menor valor de IC<sub>50</sub>, sem diferença significativa quando comparado com o controle positivo acarbose (0,08 ± 0,01  $\mu$ g/mL) (p<0,05) (Fig. 3A).

Quanto ao teste de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, somente AcOEt (275,40 ± 12,31  $\mu$ g/mL) e catequina (111,8 ± 0,69  $\mu$ g/mL) apresentaram resultados relevantes. Todavia, ambas amostras apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o controle positivo acarbose (35,54 ± 7,71  $\mu$ g/mL) (Fig. 3B).



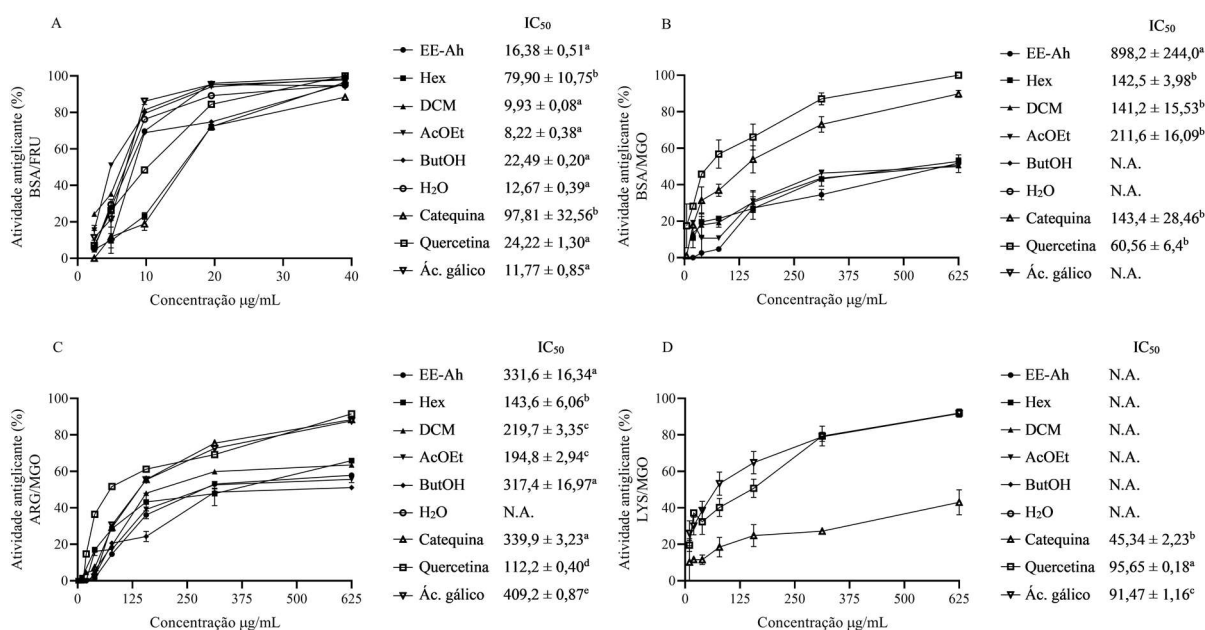


**Fig. 3** Análise da inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase (A) e  $\alpha$ -glicosidase (B) por EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA. EE-Ah: extrato etanólico de *A. humile*; Hex: fração de hexano; DCM: fração de diclorometano; AcOEt: fração de acetato de etila; ButOH: fração de n-butanol; e H<sub>2</sub>O: fração de água. Valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4 O extrato de *A. humile* e suas frações orgânicas diminuem a glicação proteica e a formação de AGEs

A análise do potencial antiglicante de EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA foi realizada por meio de quatro métodos que utilizam frutose (FRU) e metilglioxal (MGO) como agentes glicantes e BSA, arginina (ARG) e lisina (LYS) como alvos da glicação. No método BSA/FRU, todas as amostras testadas apresentaram baixos valores de IC<sub>50</sub> e foram capazes de inibir a glicação de BSA pela FRU em 88% à concentração de 40  $\mu$ g/mL (Fig. 4A). As frações DCM, AcOEt, H<sub>2</sub>O e ButOH (IC<sub>50</sub> 9,93  $\pm$  0,08; 8,22  $\pm$  0,38; 12,67  $\pm$  0,39 e 22,49  $\pm$  0,20  $\mu$ g/mL, respectivamente), assim como o ácido gálico (IC<sub>50</sub> 11,77  $\pm$  0,85  $\mu$ g/mL), apresentaram elevado potencial antiglicante neste método, visto que os valores de IC<sub>50</sub> alcançados por estas amostras não apresentaram diferença significativa quando comparadas com o controle positivo quercetina (IC<sub>50</sub> 24,22  $\pm$  1,30  $\mu$ g/mL) (Fig. 4A). Quanto ao método BSA/MGO, as frações Hex,

DCM e AcOEt ( $IC_{50}$   $142,5 \pm 3,98$ ;  $141,2 \pm 15,53$  e  $211,6 \pm 16,09$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), bem como catequina ( $IC_{50}$   $143,4 \pm 28,46$   $\mu\text{g/mL}$ ), apresentaram notável capacidade antiglicante visto que não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle positivo quercetina ( $IC_{50}$   $60,56 \pm 6,4$   $\mu\text{g/mL}$ ) (Fig. 4B). Neste método, somente a fração  $\text{H}_2\text{O}$  e o ácido gálico não apresentaram capacidade antiglicante. No método ARG/MGO, as frações Hex, AcOEt e DCM ( $IC_{50}$   $143,6 \pm 6,06$ ;  $194,8 \pm 2,94$  e  $219,7 \pm 3,35$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) apresentaram os menores valores de  $IC_{50}$ , ao passo que a fração  $\text{H}_2\text{O}$  não apresentou atividade (Fig. 4C). Entretanto, nenhuma das frações, catequina ou ácido gálico foi estatisticamente similar ao controle positivo quercetina ( $IC_{50}$   $112,2 \pm 0,40$   $\mu\text{g/mL}$ ). Quanto ao método LYS/MGO, EE-Ah e suas frações orgânicas não demonstraram atividade, sendo somente a catequina e o ácido gálico ( $IC_{50}$   $45,34 \pm 2,23$  e  $91,47 \pm 1,16$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) capazes de inibir o processo de glicação (Fig. 4D). Catequina e ácido gálico apresentaram valores de  $IC_{50}$  menores quando comparados com o controle positivo quercetina.

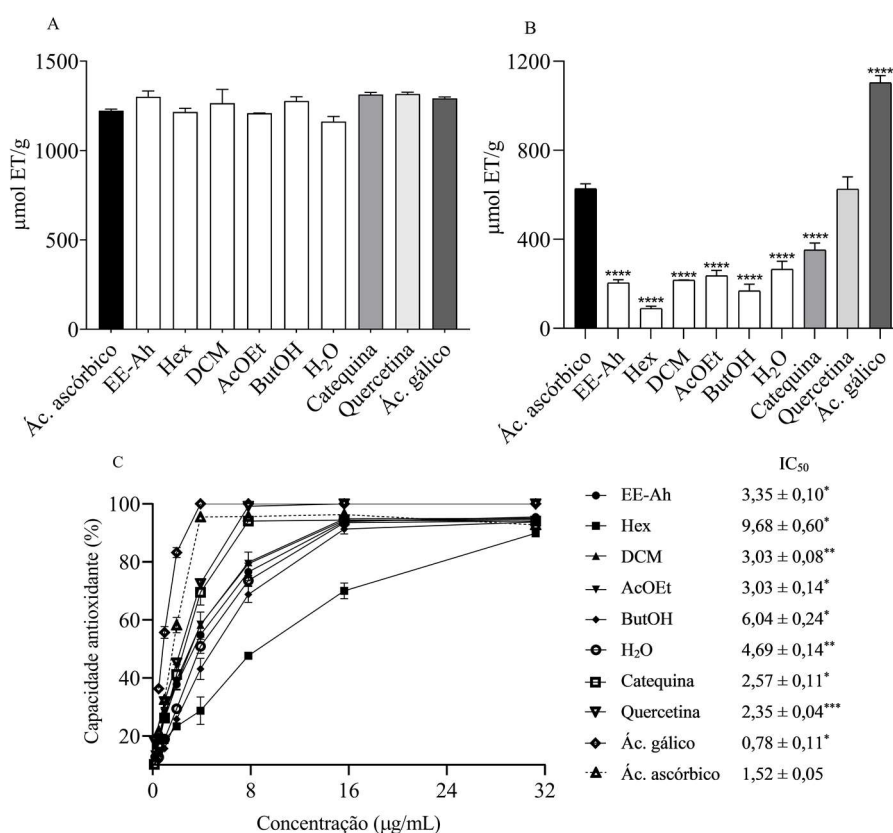


**Fig. 4** Potencial antiglicante de EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA pelos métodos BSA/FRU (A), BSA/MGO (B), ARG/MGO (C) e LYS/MGO (D). EE-Ah: extrato etanólico de *A. humile*; Hex: fração de hexano; DCM: fração de diclorometano; AcOEt: fração de acetato de etila; ButOH: fração de n-butanol;  $\text{H}_2\text{O}$ : fração de água; CQA: catequina, quercetina e ácido gálico. Todas as amostras foram serialmente diluídas em etanol a partir de 5 mg/mL. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Nota: N.A. significa nenhuma atividade.

## 5.5 Potencial antioxidante do extrato das folhas de *A. humile* e de suas frações orgânicas

O potencial antioxidante de EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA foram avaliadas pelos métodos ORAC, FRAP e DPPH (Fig. 5). No teste ORAC, todas as amostras (EE-Ah  $1.300,11 \pm 33,04$ ; Hex  $1.215,57 \pm 20,43$ ; DCM  $1.264,85 \pm 76,9$ ; AcOEt  $1.208,78 \pm 1,20$ ; ButOH

1.277,17  $\pm$  23,43; H<sub>2</sub>O 1.162,47  $\pm$  28,24; quercetina 1.316,25  $\pm$  0,21; catequina 1.313,28  $\pm$  12,02 e ácido gálico 1.291,19  $\pm$  8,41  $\mu\text{mol ET/g}$ ) apresentaram notável potencial para inibir a oxidação causada pelo radical peroxil, e os valores obtidos não apresentaram diferença significativa quando comparados ao controle positivo ácido ascórbico (1.223,22  $\pm$  8,41  $\mu\text{mol ET/g}$ ) (Fig. 5A). Quanto ao ensaio FRAP, as frações DCM, AcOEt e H<sub>2</sub>O (216,71  $\pm$  1,04; 236,21  $\pm$  23,86 e 265,07  $\pm$  36,32  $\mu\text{mol ET/g}$ , respectivamente) se destacaram, no entanto, todas as frações e o extrato bruto apresentaram diferença significativa quando comparados com o controle positivo ácido ascórbico (627,27  $\pm$  21,84  $\mu\text{mol ET/g}$ ) (Fig. 5B). A quercetina (625,66  $\pm$  55,30  $\mu\text{mol ET/g}$ ) não apresentou diferença significativa quando comparado com o ácido ascórbico, ao passo que o ácido gálico (1.103,52  $\pm$  31,48  $\mu\text{mol ET/g}$ ) exibiu atividade antioxidante mais elevada do que o controle positivo ( $p < 0,001$ ) (Fig. 5B). No ensaio DPPH, as frações DCM e AcOEt (3,03  $\pm$  0,08 e 3,03  $\pm$  0,14  $\mu\text{g/mL}$ ), bem como a catequina, quercetina e o ácido gálico (CQA) (2,57  $\pm$  0,1; 2,35  $\pm$  0,04 e; 0,78  $\pm$  0,11  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) apresentaram os menores valores de IC<sub>50</sub>. O ácido gálico foi a única amostra a apresentar o valor de IC<sub>50</sub> menor do que o controle positivo ácido ascórbico (1,52  $\pm$  0,05  $\mu\text{g/mL}$ ) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 5C).

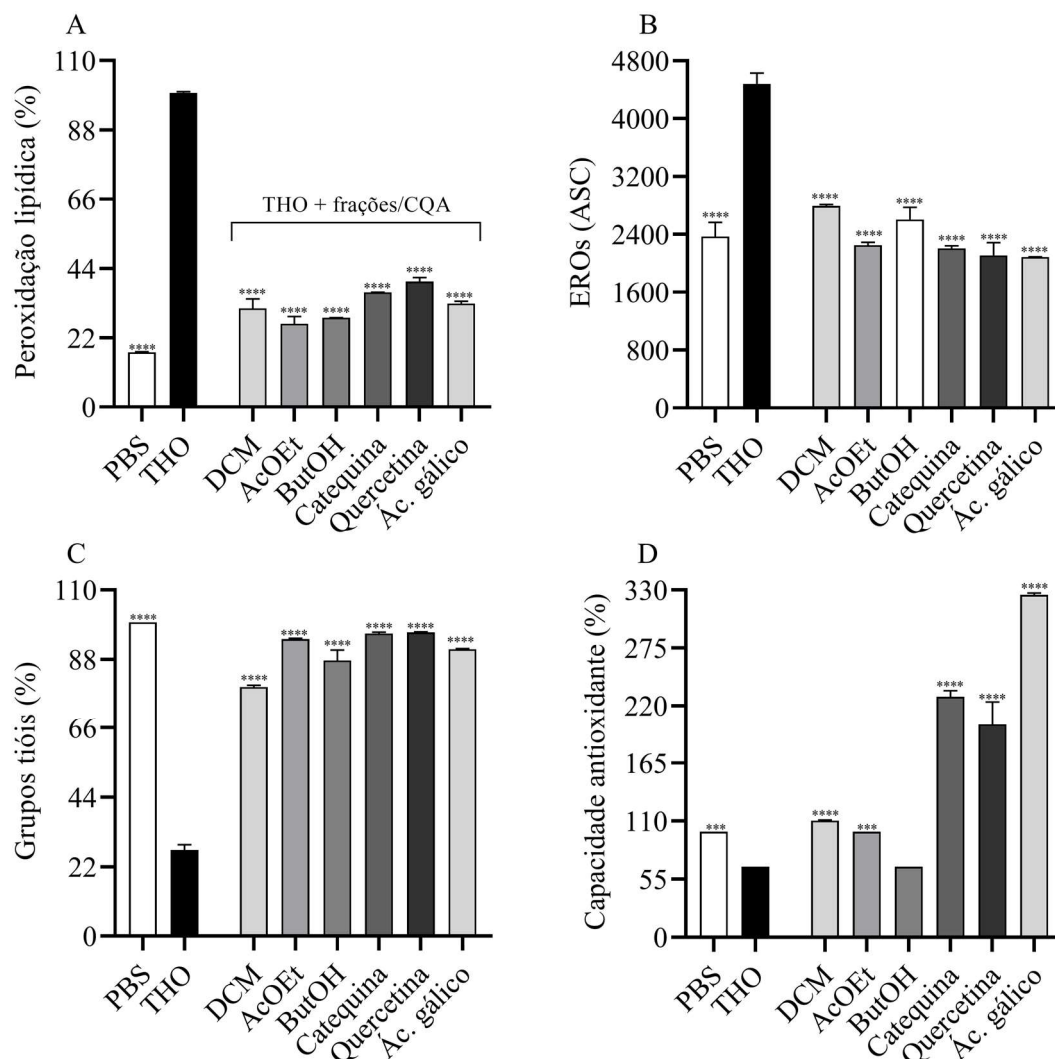


**Fig. 5** Potencial antioxidante de EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA pelos métodos ORAC (A), FRAP (B) e DPPH (C). EE-Ah: extrato etanólico de *A. humile*; Hex: fração de hexano; DCM: fração de diclorometano; AcOEt: fração de acetato de etila; ButOH: fração de n-butanol; e H<sub>2</sub>O: fração de água. Valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado com o controle positivo (ácido ascórbico).

## 5.6 O extrato de *A. humile* e suas frações orgânicas preservam grupos tióis e previnem a peroxidação lipídica e a produção de EROs em tecido hepático

A análise do potencial antioxidante de três frações do EE-Ah e de CQA em tecido hepático são apresentados na Fig. 6. A atividade antioxidante das frações e de CQA foram comparadas com uma amostra controle de tecido hepático oxidado (THO) não tratado com as frações ou CQA. O tecido hepático tratado com as frações e CQA a 500 µg/mL apresentaram baixa peroxidação lipídica (abaixo de 40%) quando comparadas com THO (Fig. 6A). Todavia, concentrações menores como 50 e 5 µg/mL não apresentaram atividade relevante, exceto a amostra tratada com quercetina a 50 µg/mL que exibiu  $42\% \pm 1,14$  de peroxidação lipídica, valor estatisticamente diferente quando comparado com THO ( $p < 0,05$ ) (Suplementar S1). A diminuição de EROs também foi observada nas amostras tratadas com as frações e com CQA na concentração de 500 µg/mL (Fig. 6B), e em CQA a 50 µg/mL (Suplementar S2), que obtiveram valores de área sob a curva (ASC) estatisticamente menores quando comparadas com THO.

Quanto ao potencial para preservar grupos tióis, todas as amostras tratadas com as frações e com CQA à concentração de 500 µg/mL apresentaram atividade relevante e preservaram os grupos tióis acima de 79% (Fig. 6C). As amostras tratadas com os inibidores à concentração de 50 e 5 µg/mL não apresentaram resultados significativos (Suplementar S3). Com relação a capacidade antioxidante, avaliada por meio do ensaio FRAP, as moléculas CQA e as frações DCM e AcOEt à concentração de 500 µg/mL apresentaram os melhores resultados quanto suas capacidades de inibir a oxidação do tecido hepático ( $p < 0,0001$  quando comparado com THO) (Fig. 6D). ButOH não obteve resultado significativo visto que a porcentagem da capacidade oxidante desta fração foi estatisticamente similar ao THO (Fig. 6D). Os tratamentos realizados com as frações e CQA a 50 e 5 µg/mL não apresentaram resultados significativos (Suplementar S4).

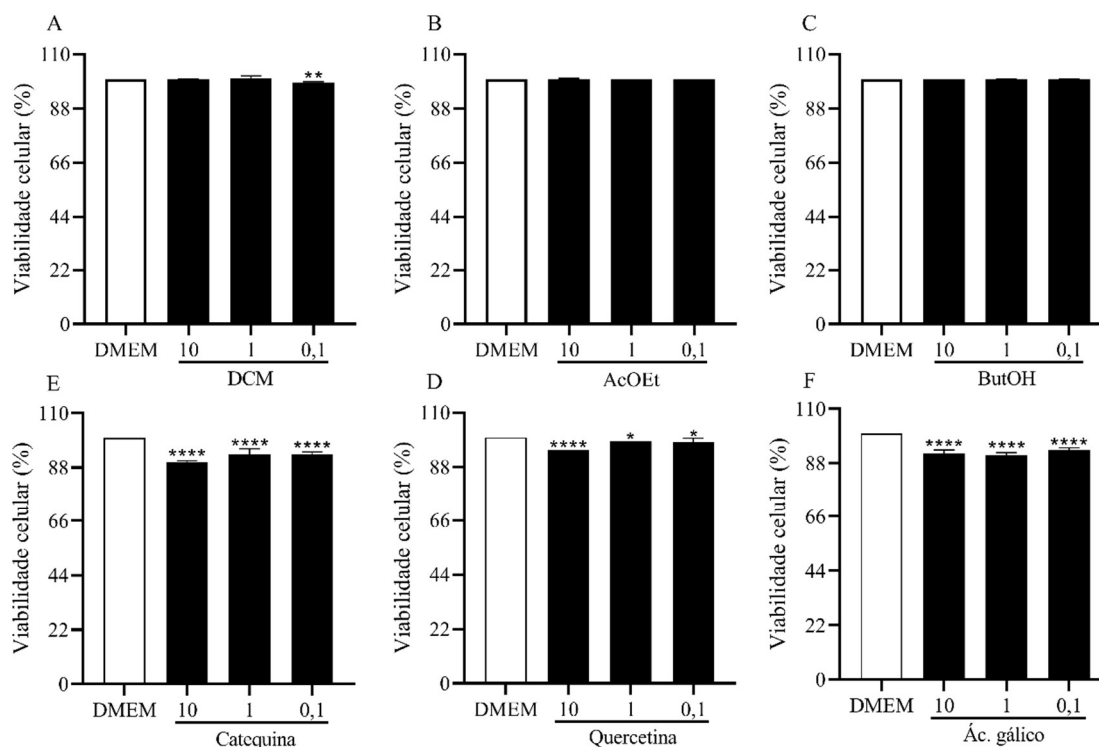


**Fig. 6** Avaliação das propriedades antioxidantes das frações orgânicas de *A. humile* e de CQA em ensaio *ex vivo* de estresse oxidativo em tecido hepático. Peroxidación lipídica (A), formação de EROs (B), concentração de grupos tióis (C) e capacidade antioxidante (D) foram avaliadas. As barras estão apresentadas como PBS - tecido hepático não oxidado; THO - tecido hepático oxidado; e demais barras - amostras THO tratadas com frações orgânicas de *A. humile*/CQA. DCM: fração de diclorometano; AcOEt: fração de acetato de etila; ButOH: fração de n-butanol; e CQA: catequina, quercetina e ácido gálico. Todas as amostras foram diluídas em etanol a 500 µg/mL. Os valores são expressos como média ± desvio padrão. \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001 e \*\*\*\* p <0,0001 quando comparado ao controle (THO).

### 5.7 O extrato de *A. humile* e suas frações orgânicas não apresentam citotoxicidade em macrófagos RAW 264,7

Para avaliar o potencial citotóxico das frações orgânicas de *A. humile* e das moléculas testadas neste estudo, macrófagos RAW 264,7 foram tratados com CQA e diferentes concentrações de DCM, AcOEt e ButOH, frações que apresentaram maior capacidade antioxidante além de promissora capacidade inibitória da enzima  $\alpha$ -amilase e da formação de AGEs. Todas as frações testadas apresentaram viabilidade celular acima de 98% na

concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto CQA mostrou viabilidade celular acima de 90% na mesma concentração (Fig. 7). É importante ressaltar que a viabilidade celular dos tratamentos realizados com as frações a 10  $\mu\text{g/mL}$  não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle negativo DMEM.

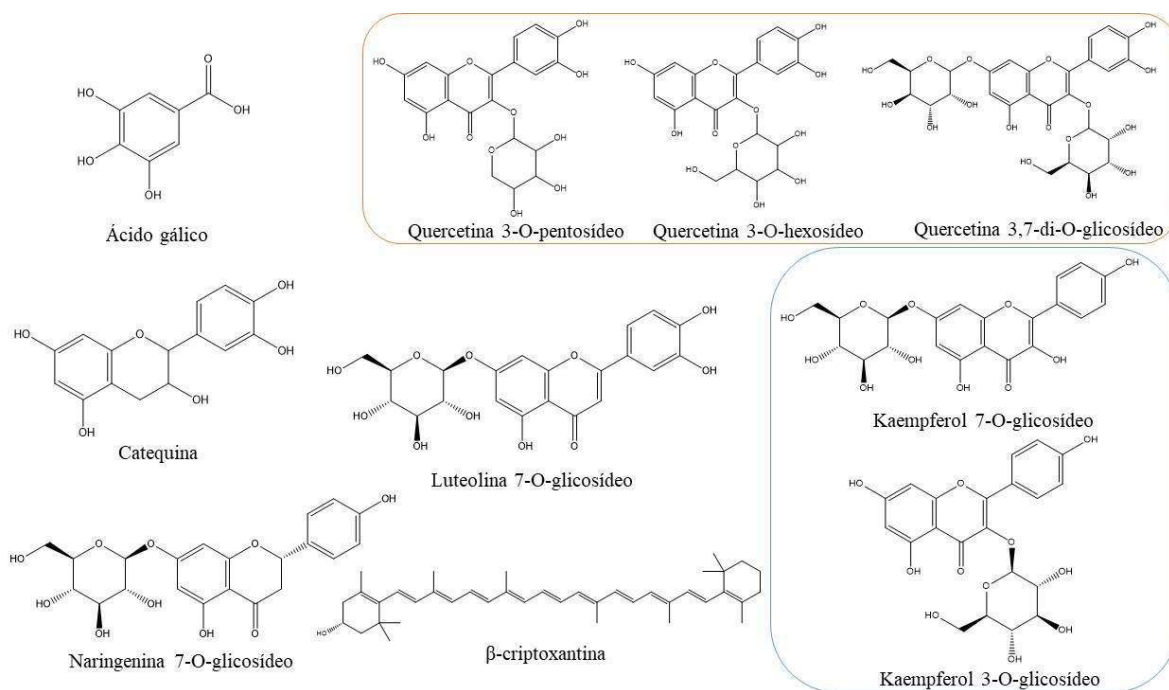


**Fig. 7** Viabilidade celular de DCM: fração de diclorometano (A), AcOEt: fração de acetato de etila (B), ButOH: fração de n-butanol (C), quercetina (D), catequina e (E) ácido gálico (F). Todas as frações foram diluídas em uma solução de DMSO/água (1:3) a 10, 1 e 0,1  $\mu\text{g/mL}$ . Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão.  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado com o controle positivo (DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco).

## 5.8 Análise do extrato etanólico de *A. humile* e de suas frações orgânicas por HPLC-ESI-MS/MS

Visto que, dentre os ensaios conduzidos, as frações DCM, AcOEt e ButOH se destacaram quanto suas capacidades antioxidantes além do notável potencial para inibir  $\alpha$ -amilase e glicação proteica (formação de AGEs), uma análise por HPLC-ESI-MS/MS foi conduzida de modo a identificar as moléculas bioativas responsáveis pelas atividades biológicas investigadas neste estudo. As moléculas foram identificadas por meio da interpretação de dados sobre o tempo de retenção, valores de erro, perfil de padrões de fragmentação, espectro de massa sequencial e informações obtidas na literatura. A Tabela 2 expõe a ocorrência das moléculas nas três frações de *A. humile* analisadas.

Dentre as biomoléculas encontradas, destacam-se aquelas já conhecidas pelo potencial antioxidante como  $\beta$ -criptoxantina (BURRI; LA FRANO; ZHU, 2016), glicosídeos de quercetina (quercetina 3-O-pentosídeo, quercetina 3-O-hexosídeo, quercetina 3,7-di-O-glicosídeo) (ZHENG et al., 2017), glicosídeos de kaempferol (kaempferol 3-O-glicosídeo e kaempferol 7-O-glicosídeo) (WANG et al., 2018), luteolina 7-O-glicosídeo (SONG; PARK, 2014), ácido gálico (KIM, 2007), catequina (GRZESIK et al., 2018) e naringenina 7-O-glicosídeo (HAN et al., 2008).



**Fig. 8** Moléculas de importante potencial antioxidante encontradas nas frações de DCM, AcOEt e ButOH por HPLC-ESI-MS/MS. As moléculas destacadas em linhas retangulares representam glicosídeos de uma mesma molécula.

**Tabela 2.** Compostos identificados nas frações DCM, AcOEt e ButOH do extrato etanólico das folhas de *A. humile* por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo de ionização).

Compostos sugeridos	Tempo de retenção (min)	Fórmula [M-H] <sup>-</sup>	Massa molecular exata	Massa calculada para [M-H] <sup>-</sup>	m/z de [M-H] <sup>-</sup>	Erro (ppm)	m/z para fragmentos de [M-H] <sup>-</sup>	Referências
<b>Fração de diclorometano (DCM)</b>								
Catequina	0.817	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290.08	289.0578	289.0567	-3.78	207.1235; 165.5584	(MITTAL et al., 2013)
Ácido gálico	1.588	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170.02	169.0149	169.0148	-0.59	125.0262; 107.0091	(SINGH et al., 2016)
Kaempferol-3-O-glicosídeo-7-rhamnosídeo	1.857	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	594.16	593.1321	593.1328	1.18	285.0435	(IBRAHIM et al., 2015)
Kaempferol-3,7-dirhamnosídeo	3.047	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	578.16	577.1366	577.1369	0.52	285.0794	(IBRAHIM et al., 2015)
Procianidina B2	3.047	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	578.14	577.1366	577.1369	0.52	451.0982; 407.0771; 289.0751; 243.0729; 125.0243	(FRANCO et al., 2019a)
Isoquercitrina	6.267	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464.10	463.0905	463.0905	0.00	301.0363; 300.0281; 271.0265; 255.0282; 178.9976; 151.0055	(IBRAHIM et al., 2015)
Quercetina-3-O-pentosídeo	6.401	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	434.08	433.0798	433.0798	0.00	301.0371; 300.0290; 271.0247; 255.0335; 178.9995; 151.0083	(CUNHA et al., 2017)
Kaempferol-3-O-glicosídeo	6.669	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448.10	447.0954	447.0954	0.00	285.0387	(CUNHA et al., 2017)
Luteolina-7-O-glicosídeo	6.669	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448.10	447.0954	447.0954	0.00	327.0569; 284.0351; 355.0346; 243.0457; 241.2000	(IBRAHIM et al., 2015)
Quercetina-3,7-di-O-glicosídeo	6.937	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	626.15	625.1243	625.1244	0.16	301.0199; 463.0987	(IBRAHIM et al., 2015)
β-Criptoxantina	8.832	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O	552.43	551.0817	551.0814	- 0.54	480,0473; 430,9392	(DE ABREU et al., 2013)
<b>Fração de acetato de etila (AcOEt)</b>								
Ácido protocatecuico	1.238	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154.02	153.0342	153.0346	2.58	127.3623; 109.4078	(SINGH et al., 2016)
Ácido gálico	2.010	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170.02	169.0135	169.0137	1.18	125.0256; 107.0213	(SINGH et al., 2016)



Miricetina 3-O-hexosídeo	5.720	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	480.09	479.0824	479.0844	4.17	316.0195, 270.0219, 232.5550, 178.9982, 151.0033	(CUNHA et al., 2017)
Quercetina 3-O-hexosídeo	6.270	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464.10	463.0874	463.0868	-1.30	334.2322, 301.0353, 300.0250, 285.5252, 271.0247	(CUNHA et al., 2017)
Kaempferol-7-O-glicosídeo	6.680	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448.10	447.0929	447.0934	1.12	343.0559, 327.0539, 300.0264, 284.0321, 255.0319, 227.0206, 199.0348	(IBRAHIM et al., 2015)
<b>Fração de n-butanol (ButOH)</b>								
Ácido gálico	1.571	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170.02	169.0132	169.0131	-0.59	125.0234; 107.0117	(SINGH et al., 2016)
Ácido anacárdico	2.626	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	348.26	345.0811	345.0825	4.06	301.0834	(CUNHA et al., 2017)
Metil-galato	3.717	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	184.04	183.0286	183.0292	3.28	168.0047; 124.0149	(SINGH et al., 2016)
Miricetina-3-O-hexosídeo	5.729	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	480.09	479.0807	479.0840	3.55	317.0253; 316.0190; 287.0183; 271.0245; 178.9957	(CUNHA et al., 2017)
Isoquercetrina	6.266	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464.10	463.0867	463.0872	1.08	301.0322; 300.0261; 271.0244; 255.0157; 178.9957; 150.9978	(IBRAHIM et al., 2015)
Ácido elágico hexosídeo	6.266	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	464.06	463.0867	463.0867	0.00	300.0261	(SINGH et al., 2016)
Naringenina-7-O-glicosídeo	6.400	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	434.12	433.0760	433.0759	-0.23	271.0238; 150.9999	(CUNHA et al., 2017)
Kaempferol-7-O-glicosídeo	6.852	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448.10	447.0904	477.0942	7.96	327.0271; 284.0395; 255.2312; 227.0424	(IBRAHIM et al., 2015)

## 6 DISCUSSÃO

Na busca por produtos naturais para tratamento de doenças como o DMT2, se destacam aqueles que não são citotóxicos e que possuem componentes capazes de impedir a formação de produtos glicosados e inibir processos oxidativos e a produção de espécies reativas (BINDU; NARENDHIRAKANNAN, 2019; DUTRA et al., 2016). Além disso, compostos que atuam na redução da atividade de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos representam alternativas viáveis para o desenvolvimento de novas terapias que contribuam para o controle do DMT2 e de suas complicações (ABBAS et al., 2019). A vista disso, o presente estudo, por meio de ensaios *in vitro* e *ex vivo*, avaliou as propriedades antidiabéticas do extrato etanólico das folhas de *A. humile*, suas frações orgânicas e três moléculas identificadas nas frações (catequina, quercetina e ácido gálico). Para isso, os constituintes das amostras foram identificados e desafiados quanto aos seus potenciais antioxidantes e suas capacidades para inibir a formação de AGEs e as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase. Além disso, o potencial protetor contra estresse oxidativo em tecido hepático e o potencial citotóxico foram avaliados nas três melhores frações e em CQA.

Os compostos fenólicos, metabólitos especializados encontrados majoritariamente em plantas (BABBAR et al., 2014), desempenham um papel preponderante no tratamento de numerosas doenças metabólicas visto que estas moléculas detêm propriedades antioxidante (KASOTE et al., 2015), antiglicante (ASGHARPOUR DIL; RANJKESH; GOODARZI, 2019), além de potencial para inibir enzimas tais como  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (GONCALVES et al., 2017). A análise fitoquímica do EE-Ah e de suas frações orgânicas evidenciaram a presença expressiva de polifenóis, principalmente nas frações DCM, AcOEt e ButOH (Tabela 1). Além disso, a análise das frações por HPLC-ESI-MS/MS revelou a presença de 11 biomoléculas em DCM, 5 biomoléculas em AcOEt e 8 biomoléculas em ButOH (Tabela 2). Algumas das moléculas encontradas nas frações do EE-Ah possuem papel de destaque, visto que apresentam notório potencial antioxidante como a catequina (HE et al., 2018), quercetina (CRUZ-ZÚÑIGA et al., 2016; XU et al., 2019), ácido gálico (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015), kaempferol (WANG et al., 2018) e naringenina (ZAIDUN; THENT; LATIFF, 2018). Além disso, na fração ButOH foi verificada a presença do ácido anacárdico, um composto fenólico comumente encontrado em espécies do gênero *Anacardium* e que tem se mostrado de grande interesse para o tratamento de doenças dado seu potencial antioxidante (KUBO et al., 2006),

antitumoral (HUANG et al., 2014), bactericida (KUBO; NIHEI; TSUJIMOTO, 2003), gastroprotetor (MORAIS et al., 2010) e inibidor de lipoxigenase (HA; KUBO, 2005).

A utilização de polifenóis para o tratamento do DMT2 e de suas complicações têm sido amplamente discutida na literatura. Segundo Nyambe-Silavwe e outros (2015), a capacidade destas moléculas de inibir enzimas digestivas como  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase é devido sua estrutura química, principalmente pela posição e quantidade de grupos hidroxila ( $\text{OH}^-$ ). Além disso, polifenóis como quercetina e seus glicosídeos, miricetina, naringenina e kaempferol, encontrados em EE-Ah e suas frações orgânicas, apresentam características como estrutura flexível, natureza hidrofóbica, além da capacidade de doar e receber prótons de hidrogênio, o que favorece o potencial inibitório enzimático destas moléculas (RASOULI et al., 2017). Nesse sentido, os compostos fenólicos encontrados nas frações orgânicas de EE-Ah, podem estar relacionados com sua notória habilidade para inibir a enzima  $\alpha$ -amilase. Apesar de o potencial de *A. humile* para inibir a  $\alpha$ -amilase ter sido sugerida por Urzêda e outros (2013) em um estudo que utilizou modelo de ratos com diabetes induzida por aloxana, este é o primeiro trabalho que utiliza ensaio enzimático para elucidar o potencial de *A. humile* para inibir a  $\alpha$ -amilase.

Diversos trabalhos defendem que o desenvolvimento do DMT2 está relacionado com fatores como o aumento da produção de EROs e do estresse oxidativo, assim como a degradação oxidativa de proteínas glicadas (YAMAGISHI et al., 2015; YAN, 2014). EE-Ah, suas frações orgânicas e especialmente CQA apresentaram notória atividade *scavenger* e *quenching* de EROs e produtos glicados. Segundo Sarian e outros (2017), a capacidade antioxidante atribuída a certos compostos fenólicos se deve à presença de grupos hidroxila que são fonte de átomos de hidrogênio capazes de atuar na neutralização de espécies radicais. Moléculas presentes nas frações do EE-Ah como catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol têm como característica estrutural a presença de cinco grupos hidroxila, atributo que fazem desses compostos fenólicos ótimos *scavengers* de radicais livres (SARIAN et al., 2017) e, desse modo, pode explicar a atividade antioxidante observada em EE-Ah e em suas frações orgânicas. Além disso, a estrutura orto-hidroxil (catecol) presente na catequina e quercetina possui papel fundamental no alto potencial antioxidante apresentado por estas moléculas (DE LA CRUZ et al., 2015; POVIE et al., 2010). O presente estudo também evidenciou o potencial antioxidante do ácido gálico nos testes *in vitro* e *ex vivo* conduzidos (Fig. 5 e 6). Tais resultados corroboram estudos anteriores que demonstraram alto potencial antioxidante, antiglicante, anti-inflamatório

e antidiabético do composto fenólico (ASNAASHARI; FARHOOSH; SHARIF, 2014; BENZAAD et al., 2017; KOPJAR et al., 2016; VARIYA; BAKRANIA; PATEL, 2019).

É importante ressaltar que os flavonoides quercetina, kaempferol, luteolina, miricetina e naringenina foram identificadas na forma glicosilada nas frações de *A. humile* (Tabela 2). Segundo Nuutila, Kammiovirta e Oksman-Caldentey (2002), os flavonoides se encontram na natureza principalmente na forma de derivados conjugados de açúcar. Devido à natureza hidrofílica das frações da molécula de açúcar, os glicosídeos de flavonoides apresentam maior solubilidade em água. Além disso, o glicosídeo também influencia no potencial antioxidante dos flavonoides (JEEVITHA et al., 2016; PRAVEENA et al., 2014). Os glicosídeos de quercetina são os flavonoides como maior presença em frutas e vegetais (WILLIAMSON et al., 2000; HERTOOG et al., 1993), e apresentam grande potencial *scavenging* de radicais livres (JEEVITHA et al., 2016). Segundo Jeevitha e outros (2016), três características presentes na estrutura destes glicosídeos são importantes para a atividade *scavenger*, como a presença da porção 3',4' dihidroxi no anel B, ligação dupla em combinação com a função 4-oxo no anel C, e presença dos grupos 3 e 5-hidroxila. Evidências experimentais sugerem que a glicosilação da quercetina atua no aumento do potencial antioxidante e anti-inflamatório do flavonoide (LEGAULT et al., 2011). Praveena e outros (2014) demonstraram que a luteolina apresenta atividade antioxidante inferior quando comparada com um de seus glicosídeos, a orientina. Os autores propõem que a presença do açúcar diminui a carga negativa no átomo de oxigênio em C-3, o que favorece o potencial antioxidante da molécula. Okoth e outros (2013) mostraram que glicosídeos da miricetina apresentam maior capacidade *scavenging* do radical DPPH quando comparado com a miricetina. No entanto, apesar de alguns estudos apontarem que a glicosilação aumenta a capacidade *scavenger* de flavonoides, os dados ainda são insuficientes para concluir sobre a influência da glicosilação na capacidade antioxidante (XIAO, CHEN e CAO, 2014).

Além do potencial antioxidante, a atividade antiglicante de certos compostos os tornam altamente efetivos no tratamento do DMT2 (DURASAMY et al., 2003). Nesse sentido, a capacidade antiglicante do EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA foi avaliada por meio de quatro diferentes métodos, utilizando BSA, arginina e lisina como alvos da glicação. O ensaio de BSA/FRU foi inicialmente conduzido visto que este método permite analisar todos os estágios e aminoácidos alvos da glicação proteica (WANG et al., 2011). Já os ensaios de BSA/MGO e ARG/MGO permitem verificar a habilidade das amostras de reduzir os estágios intermediários da glicação proteica e prevenir a ligação do metilglioxal com o aminoácido

arginina, respectivamente (WANG et al., 2011). Um ensaio utilizando lisina e MGO também foi conduzido com o objetivo de verificar a inibição da formação de AGEs derivados de lisina, como o N $\epsilon$ -(carboxietil)lisina (CEL) e N $\epsilon$ -(carboximetil)lisina (CML) formados pela reação entre MGO e o aminoácido (ZHOU et al., 2015).

O ensaio de BSA/FRU evidenciou considerável potencial antiglicante do EE-Ah e de suas frações orgânicas, especialmente em DCM, AcOEt e Hex. Quanto às moléculas CQA, quercetina e catequina exibiram os melhores resultados (Fig. 4). Nos ensaios onde MGO foi empregado como agente glicante (BSA/MGO, ARG/MGO e LYS/MGO), EE-Ah, suas frações orgânicas e CQA obtiveram resultados menos significativos e com valores de IC<sub>50</sub> mais elevados quando comparados com o ensaio de BSA/FRU. Este resultado é justificado pela elevada reatividade do MGO quando comparado com açúcares como frutose e glicose (THORNALLEY, 2005). Além disso, o composto dicarbonílico MGO possui alta capacidade para reagir com grupos amina e favorecer a formação de *cross-links* entre proteínas (WU; YEN, 2005).

Os polifenóis e flavonoides têm se mostrado potenciais inibidores da glicação proteica e da consequente formação de AGEs (YEH et al., 2017). Estudos defendem que esta propriedade está relacionada com o potencial antioxidante encontrado nestas moléculas, suas capacidades metal-quelante e de MGO *trapping* (captura de MGO), além da habilidade para bloquear o receptor para os produtos finais de glicação proteica (RAGE) (CHEN; VIRK; CHEN, 2016; TAN et al., 2008; YEH et al., 2017). Tais informações podem explicar a notável capacidade antiglicante expressas por DCM e AcOEt, visto que estas frações apresentaram a maior concentração de flavonoides (Tabela 1).

Dentre as moléculas testadas neste estudo, o ácido gálico apresentou importante potencial antiglicante, principalmente no ensaio BSA/FRU. Apesar de as características que explicam o potencial antiglicante deste composto fenólico serem ainda inconclusivas (WU et al., 2010), a presença de diversos grupos hidroxil na estrutura dos ácidos fenólicos, bem como a atividade de MGO *trapping* dessas moléculas podem explicar seu potencial para inibir a glicação proteica (YEH et al., 2017). Além disso, em um estudo conduzido por Wu e Yen (2005), a capacidade antiglicante de 10 flavonoides de fontes naturais foram investigados e os resultados apontaram que a quercetina e a luteolina possuem alto potencial para inibir a formação de AGEs em todos os estágios da glicação proteica. Este resultado corrobora os achados deste estudo e pode explicar o potencial antiglicante observado nas frações DCM e AcOEt.

O fígado é um dos órgãos mais suscetíveis a danos teciduais causados por estresse oxidativo induzido por hiperglicemia (MANNA et al., 2010; MOHAMED et al., 2016). Além dos danos causados por EROs no tecido hepático, como alterações moleculares em lipídios, proteínas e carboidratos, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio pode induzir a apoptose de hepatócitos e liberar componentes pró-inflamatórios que, no que lhes concerne, desencadeiam um aumento da infiltração de leucócitos no tecido (MOHAMED et al., 2016). Alguns autores propõem que esses processos podem ocasionar danos substanciais no tecido hepático (OKAJIMA et al., 2002; SELZNER et al., 2003). Apesar da existência de diversos antioxidantes endógenos no fígado, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e enzimas da família glutatona (GSH), o estado hiperglicêmico em indivíduos diabéticos pode diminuir a atividade de SOD e CAT, promovendo o aumento de EROs e contribuindo para o dano tecidual hepático (MOHAMED et al., 2016; PARVEEN et al., 2010).

Os resultados obtidos a partir dos ensaios utilizando homogeneizado de tecido hepático evidenciaram a capacidade de CQA e das frações DCM, AcOEt e ButOH de proteger contra oxidação *ex-vivo*, promover atividade antioxidante, além de reduzir a peroxidação lipídica, a oxidação de grupos tióis e a produção de EROs (Fig. 6). De acordo com El-Beshbishy e outros (2011), o efeito protetivo de alguns extratos de plantas contra dano tecidual hepático é devido à presença de compostos tais como flavonoides, polifenóis e antocianidinas, o que pode justificar a capacidade protetiva exibida nas três frações do EE-Ah testadas. Ademais, alguns estudos evidenciaram o potencial de polifenóis como catequina (MAHMOODI et al., 2020), quercetina (YANG et al., 2019) e ácido gálico (LIU et al., 2019) no tratamento e prevenção de doenças associadas ao diabetes, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), bem como na diminuição da resistência à insulina (ABENAVOLI et al., 2017; CHEN et al., 2017; VAN DE WIER et al., 2017). Como mostrado na Fig. 6A e 6B, as três frações e CQA promoveram a diminuição da peroxidação lipídica e da produção de EROs. Segundo Su e outros (2019), espécies reativas de oxigênio podem reagir com ácidos graxos da membrana plasmática e promover a peroxidação lipídica. Nesse contexto, a diminuição da produção de EROs, suscitada pelas frações do EE-Ah e CQA, pode ter promovido a atenuação da peroxidação lipídica explicitada na Fig. 6A.

Uma característica de crucial importância quando se estuda produtos naturais para tratamento e gerenciamento de doenças é a potencial citotoxicidade do extrato, fração ou composto analisado. A vista disso, um teste de toxicidade em macrófagos murinos foi conduzido utilizando as moléculas CQA e as frações DCM, AcOEt e ButOH. O ensaio MTT é

um indicador sensível e confiável da atividade metabólica celular. Este método baseia-se na redução do MTT, de coloração amarela, por desidrogenases mitocondriais, formando como produto o formazan, de coloração violeta (PRATAVALE; DANDEKAR; JAIN, 2012). Como evidenciado na Fig. 7, as três frações do EE-Ah, bem como CQA apresentaram pouca ou nenhuma citotoxicidade em macrófagos RAW 264,7.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, pôde-se concluir que o extrato etanólico das folhas de *A. humile*, suas frações orgânicas e as moléculas CQA apresentam expressivas capacidades antioxidante e antiglicante, além de potencial para inibir a enzima  $\alpha$ -amilase. Também, as amostras testadas neste estudo apresentaram pouca ou nenhuma citotoxicidade em macrófagos de camundongo. O presente estudo contribui para o conhecimento das propriedades biológicas e do potencial medicinal das folhas de *A. humile*, promovendo um melhor entendimento sobre a possibilidade do uso desta planta para controlar a hiperglicemia pós-prandial, bem como inibir processos oxidativos e de glicação proteica em DMT2. Ademais, este estudo, além de reconhecer e valorizar o saber popular e o Cerrado brasileiro, levanta possibilidades para futuros estudos que empreguem modelos *in vivo* que possam contribuir com os dados expostos neste trabalho quanto ao uso de EE-Ah, principalmente das frações DCM AcOEt e ButOH, como ferramentas complementares para o controle da hiperglicemia e do estresse oxidativo.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, G. et al. The management of diabetes *mellitus*-imperative role of natural products against dipeptidyl peptidase-4, alpha-glucosidase and sodium-dependent glucose co-transporter 2 (SGLT2). **Bioorganic Chemistry**, v. 86, p. 305-315, Maio 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.009>
- ABDEL-WAHAB, Y. H. A. et al. Glycation of Insulin in the Islets of Langerhans of Normal and Diabetic Animals. **Diabetes**, v. 45, n. 11, p. 1489, 1996. <https://doi.org/10.2337/diab.45.11.1489>
- ABENAVOLI, L. et al. Polyphenols treatment in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Translational Internal Medicine**. V. 5, n. 3, p. 144-147, Set. 2017. <https://doi.org/10.1515/jtim-2017-0027>
- AHMADIEH, H.; AZAR, S. T. Liver disease and diabetes: association, pathophysiology, and management. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 104, n. 1, p. 53-62, Abr. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.01.003>
- AL-AWAR, A. et al. Experimental Diabetes *Mellitus* in Different Animal Models. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 9051426, Ago. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9051426>
- ALQAHTANI, A. S. et al. Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Enzyme Inhibition and Antioxidant Potential of 3-Oxolupenal and Katonic Acid Isolated from *Nuxia oppositifolia*. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, Dez. 2019. <https://doi.org/10.3390/biom10010061>
- AMBRIZ-PÉREZ, D. et al. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v.2, p. 1131412, Nov. 2016. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1131412>
- ANANTHARAJU, P. G. et al. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 99, Dez. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0217-2>
- ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183-198, Jan. 2002. <https://doi.org/10.1039/b009171p>
- ARAÚJO, R.; MARTINS, D.; BORBA, M. Oxidative Stress and Disease, A Master Regulator of Oxidative Stress. *In*. IntechOpen, 2016. <https://doi.org/10.5772/65366>
- ARYAEIAN, N.; SEDEHI, S. K.; ARABLOU, T. Polyphenols and their effects on diabetes management: A review. **Medical journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 31, p. 134-134, 2017. <https://doi.org/10.14196/mjiri.31.134>

ASGHARPOUR DIL, F.; RANJKESH, Z.; GOODARZI, M. T. A systematic review of antiglycation medicinal plants. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, 13, n. 2, p. 1225-1229, 2019/03/01/ 2019. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.01.053>

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes *mellitus* and oxidative stress—A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547-553, Set. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>

ASNAASHARI, M.; FARHOOSH, R.; SHARIF, A. Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. **Food Chem**, 159, p. 439-444, Set. 15 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.038>

AURA, A.-M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 407-429, Out. 2008. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9095-3>

BABBAR, N. et al. Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2568-2575, Out. 2014. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0754-4>

BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27540-27557, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5RA01911G>

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, p. 43, Ago. 2013. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-43>

BECKMAN, J. A. et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. **European Heart Journal**, v. 34, n. 31, p. 2444-2452, Ago. 2013. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh142>

BEDEKAR, A.; SHAH, K.; KOFFAS, M. Natural products for type II diabetes treatment. *In: Advances in Applied Microbiology*, 2010. v. 71, cap. 2, p. 21-73. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)71002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)71002-9)

BELLIER, J. et al. Methylglyoxal, a potent inducer of AGEs, connects between diabetes and cancer. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 148, p. 200-211, Fev. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.01.002>

BENSAAD, L. A. et al. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 47, Jan. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1555-0>

BINDU, J.; NARENDHIRAKANNAN, R. T. Role of medicinal plants in the management of diabetes *mellitus*: a review. **3 Biotech**, v. 9, n. 1, p. 4, Jan. 2019.

<https://doi.org/10.1007/s13205-018-1528-0>

BOOTH, G. L. et al. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. **Lancet**, v. 368, n. 9529, p. 29-36, Jul. 2006.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68967-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68967-8)

BOYD, A. C. et al. Impaired ability of glycated insulin to regulate plasma glucose and stimulate glucose transport and metabolism in mouse abdominal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1523, n. 1, p. 128-134, Set. 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00113-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00113-6)

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, 2009. 135 p., il. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.

**Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-820, Dez. 2001. <https://doi.org/10.1038/414813a>

BUNN, H. F. et al. Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A1c. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 67, n. 1, p. 103-109, Nov. 1975. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(75\)90289-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(75)90289-2)

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2774-2779, Jun. 2001.

<https://doi.org/10.1021/jf001413m>

BURRI, B. J.; LA FRANO, M. R.; ZHU, C. Absorption, metabolism, and functions of  $\beta$ -cryptoxanthin. **Nutrition reviews**, v. 74, n. 2, p. 69-82, 2016.

<https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv064>

BUZZETTI, R.; ZAMPETTI, S.; MADDALONI, E. Adult-onset autoimmune diabetes: current knowledge and implications for management. **Nature Reviews Endocrinology**, v.13, n. 11, p. 674-686, Nov. 2017. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.99>

BYRNE, C. D.; TARGHER, G. NAFLD: A multisystem disease. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 1, Abr. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.012>

CAI, E. P.; LIN, J. K. Epigallocatechin gallate (EGCG) and rutin suppress the glucotoxicity through activating IRS2 and AMPK signaling in rat pancreatic beta cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9817-9827, Out. 2009.

<https://doi.org/10.1021/jf902618v>

CAO, H. et al. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: Human Study and Clinical Trial. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.59, n. 20, p. 3371-3379, 2019. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1492900>

CHANDRASEKARAN, K. et al. Apoptosis in HepG2 cells exposed to high glucose. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 2, p. 387-396, Mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.10.020>

CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Type 2 diabetes. **Lancet**, v. 389, n. 10085, p. 2239-2251, Jun. 2017. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2)

CHEN, H.; VIRK, M. S.; CHEN, F. Phenolic acids inhibit the formation of advanced glycation end products in food simulation systems depending on their reducing powers and structures. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 4, p. 400-411, Maio 2016. <https://doi.org/10.3109/09637486.2016.1166187>

CHEN, Q. et al. Effects of Natural Products on Fructose-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). **Nutrients**, v. 9, n. 2, p. 96, Jan. 2017. <https://doi.org/10.3390/nu9020096>

CHEN, Y. et al. Hepatic and renal tissue damage in Balb/c mice exposed to diisodecyl phthalate: The role of oxidative stress pathways. **Food and Chemical Toxicology**, v. 132, p. 110600, Out. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110600>

CHEN, Z. et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 152, p. 116-141, Maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>

CHEUNG, N.; MITCHELL, P.; WONG, T. Y. Diabetic retinopathy. **Lancet**, v. 376, n. 9735, p. 124-136, Jul. 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)62124-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)62124-3)

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 4, p. 345-358, Out. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x>

CORTEZ-PINTO, H.; DE MOURA, M. C.; DAY, C. P. Non-alcoholic steatohepatitis: From cell biology to clinical practice. **Journal of Hepatology**, v. 44, n. 1, p. 197-208, Jan. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.09.002>

COSTABILE, G. et al. Grape pomace polyphenols improve insulin response to a standard meal in healthy individuals: A pilot study. **Clinical Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 2727-2734, Dez. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.11.028>

CRUZ-ZÚÑIGA, J. M. et al. Development of an antioxidant biomaterial by promoting the deglycosylation of rutin to isoquercetin and quercetin. **Food Chemistry**, v. 204, p. 420-426, Ago. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.130>

CUNHA, A. G. et al. UPLC-qTOF-MS/MS-based phenolic profile and their biosynthetic enzyme activity used to discriminate between cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) maturation stages. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences**, v. 1051, p. 24-32, Abr. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.022>

DE ABREU, F. P. et al. Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: a focus on carotenoids. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 25-31, Maio 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.028>

DE BOCK, M. et al. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e57622-e57622, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057622>

DE LA CRUZ, J. P. et al. Role of the catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 5, p. 549-555, Maio 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.12.013>

DE OLIVEIRA E SILVA, A. M. et al. In vivo and in vitro antioxidant activity and hepatoprotective properties of polyphenols from *Halimeda opuntia* (Linnaeus) Lamouroux. **Redox report: communications in free radical research**, v. 17, n. 2, p. 47-53, 2012.

<https://doi.org/10.1179/1351000212Y.0000000003>

DEWANJEE, S. et al. Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, p. 472-523, Ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.034>

DEY, L.; ATTELE, A. S.; YUAN, C. S. Alternative therapies for type 2 diabetes. **Alternative Medicine Review**, v. 7, n. 1, p. 45-58, Fev. 2002.

DIMEGLIO, L. A.; EVANS-MOLINA, C.; ORAM, R. A. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 391, n. 10138, p. 2449-2462, Jun. 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)

DOBLER, D. et al. Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by RGD and GFOGER motif modification. **Diabetes**, v. 55, n. 7, p. 1961-1969, Jul. 2006. <https://doi.org/10.2337/db05-1634>

DONADO-PESTANA, C. M. et al. Polyphenols of cambuci (*Campomanesia phaea* (O. Berg.)) fruit ameliorate insulin resistance and hepatic steatosis in obese mice. **Food Chemistry**, v. 340, p. 128169, Mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128169>

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan. 2002. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>

DURASAMY, Y. et al. Aminosalicic acid reduces the antiproliferative effect of hyperglycaemia, advanced glycation endproducts and glycated basic fibroblast growth factor in cultured bovine aortic endothelial cells: comparison with aminoguanidine. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 246, n. 1-2, p. 143-153, Abr. 2003.

[https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0298-2\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0298-2_21)

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, Out. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>

ECHOUFFO-TCHEUGUI, J. B.; GARG, R. Management of Hyperglycemia and Diabetes in the Emergency Department. **Current Diabetes Reports**, v. 17, n. 8, p. 56, Ago. 2017.

<https://doi.org/10.1007/s11892-017-0883-2>

EL-BESHBISHY, H. A. et al. Antioxidant and antiapoptotic effects of green tea polyphenols against azathioprine-induced liver injury in rats. **Pathophysiology**, v. 18, n. 2, p. 125-135, Abr. 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2010.08.002>

FARZAEI, M. H. et al. Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 855, 2018.

<https://doi.org/10.3390/nu10070855>

FERNÁNDEZ-IGLESIAS, A.; HIDE, D.; GRACIA-SANCHO, J. Oxidative Stress in Liver Diseases. In: GRACIA-SANCHO, J. e SALVADÓ, J. (Ed.). **Gastrointestinal Tissue: Academic Press**, 2017. cap. 9 p. 125-140.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805377-5.00009-6>

FRAGA, C. G. et al. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. **Food and Function**, v. 10, n. 2, p. 514-528, Fev. 2019.

<https://doi.org/10.1039/C8FO01997E>

FRANCO, R. R. et al. Antidiabetic potential of Bauhinia forficata Link leaves: a non-cytotoxic source of lipase and glycoside hydrolases inhibitors and molecules with antioxidant and antiglycation properties. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 123, p. 109798, Mar. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109798>

FRANCO, R. R. et al. Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes *mellitus*.

**Journal of Ethnopharmacology**, v. 215, p. 140-146, Abr. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.032>

FRANCO, R. R. et al. Phytoscreening of Vochysiaceae species: Molecular identification by HPLC-ESI-MS/MS and evaluating of their antioxidant activity and inhibitory potential against human alpha-amylase and protein glycation. **Bioorganic Chemistry**, v.91, p. 103122, Out 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103122>



FULLER, J. H. et al. Risk factors for cardiovascular mortality and morbidity: The WHO multinational study of vascular disease in diabetes. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. S54, Set. 2001. <https://doi.org/10.1007/PL00002940>

GALVÃO, M. et al. Evaluation of the Folin-Ciocalteu Method and Quantification of Total Tannins in Stem Barks and Pods from *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) L. P. Queiroz. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, Nov. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018170586>

GAENS, K. H. et al. Nε-(carboxymethyl)lysine-receptor for advanced glycation end product axis is a key modulator of obesity-induced dysregulation of adipokine expression and insulin resistance. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 6, p. 1199-1208, Jun. 2014. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302281>

GIOVANNUCCI, E. et al. Diabetes and cancer: a consensus report. **Diabetes Care**, v. 33, n. 7, p. 1674-1685, Jul. 2010. <https://doi.org/10.2337/dc10-0666>

GONCALVES, S. et al. Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 219-227, Jan. 2017. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2453-z>

GONZÁLEZ-BURGOS, E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5319-5341, 2012. <https://doi.org/10.2174/092986712803833335>

GRANDI, T. S. M. **Tratado das plantas medicinais: mineiras, nativas e cultivadas**. 1 ed. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 2014.

GRZESIK, M. et al. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. **Food Chemistry**, v. 241, p. 480-492, Fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.117>

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n. 2, p. 213-220, Jan. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.09.011>

GUNAWARDENA, H. P. et al. Poor Glycaemic Control Is Associated with Increased Lipid Peroxidation and Glutathione Peroxidase Activity in Type 2 Diabetes Patients. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 9471697, Ago. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9471697>

HA, T. J.; KUBO, I. Lipoyxygenase inhibitory activity of anacardic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4350-4354, Jun. 2005. <https://doi.org/10.1021/jf048184e>

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemistry Society Transactions**, v. 35, n. Pt 5, p. 1147-1150, Nov. 2007. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. USA: Oxford University Press, 2015. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>

HAN, X. et al. Naringenin-7-O-glucoside protects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 9, p. 3140-3146, Set. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.06.086>

HARDWICK, R. N. et al. Diversity in Antioxidant Response Enzymes in Progressive Stages of Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 12, p. 2293, 2010. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.035006>

HE, J. et al. Epigallocatechin Gallate Is the Most Effective Catechin Against Antioxidant Stress via Hydrogen Peroxide and Radical Scavenging Activity. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 24, p. 8198-8206, 2018. <https://doi.org/10.12659/MSM.911175>

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, Out. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)

HENRIKSEN, E. J.; DIAMOND-STANIC, M. K.; MARCHIONNE, E. M. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 993-999, Set. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.005>

HODGE, J. E. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 1, n. 15, p. 928-943, Out. 1953. <https://doi.org/10.1021/jf60015a004>

HORI, O. et al. The receptor for advanced glycation end-products has a central role in mediating the effects of advanced glycation end-products on the development of vascular disease in diabetes *mellitus*. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 11, p. 13-16, 1996. <https://doi.org/10.1093/ndt/11.supp5.13>

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar. 2005. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

HUANG, H. et al. Anacardic acid induces cell apoptosis associated with induction of ATF4-dependent endoplasmic reticulum stress. **Toxicology Letters**, v. 228, n. 3, p. 170-178, Ago. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.05.012>

HUNTER, S. J. et al. Demonstration of glycated insulin in human diabetic plasma and decreased biological activity assessed by euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique in humans. **Diabetes**, v. 52, n. 2, p. 492-498, Fev. 2003. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.2.492>



HUSSAIN, T. et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 7432797, Set. 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/7432797>

HUSSEIN, R. A.; EL-ANSSARY, A. A. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. *In*: **Herbal Medicine**, 2018.

IBRAHIM, R. M. et al. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 134-141, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.008>

IKEBUCHI, M. et al. Effects of hyperglycemia on oxidative stress and antioxidant potential in patients with type 2 diabetes. **Diabetology International**, v. 1, n. 2, p. 72-77, Dez. 2010.

<https://doi.org/10.1007/s13340-010-0008-5>

ILONEN, J.; LEMPAINEN, J.; VEIJOLA, R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes *mellitus*. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 11, p. 635-650, Nov. 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41574-019-0254-y>

JEEVITHA, D. et al. DFT study of glycosyl group reactivity in quercetin derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1120, p. 15-24, Set. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.05.003>

JHA, J. C. et al. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 25, n. 12, p. 657-684, Out. 2016. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6664>

JIANG, P. et al.  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities of Phenolic Extracts from *Eucalyptus grandis*  $\times$  *E. urophylla* Bark. **Journal of Chemistry**, v. 2017, p. 8516964, Fev. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8516964>

JUSTINO, A. B. et al. B procyanidins of *Annona crassiflora* fruit peel inhibited glycation, lipid peroxidation and protein-bound carbonyls, with protective effects on glycated catalase. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19183, Dez. 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55779-3>

JUSTINO, A. B. et al.  $\alpha$ -Glucosidase and non-enzymatic glycation inhibitory potential of *Eugenia dysenterica* fruit pulp extracts. **Food Bioscience**, v. 35, p. 100573, Jun. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100573>

KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; DEL PRATO, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. **Lancet**, v. 383, n. 9922, p. 1068-1083, Mar. 2014. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6)

KAJARIA, D. et al. In-vitro  $\alpha$  amylase and glycosidase inhibitory effect of ethanolic extract of antiasthmatic drug - Shirishadi. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, v. 4, n. 4, p. 206-209, Out. 2013. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.121415>

KASOTE, D. M. et al. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International journal of biological sciences**, v. 11, n. 8, p. 982-991, 2015. <https://doi.org/10.7150/ijbs.12096>

KERRY, N.; RICE-EVANS, C. Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, n. 1, p. 247-253, Jul. 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730247.x>

KESHTKAR, S. et al. Protective effect of nobiletin on isolated human islets survival and function against hypoxia and oxidative stress-induced apoptosis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11701, Ago. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48262-6>

KIM, H.-M. et al. Docking and Scoring of Quercetin and Quercetin Glycosides against  $\alpha$ -Amylase Receptor. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 31, n. 2, p. 461-463, Fev. 2010. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2010.31.02.461>

KIM, Y. J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1052-1055, Jun. 2007. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.1052>

KIM, Y.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Polyphenols and Glycemic Control. **Nutrients**, v. 8, n. 1, Jan. 2016. <https://doi.org/10.3390/nu8010017>

KOPJAR, M. et al. Evaluation of Antioxidant Interactions of Combined Model Systems of Phenolics in the Presence of Sugars. **Natural Products Communications**, v. 11, n. 10, p. 1445-1448, Out. 2016. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601101008>

KUBO, I. et al. Antioxidant activity of anacardic acids. **Food Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 555-562, Jan. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.023>

KUBO, I.; NIHEI, K.; TSUJIMOTO, K. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 26, p. 7624-7628, Dez. 2003. <https://doi.org/10.1021/jf034674f>

KUMAR, A. et al. Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) have Higher Oxidative Stress in Comparison to Chronic Viral Hepatitis. **Journal of clinical and experimental hepatology**, v. 3, n. 1, p. 12-18, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2012.10.009>

KURIMOTO, Y. et al. Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 23, p. 5558-5564, Jun. 2013.

<https://doi.org/10.1021/jf401190y>

LARTER, C. Z.; FARRELL, G. C. Insulin resistance, adiponectin, cytokines in NASH: Which is the best target to treat? **Journal of Hepatology**, v. 44, n. 2, p. 253-261, Fev. 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.11.030>

LECLERCQ, I. A. et al. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. **Journal of Hepatology**, v. 47, n. 1, p. 142-156, Jul. 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.04.002>

LEGAULT, J. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from the leaves of *Brasenia schreberi*. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1127-1134, Out. 2011. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0198>

LI, D. et al. Effect of young apple (*Malus domestica* Borkh. cv. Red Fuji) polyphenols on alleviating insulin resistance. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100637, Ago. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100637>

LI, S. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26087-26124, Nov. 2015.

<https://doi.org/10.3390/ijms161125942>

LI, Y. et al. Study on the Interaction between 3 Flavonoid Compounds and  $\alpha$ -Amylase by Fluorescence Spectroscopy and Enzymatic Kinetics. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 3, p. C199-C203, Abri. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01080.x>

LI, Z. et al. Phytotherapy using blueberry leaf polyphenols to alleviate non-alcoholic fatty liver disease through improving mitochondrial function and oxidative defense.

**Phytomedicine**, v.69, p. 153209, Abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153209>

LIANG, W. et al. A novel damage mechanism: Contribution of the interaction between necroptosis and ROS to high glucose-induced injury and inflammation in H9c2 cardiac cells.

**International Journal of Molecular Sciences**, v. 40, n. 1, p. 201-208, Jul. 2017.

<https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3006>

LIM, M. et al. Induction of apoptosis of Beta cells of the pancreas by advanced glycation end-products, important mediators of chronic complications of diabetes *mellitus*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1150, p. 311-315, Dez. 2008.

<https://doi.org/10.1196/annals.1447.011>

LITESCU, S. C. et al. The Use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assays in the Assessment of Beverages' Antioxidant Properties. *In*: PREEDY, V. (Ed.). **Processing and Impact on Antioxidants in Beverages**. San Diego: Academic Press, 2014. cap. 25, p. 245-251.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00025-8>

LIU, B. et al. Raw Bowl Tea (Tuocha) Polyphenol Prevention of Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Intestinal Function in Mice. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. 435, 2019.

<https://doi.org/10.3390/biom9090435>

LUDWIG, D. S. et al. Dietary carbohydrates: role of quality and quantity in chronic disease. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 361, p. k2340-k2340, 2018.

<https://doi.org/10.1136/bmj.k2340>

LUIZ-FERREIRA, A. **Atividade Antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae)**. 2005. 164 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

LUIZ-FERREIRA, A. et al. Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats.

**Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7153-7166, Out. 2010. <https://doi.org/10.3390/molecules15107153>

LUIZ-FERREIRA, A. et al. Should *Anacardium humile* St. Hil be used as an antiulcer agent? A scientific approach to the traditional knowledge. **Fitoterapia**, v. 79, n. 3, p. 207-209, Abr. 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.11.006>

MAESSEN, D. E.; STEHOUWER, C. D.; SCHALKWIJK, C. G. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. **Clinical Science (London)**, v. 128, n. 12, p. 839-861, Jun. 2015.

<https://doi.org/10.1042/CS20140683>

MAHMOODI, M. et al. Effects of green tea or green tea catechin on liver enzymes in healthy individuals and people with nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 7, p. 1587-1598, 2020.

<https://doi.org/10.1002/ptr.6637>

MALAGUARNERA, L. et al. Heme oxygenase-1 levels and oxidative stress-related parameters in non-alcoholic fatty liver disease patients. **Journal of Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 585-591, Abr. 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.11.040>

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, p. 125124, Nov. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>

MANNA, P. et al. Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 11, p. 1465-1484, Jun. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.025>

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B., 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003. <https://doi.org/10.1002/jbt.10058>

MARTÍN, M. A. et al. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 3, p. 196-205, Mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.10.009>

MASARONE, M. et al. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 9547613, Jun. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9547613>

MASELLA, R. et al. Extra Virgin Olive Oil Biophenols Inhibit Cell-Mediated Oxidation of LDL by Increasing the mRNA Transcription of Glutathione-Related Enzymes. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 785-791, 2004. <https://doi.org/10.1093/jn/134.4.785>

MASINI, M. et al. Ultrastructural alterations of pancreatic beta cells in human diabetes *mellitus*. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 33, n. 6, p. e2894, 2017. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2894>

MEY, J. T.; HAUS, J. M. Dicarbonyl Stress and Glyoxalase-1 in Skeletal Muscle: Implications for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Frontiers in cardiovascular medicine**, v. 5, p. 117-117, 2018. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00117>

MEZA LETELIER, C. E. et al. Pathophysiology of diabetic nephropathy: a literature review. **Medwave**, v.17, n. 1, p. e6839, 2017. <https://doi.org/10.5867/medwave.2017.01.6839>

MIAO, M. et al. Interaction mechanism between green tea extract and human  $\alpha$ -amylase for reducing starch digestion. **Food chemistry**, v. 186, p. 20-25, Nov. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.049>

MIAO, M. et al. Slowly digestible starch--a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 12, p. 1642-1657, 2015. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.704434>

MITTAL, A. et al. Nontargeted Identification of the Phenolic and Other Compounds of *Saraca asoca* by High Performance Liquid Chromatography-Positive Electrospray Ionization and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2013, p. 293935, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/293935>

MOHAMED, J. et al. Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v.16, n. 2, p. e132-141, Maio 2016. <https://doi.org/10.18295/squmj.2016.16.02.002>

MOINI, J. The Pancreas and Classifications of Insulin. *In*: MOINI, J. (Ed.). **Epidemiology of Diabetes**: Elsevier, 2019a, cap. 2, p. 11-23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816864-6.00002-X>

MOINI, J. Type 2 Diabetes. *In*: MOINI, J. (Ed.). **Epidemiology of Diabetes**: Elsevier, 2019b, cap. 7, p. 91-114. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816864-6.00007-9>

MOLDOGAZIEVA, N. T. et al. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. **Free Radical Research**, v. 52, n. 5, p. 507-543, Maio 2018. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1457217>

MORAIS, T. C. et al. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, n. 1, p. 264-269, Jan. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.10.008>

MORCOS, M. et al. Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, v. 7, n. 2, p. 260-269, Mar. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00371.x>

MURPHY, Michael P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1-13, 2008. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>

NERY, P. S. et al. Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 3, p. 361-364, Ago. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.043>

NEWSHOLME, P. et al. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 24, p. 4527-4550, Dez. 2016. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>

NICHOLS, B. L. et al. The maltase-glucoamylase gene: common ancestry to sucrase-isomaltase with complementary starch digestion activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 3, p. 1432-1437, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237170100>

NITA, M.; GRZYBOWSKI, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 3164734, Jan. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3164734>



NOWOTNY, K. et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes *mellitus*. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 194-222, Mar. 2015.

<https://doi.org/10.3390/biom5010194>

NUUTILA, A. M.; KAMMIOVIRTA, K.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. **Food Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 519-525, Abr. 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00305-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00305-3)

NYAMBE-SILAVWE, H. et al. Inhibition of human  $\alpha$ -amylase by dietary polyphenols. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 723-732, Dez. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.003>

ODEYEMI, S.; BRADLEY, G. Medicinal Plants Used for the Traditional Management of Diabetes in the Eastern Cape, South Africa: Pharmacology and Toxicology. **Molecules**, v. 23, n. 11, Out. 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23112759>

OKAJIMA, K. et al. Role of microthrombus formation in the development of ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 88, n. 3, p. 473-480, Set. 2002. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1613240>

OKOTH, D. A.; CHENIA, H. Y.; KOORBANALLY, N. A. Antibacterial and antioxidant activities of flavonoids from *Lannea alata* (Engl.) Engl. (Anacardiaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 3, p. 476-481, Ago. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.06.003>

OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 144, p. 135-143, Nov. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039>

OOI, D. J. et al. Curculigoside and polyphenol-rich ethyl acetate fraction of *Molineria latifolia* rhizome improved glucose uptake via potential mTOR/AKT activated GLUT4 translocation. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 4, p. 1253-1264, Out. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.03.003>

OSSANI, G. P. et al. Role of Oxidative Stress in Lithium-Induced Nephropathy. **Biological Trace Element Research**, v. 191, n. 2, p. 412-418, Out. 2019.

<https://doi.org/10.1007/s12011-018-1617-2>

OTA, A.; ULRIH, N. P. An Overview of Herbal Products and Secondary Metabolites Used for Management of Type Two Diabetes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 436, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00436>

PAQUETTE, M. et al. Strawberry and cranberry polyphenols improve insulin sensitivity in insulin-resistant, non-diabetic adults: a parallel, double-blind, controlled and randomised clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v. 117, n. 4, p. 519-531, Fev. 2017.

<https://doi.org/10.1017/S0007114517000393>

PARVEEN, K. et al. Protective effects of Pycnogenol® on hyperglycemia-induced oxidative damage in the liver of type 2 diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, n. 2, p. 219-227, Jul. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.04.023>

PATIL, K. K.; MESHARAM, R. J.; GACCHE, R. N. Effect of monohydroxylated flavonoids on glycation-induced lens opacity and protein aggregation. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, p. 148-156, 2016. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1180593>

PATRAVALE, V.; DANDEKAR, P.; JAIN, R. 4 - Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles. *In: PATRAVALE, V.; DANDEKAR, P., et al (Ed.). Nanoparticulate Drug Delivery*: Woodhead Publishing, 2012. p. 123-155. <https://doi.org/10.1533/9781908818195.123>

PEREIRA, E. M. et al. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. **Planta Medica**, v. 77, n. 4, p. 401-404, Mar 2011. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250354>

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. et al. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 3, p. S112-S120, Nov. 2010. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.221>

PESSLER, D.; RUDICH, A.; BASHAN, N. Oxidative stress impairs nuclear proteins binding to the insulin responsive element in the GLUT4 promoter. **Diabetologia**, v. 44, n. 12, p. 2156-2164, Dez. 2001. <https://doi.org/10.1007/s001250100024>

PINENT, M. et al. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4985-4990, Nov. 2004. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0764>

PIWOWAR, A.; RORBACH-DOLATA, A.; FECKA, I. The Antglycoxidative Ability of Selected Phenolic Compounds-An In Vitro Study. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 15, p. 2689, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24152689>

PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 8416763, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

POPOVA, M. et al. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochemical analysis : PCA**, v. 15, n. 4, p. 235-240, 2004. <https://doi.org/10.1002/pca.777>



PORTO, R. G. L. et al. Bioactive compounds, antioxidant activity and minerals of Caju (*Anacardium humile* St. Hill) during the ripening. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, p. 4924-4930, Dez. 2016. <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11455>

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília/DF: Embrapa, 1994. 29 p.

POVIE, G. et al. Role of catechol in the radical reduction of B-alkylcatecholboranes in presence of methanol. **Chemical Communications (Cambridge)**, v. 46, n. 5, p. 803-805, Fev. 2010. <https://doi.org/10.1039/B917004A>

PRAKASH MISHRA, A. et al. Bioactive compounds and health benefits of edible Rumex species-A review. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)**, v. 64, n. 8, p. 27-34, Jun. 2018. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.8.5>

PRAVEENA, R. *et al.* Antioxidant potential of orientin: A combined experimental and DFT approach. **Journal of Molecular Structure**, v. 1061, p. 114-123, Mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.01.002>

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513-523, Jun. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>

RAHBAR, S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. **Clinica Chimica Acta**, v. 22, n. 2, p. 296-298, Out. 1968. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(68\)90372-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(68)90372-0)

RAMACHANDRA BHAT, L. et al. Methylglyoxal - An emerging biomarker for diabetes *mellitus* diagnosis and its detection methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 133, p. 107-124, Maio 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.010>

RASOULI, H. et al. Differential  $\alpha$ -amylase/ $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. **Food and Function**, v. 8, n. 5, p. 1942-1954, Maio 2017. <https://doi.org/10.1039/C7FO00220C>

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-1607, Dez. 1988. <https://doi.org/10.2337/diabetes.37.12.1595>

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, Dez. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>

REHMAN, K.; AKASH, M. S. H. Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes *Mellitus*: How Are They Interlinked? **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 11, p. 3577-3585, Nov. 2017. <https://doi.org/10.1002/jcb.26097>

REINIERS, M. J. et al. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Steatotic Hepatocytes: A Molecular Perspective on the Pathophysiology of Ischemia-Reperfusion Injury in the Fatty Liver. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 7, p. 1119-1142, Set. 2013.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5486>

REMEDI, M. S.; EMFINGER, C. Pancreatic beta-cell identity in diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 18, p. 110-116, Set. 2016. <https://doi.org/10.1111/dom.12727>

RIOS, J. L.; FRANCONI, F.; SCHINELLA, G. R. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes *Mellitus*. **Planta Medica**, v. 81, n. 12-13, p. 975-994, Ago. 2015.  
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1546131>

ROYO, V. A. et al. Anatomy, Histochemistry, and Antifungal Activity of Anacardium humile (Anacardiaceae) Leaf. **Microscopy and Microanalysis**, v. 21, n. 6, p. 1549-1561, Dez. 2015.  
<https://doi.org/10.1017/S1431927615015457>

RUNGRATANAWANICH, W. *et al.* Advanced glycation end products (AGEs) and other adducts in aging-related diseases and alcohol-mediated tissue injury. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 53, n. 2, p. 168-188, Fev. 2021.  
<https://doi.org/10.1038/s12276-021-00561-7>

SALEHI, B. et al. Antidiabetic Potential of Medicinal Plants and Their Active Components. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, Set. 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9100551>

SALEHI, B. et al. Medicinal Plants Used in the Treatment of Human Immunodeficiency Virus. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 5, p. 1459, 2018.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19051459>

SANAJOU, D. et al. AGE-RAGE axis blockade in diabetic nephropathy: Current status and future directions. **European Journal of Pharmacology**, v.833, p. 158-164, Ago. 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.001>

SANTANGELO, C. et al. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 394-405, 2007.

SANTOS, T. et al. Bioelectrode for detection of human salivary amylase. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, p. 530–535, Abr. 2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.12.005>

SARIAN, M. N. et al. Antioxidant and Antidiabetic Effects of Flavonoids: A Structure-Activity Relationship Based Study. **Biomed Research International**, v. 2017, p. 8386065, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8386065>

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.; PELL, A. Analysis of condensed tannins: A review. **Animal Feed Science and Technology - ANIM FEED SCI TECH**, v. 91, p. 21-40, 2001.  
[https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)

SEKHER PANNALA, A. et al. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1161-1168, Abr. 2001. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4705>

SELZNER, N. et al. Protective strategies against ischemic injury of the liver. **Gastroenterology**, v. 125, n. 3, p. 917-936, Set. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)01048-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01048-5)

SESHASAI, S. R. K. et al. Diabetes *mellitus*, fasting glucose, and risk of cause-specific death. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 9, p. 829-841, Mar. 2011. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1008862>

SHAHAB, U. et al. Impact of wedelolactone in the anti-glycation and anti-diabetic activity in experimental diabetic animals. **IUBMB Life**, v. 70, n. 6, p. 547-552, Jun. 2018. <https://doi.org/10.1002/iub.1744>

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, Out. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>

SHAN, X. *et al.* In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 249-255, Jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.036>

SHARIFI-RAD, M. et al. *Pulicaria vulgaris* Gaertn. essential oil: an alternative or complementary treatment for Leishmaniasis. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)**, v. 64, n. 8, p. 18-21, Jun. 2018. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.8.3>

SHARMA, R.; ARYA, V. A review on fruits having anti-diabetic potential. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 204-212, Jan. 2011.

SHIRZAIY, M.; DALIRSANI, Z. The effect of glycemic control on salivary lipid peroxidation in type II diabetic patients. **Diabetes and Metabolic Syndrome**, v.13, n. 3, p. 1991-1994, Maio – Jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.04.004>

SHRESTHA, P. M.; DHILLION, S. S. Medicinal plant diversity and use in the highlands of Dolakha district, Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, n. 1, p. 81-96, Maio 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00051-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00051-5)

SILVA, L. B. A. R. et al. Bioactive food compounds, epigenetics and chronic disease prevention: Focus on early-life interventions with polyphenols. **Food Research International**, v. 125, p. 108646, Nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108646>

SINGH, A. et al. Profiling of Gallic and Ellagic Acid Derivatives in Different Plant Parts of Terminalia arjuna by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. **Natural Products Communications**, v. 11, n. 2, p. 239-244, Fev. 2016. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100227>

ŞÖHRETOĞLU, D.; SARI, S. Flavonoids as alpha-glucosidase inhibitors: mechanistic approaches merged with enzyme kinetics and molecular modelling. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, Maio 2019. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09610-6>

SONG, Y. S.; PARK, C. M. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside strengthen antioxidative potential through the modulation of Nrf2/MAPK mediated HO-1 signaling cascade in RAW 264.7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 70-75, Mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.017>

SU, L. J. et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 5080843, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>

SULAIMAN, M. K. Diabetic nephropathy: recent advances in pathophysiology and challenges in dietary management. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 11, p. 7, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0403-4>

TAN, D. et al. Methylglyoxal: its presence and potential scavengers. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, p. 261-264, 2008.

TANASE, C.; COSARCA, S.; MUNTEAN, D. L. A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. **Molecules**, v. 24, n. 6, Mar. 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24061182>

TEJADA, S. et al. Potential Anti-inflammatory Effects of Hesperidin from the Genus Citrus. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 37, p. 4929-4945, 2018. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170718104412>

THE EMERGING RISK FACTORS. et al. C. Diabetes *mellitus*, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **The Lancet**, v. 375, n. 9733, p. 2215-2222, 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60484-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60484-9)

THORNALLEY, P. J. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, V. 1043, p. 111-117, Jun. 2005. <https://doi.org/10.1196/annals.1333.014>

TOLMAN, K. G. et al. Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. **Diabetes Care**, v. 30, n. 3, p. 734-743, Mar. 2007. <https://doi.org/10.2337/dc06-1539>

TOMA, A. *et al.* Intestinal  $\alpha$ -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 14, p. 180, Jun. 2014. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-180>

TRACY, J. A.; DYCK, P. J. B. The Spectrum of Diabetic Neuropathies. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 19, n. 1, p. 1-26, Fev. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2007.10.010>

TREML, J.; ŠMEJKAL, K. Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 720-738, Jul. 2016. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12204>

TSAI, E. C. *et al.* Reduced plasma peroxyl radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. **Diabetes**, v. 43, n. 8, p. 1010-1014, Ago. 1994. <https://doi.org/10.2337/diabetes.43.8.1010>

UEDA-WAKAGI, M. *et al.* 3-O-Acyl-epicatechins Increase Glucose Uptake Activity and GLUT4 Translocation through Activation of PI3K Signaling in Skeletal Muscle Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 16288-16299, Jul. 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms160716288>

URIBARRI, J. *et al.* Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. **The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 62, n. 4, p. 427-433, Apr 2007. <https://doi.org/10.1093/gerona/62.4.427>

URZÊDA, M. A. *et al.* Evaluation of the Hypoglycemic Properties of *Anacardium humile* Aqueous Extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 191080, Maio 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/191080>

VAN DE WIER, B. *et al.* The potential of flavonoids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 4, p. 834-855, Mar. 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.952399>

VAN DIEREN, S. *et al.* The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. **European Journal Cardiovascular Prevention and Rehabilitation**, v. 17, p. S3-8, Maio 2010. <https://doi.org/10.1097/01.hjr.0000368191.86614.5a>

VAN EUPEN, M. G. *et al.* The methylglyoxal-derived AGE tetrahydropyrimidine is increased in plasma of individuals with type 1 diabetes *mellitus* and in atherosclerotic lesions and is associated with sVCAM-1. **Diabetologia**, v. 56, n. 8, p. 1845-1855, Ago. 2013. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2919-8>

VAN HUNG, P. Phenolic Compounds of Cereals and Their Antioxidant Capacity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 25-35, 2016.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.708909>

VARIYA, B. C.; BAKRANIA, A. K.; PATEL, S. S. Antidiabetic potential of gallic acid from *Embllica officinalis*: Improved glucose transporters and insulin sensitivity through PPAR-gamma and Akt signaling. **Phytomedicine**, p. 152906, Abr. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152906>

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R. et al. Phenolic compounds: their journey after intake. **Food and Function**, v. 5, n. 2, p. 189-197, Fev. 2014. <https://doi.org/10.1039/C3FO60361J>

VIDEIRA, P. A. Q.; CASTRO-CALDAS, M. Linking Glycation and Glycosylation With Inflammation and Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 381, 2018. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00381>

VISTOLI, G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47, p. 3-27, Ago. 2013. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.815348>

VOLPE, C. M. O. et al. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 2, p. 119, Jan. 2018.

<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>

VOS, T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 743-800, 2015. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60692-4)

WANG, J. et al. Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. **PloS one**, v. 13, n. 5, p. e0197563-e0197563, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197563>

WANG, W. et al. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2666-2673, Nov. 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.022>

WILLIAMSON, G. *et al.* Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. **Biochemistry Society Transactions**, v. 28, n. 2, p. 16-22, Fev. 2000.

<https://doi.org/10.1042/bst0280016>

WU, C. H. et al. Dietary phenolic acids attenuate multiple stages of protein glycation and high-glucose-stimulated proinflammatory IL-1 $\beta$  activation by interfering with chromatin remodeling and transcription in monocytes. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, p. S127-140, Jul. 2010. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900395>



WU, C. H.; YEN, G. C. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n. 8, p. 3167-3173, Abr. 2005. <https://doi.org/10.1021/jf048550u>

XIA, T. et al. Polyphenol-rich extract of Zhenjiang aromatic vinegar ameliorates high glucose-induced insulin resistance by regulating JNK-IRS-1 and PI3K/Akt signaling pathways. **Food Chemistry**, v. 335, p. 127513, Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127513>

XIAO, J.; CHEN, T.; CAO, H. WITHDRAWN: Flavonoid glycosylation and biological benefits. **Biotechnology Advances**, Mai. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.05.004>

XIAO, J. B.; HÖGGER, P. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 23-38, 2015. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140706130807>

XIONG, R. et al. Polyphenols isolated from lychee seed inhibit Alzheimer's disease-associated Tau through improving insulin resistance via the IRS-1/PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v.251, p. 112548, Abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112548>

XU, D. et al. Antioxidant Activities of Quercetin and Its Complexes for Medicinal Application. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 6, p. 1123, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24061123>

YAMAGATA, K. Polyphenols Regulate Endothelial Functions and Reduce the Risk of Cardiovascular Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 22, p. 2443-2458, 2019. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190722100504>

YAMAGISHI, S. et al. Advanced Glycation End Products: A Molecular Target for Vascular Complications in Diabetes. **Molecular Medicine**, v. 21, p. S32-40, Out. 2015. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00067>

YAN, L. J. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. **Journal of Diabetes Research**, v. 2014, p. 137919, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/137919>

YANG, H. et al. Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in db/db mice. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 12, p. 3140-3152, 2019. <https://doi.org/10.1002/ptr.6486>

YEH, C. T.; YEN, G. C. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. **Journal of Nutrition**, v.136, n. 1, p. 11-15, Jan. 2006.  
<https://doi.org/10.1093/jn/136.1.11>

YEH, W.-J. et al. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 84-92, Jan. 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.017>

ZAIDUN, N. H.; THENT, Z. C.; LATIFF, A. A. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. **Life Sciences**, v. 208, p. 111-122, Set. 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.07.017>

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33-42, Abr. 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>

ZHANG, Z. F. et al. Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) protects the insulin sensitivity in rat L6 muscle cells exposed to dexamethasone condition. **Phytomedicine**, v. 17, n. 1, p. 14-18, Jan. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.09.007>

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes *mellitus* and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 88-98, Fev. 2018. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>

ZHENG, Y.-Z. et al. Antioxidant Activity of Quercetin and Its Glucosides from Propolis: A Theoretical Study. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7543, Ago. 2017.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-08024-8>

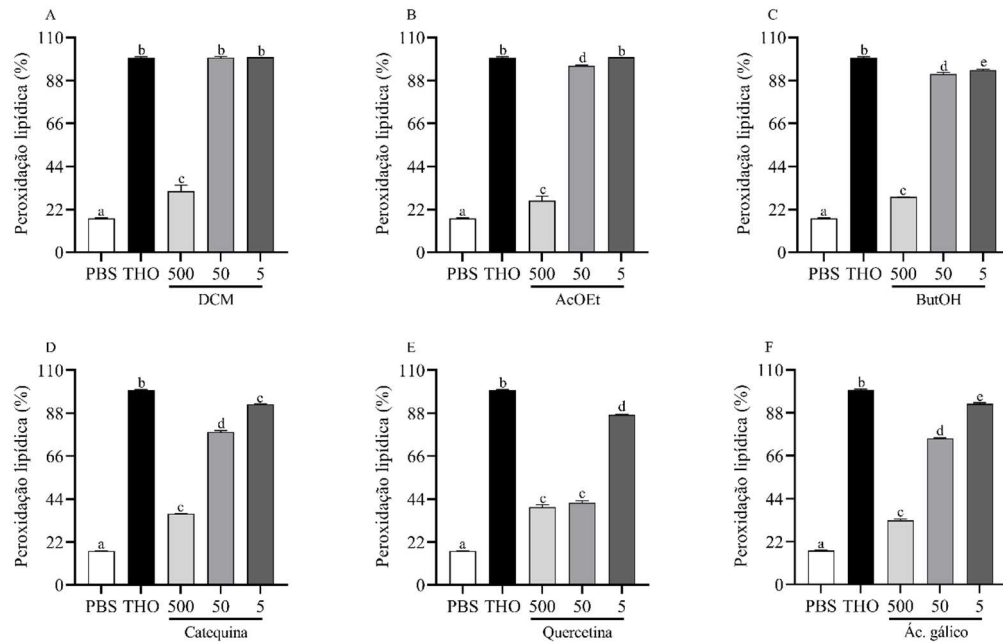
ZHOU, B. et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1513-1530, 2016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00618-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8)

ZHOU, Y. et al. Simultaneous analysis of N( $\epsilon$ )-(carboxymethyl)Lysine and N( $\epsilon$ )-(carboxyethyl)lysine in foods by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry with derivatization by 9-fluorenylmethyl chloroformate. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 2, p. C207-217, Fev. 2015. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12744>

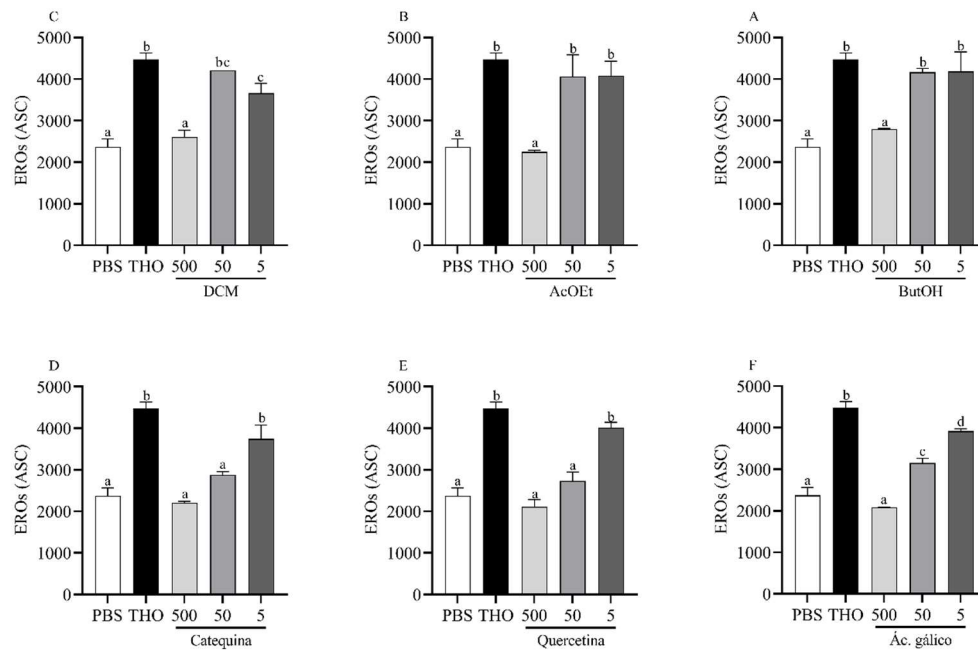
ZOU, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2268-2276, Mar. 2011. <https://doi.org/10.1021/jf104640k>



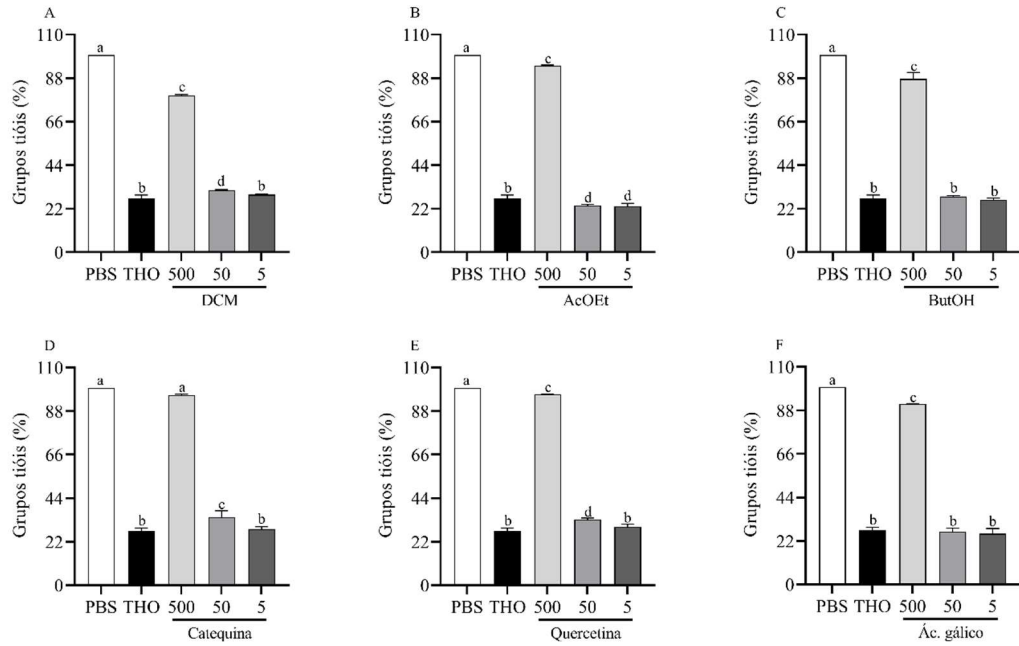
## APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR



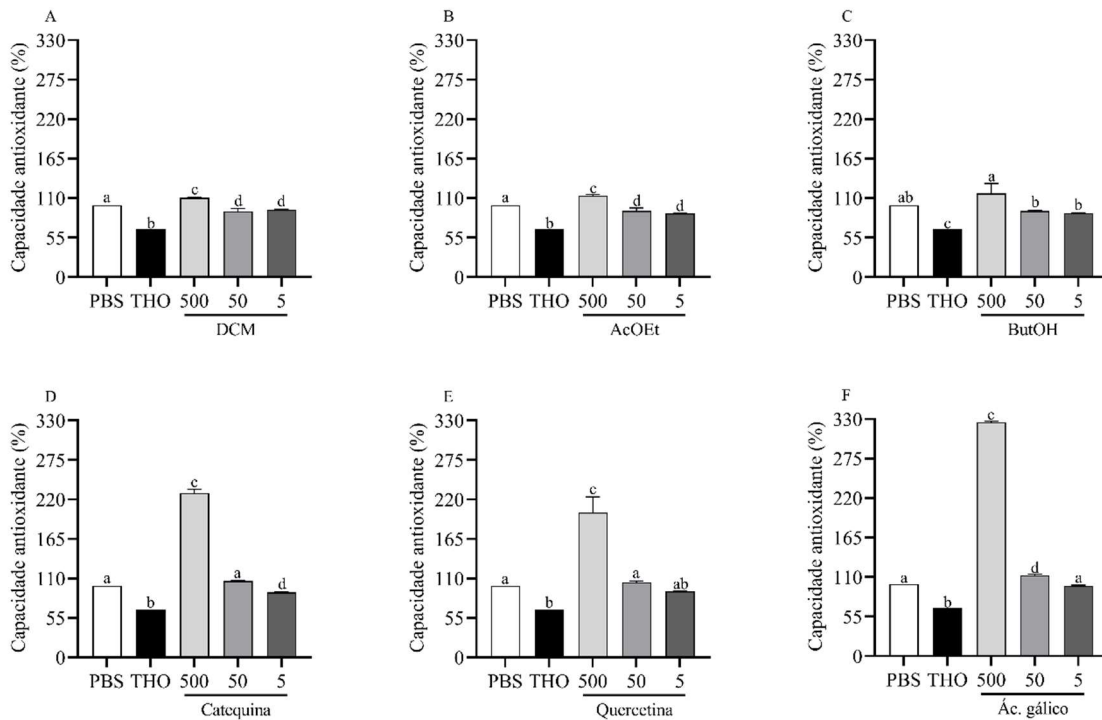
**Suplementar S1.** Avaliação da inibição da peroxidação lipídica pelas frações DCM, AcOEt e ButOH, e CQA no tecido hepático. PBS: tecido hepático não oxidado; THO: tecido hepático oxidado; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila e ButOH: n-butanol. Todas as amostras foram diluídas em etanol nas concentrações de 500, 50 e 5 µg / mL. Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



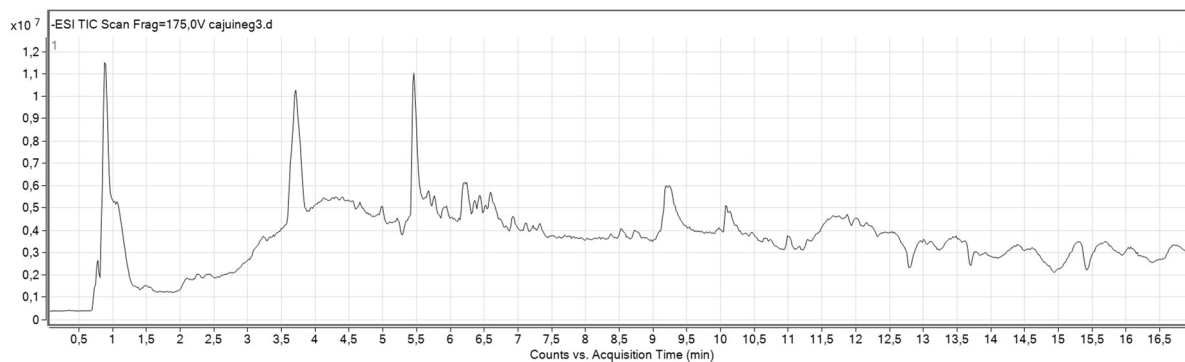
**Suplementar S2.** Avaliação da inibição da produção de EROs pelas frações DCM, AcOEt e ButOH, e CQA no tecido hepático. PBS: tecido hepático não oxidado; THO: tecido hepático oxidado; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila e ButOH: n-butanol. Todas as amostras foram diluídas em etanol nas concentrações de 500, 50 e 5 µg / mL. Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



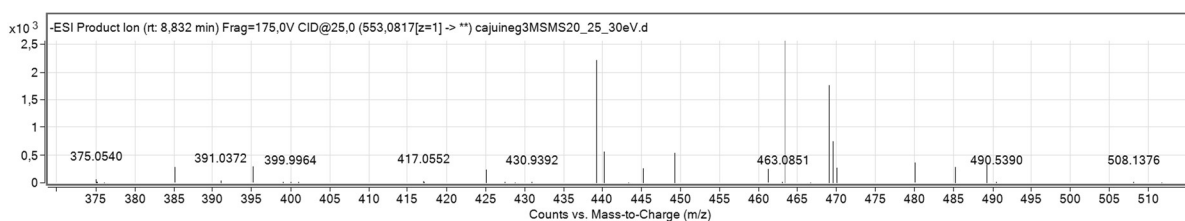
**Suplementar S3.** Avaliação da preservação dos grupos tióis pelas frações DCM, AcOEt e ButOH, e CQA no tecido hepático. PBS: tecido hepático não oxidado; THO: tecido hepático oxidado; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila e ButOH: n-butanol. Todas as amostras foram diluídas em etanol nas concentrações de 500, 50 e 5 µg / mL. Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



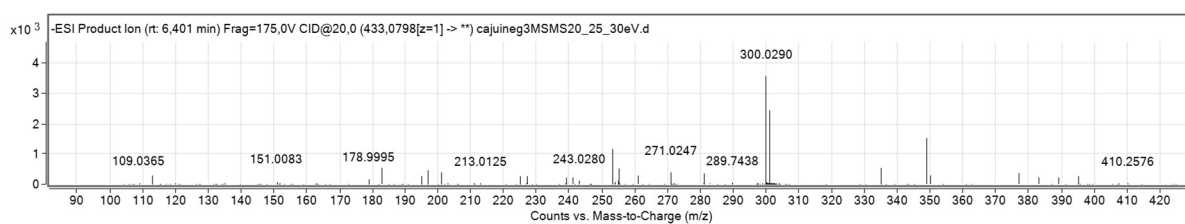
**Suplementar S4.** Avaliação da atividade antioxidante (método FRAP) das frações DCM, AcOEt e ButOH e CQA no tecido hepático. PBS: tecido hepático não oxidado; THO: tecido hepático oxidado; DCM: diclorometano; AcOEt: acetato de etila e ButOH: n-butanol. Todas as amostras foram diluídas em etanol nas concentrações de 500, 50 e 5 µg / mL. Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



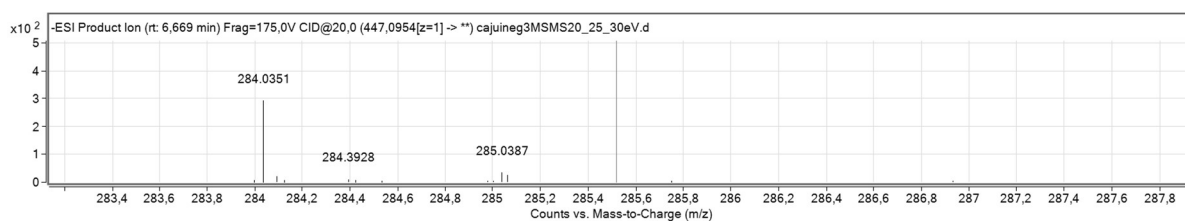
**Suplementar S5.** Cromatograma da fração de diclorometano (DCM) do extrato etanólico das folhas de *Anacardium humile* obtido por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo).



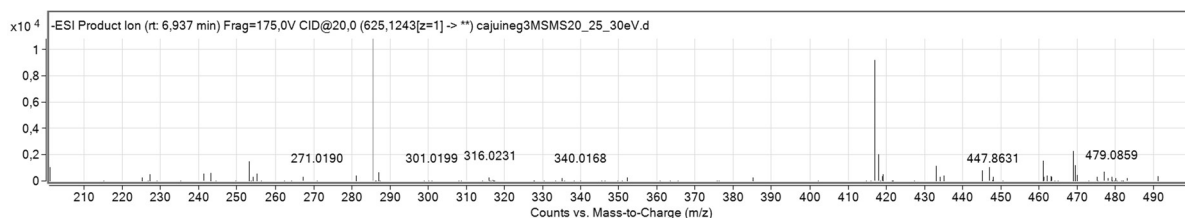
**Suplementar S6.** HPLC-ESI-MS/MS de  $\beta$ -criptoxantina presente na fração de diclorometano ( $m/z$  553 [M-H]<sup>-</sup>).



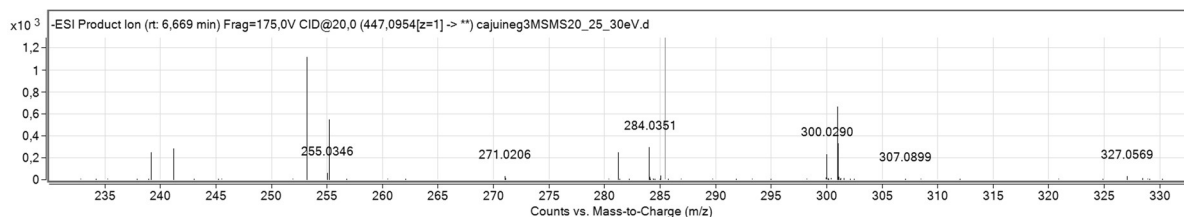
**Suplementar S7.** HPLC-ESI-MS/MS de quercetina 3-O-pentosídeo presente na fração de diclorometano ( $m/z$  433 [M-H]<sup>-</sup>).



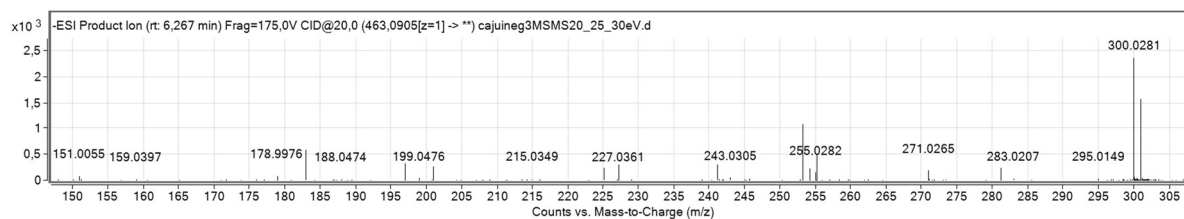
**Suplementar S8.** HPLC-ESI-MS/MS de kaempferol-3-O-glicosídeo presente na fração de diclorometano ( $m/z$  447 [M-H]<sup>-</sup>).



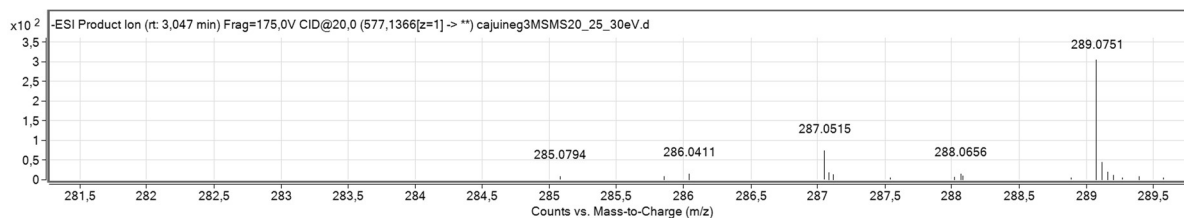
**Suplementar S9.** HPLC-ESI-MS/MS de quercetina-3,7-di-O-glicosídeo presente na fração de diclorometano ( $m/z$  625 [M-H]<sup>-</sup>).



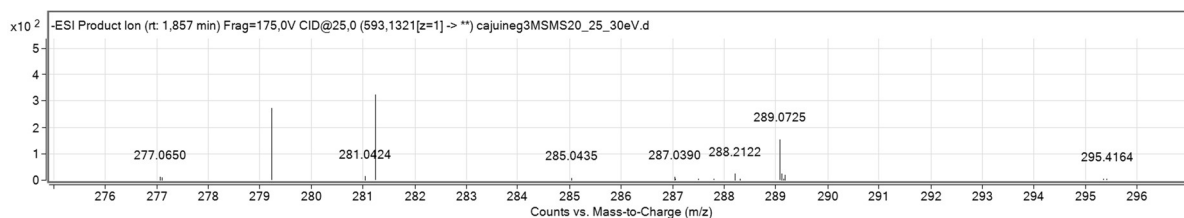
**Suplementar S10.** HPLC-ESI-MS/MS de luteolina-7-O-glicosídeo presente na fração de diclorometano ( $m/z$  447 [M-H]).



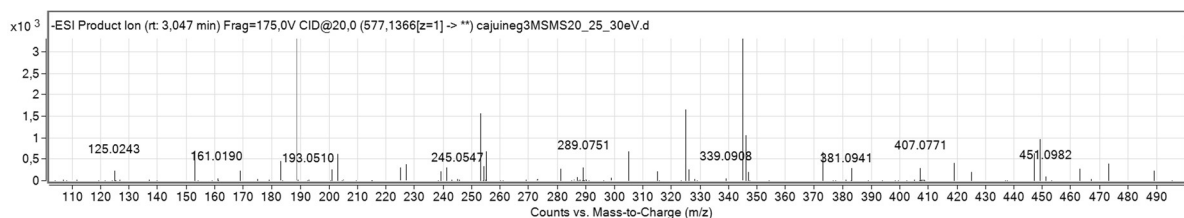
**Suplementar S11.** HPLC-ESI-MS/MS de isoquercetrina presente na fração de diclorometano ( $m/z$  463 [M-H]).



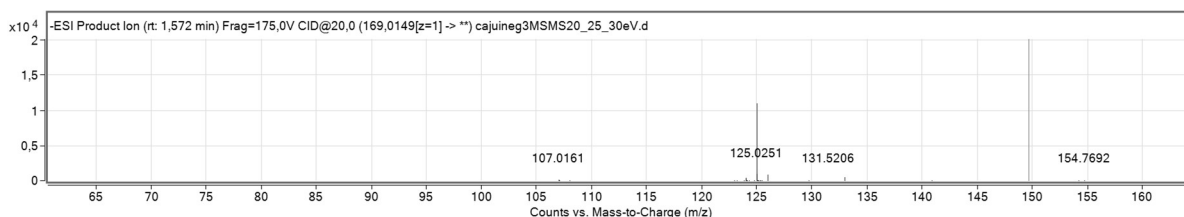
**Suplementar S12.** HPLC-ESI-MS/MS de kaempferol-3,7-dirhamnosídeo (kempferitrina) presente na fração de diclorometano ( $m/z$  577 [M-H]).



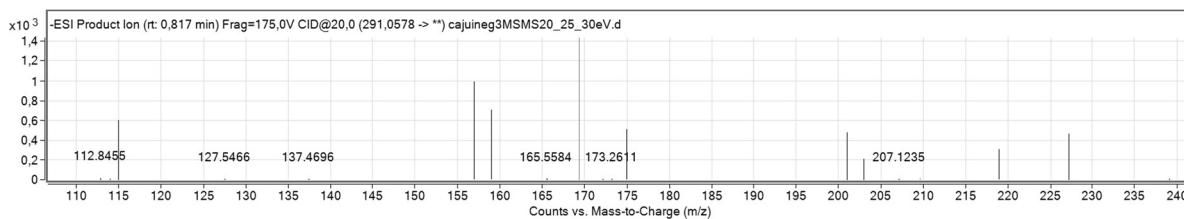
**Suplementar S13.** HPLC-ESI-MS/MS de kaempferol-3-O-glicosídeo-7-ramnosídeo presente na fração de diclorometano ( $m/z$  593 [M-H]).



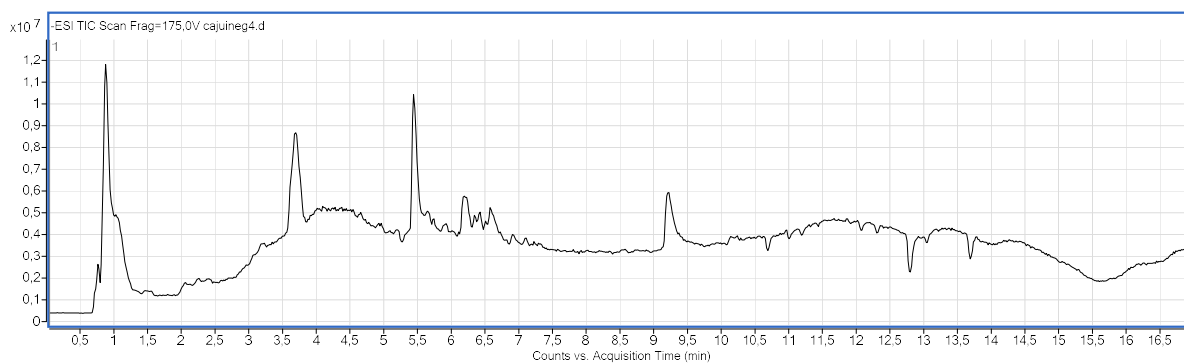
**Suplementar S14.** HPLC-ESI-MS/MS de procianidina B2 presente na fração de diclorometano ( $m/z$  577 [M-H]).



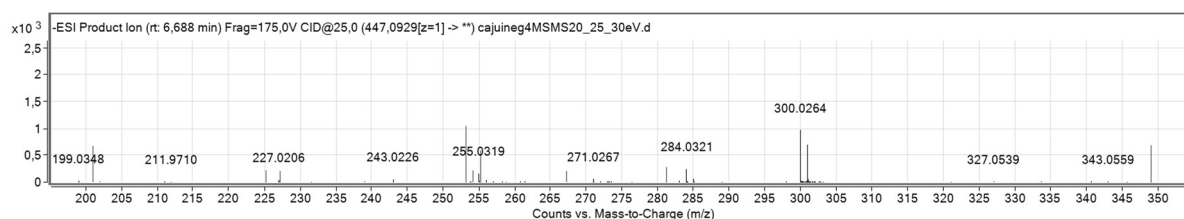
**Suplementar S15.** HPLC-ESI-MS/MS de ácido gálico presente na fração de diclorometano ( $m/z$  169 [M-H]).



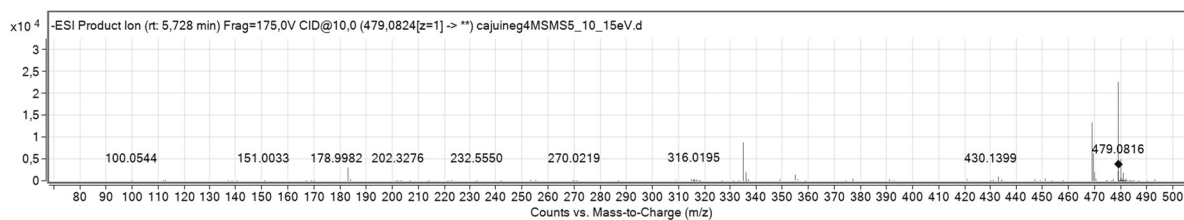
**Suplementar S16.** HPLC-ESI-MS/MS de catequina presente na fração de diclorometano ( $m/z$  291  $[M-H]^-$ ).



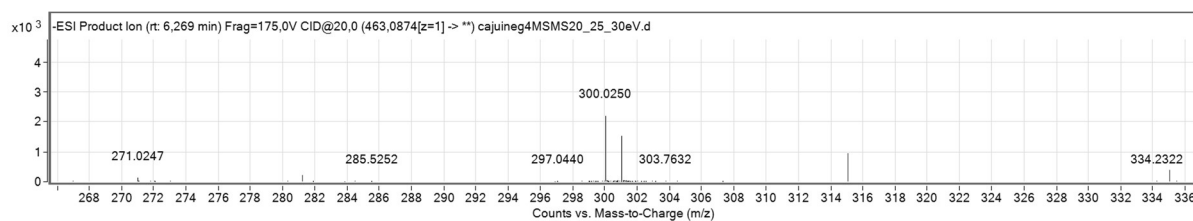
**Suplementar S17.** Cromatograma da fração de acetato de etila (AcOEt) do extrato etanólico das folhas de *Anacardium humile* obtido por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo).



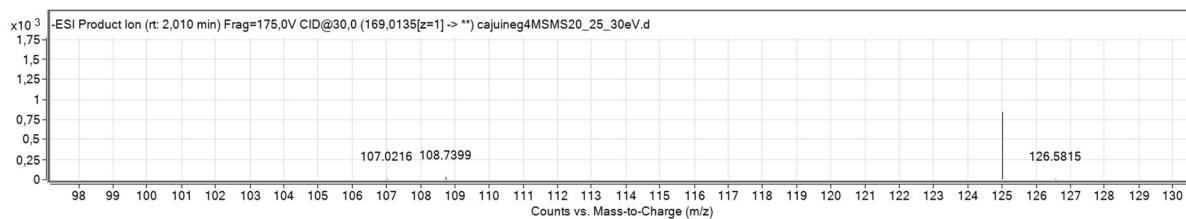
**Suplementar S18.** HPLC-ESI-MS/MS de kameferol-7-O-glicosídeo presente na fração de acetato de etila ( $m/z$  447  $[M-H]^-$ ).



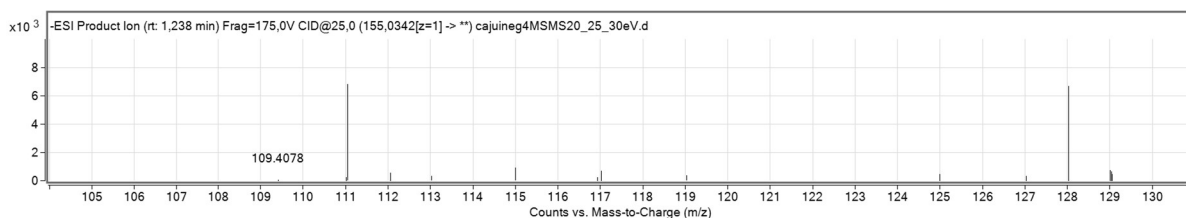
**Suplementar S19.** HPLC-ESI-MS/MS de miricetina-3-O-hexosídeo presente na fração de acetato de etila ( $m/z$  479  $[M-H]^-$ ).



**Suplementar S20.** HPLC-ESI-MS/MS de quercetina-3-O-hexosídeo presente na fração de acetato de etila ( $m/z$  463  $[M-H]^-$ ).



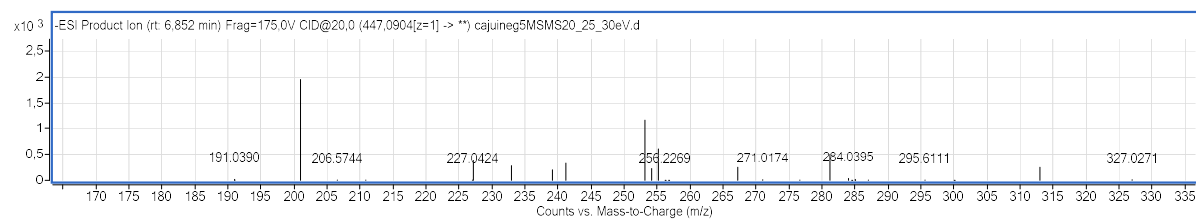
**Suplementar S21.** HPLC-ESI-MS/MS do ácido gálico presente na fração de acetato de etila ( $m/z$  169 [M-H]<sup>-</sup>).



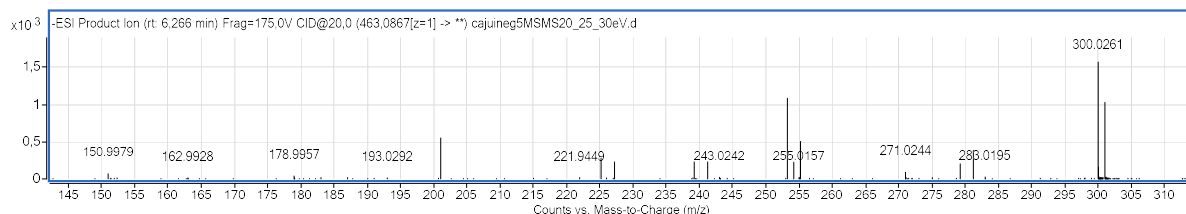
**Suplementar S22.** HPLC-ESI-MS/MS do ácido protocatecuico presente na fração de acetato de etila ( $m/z$  175 [M-H]<sup>-</sup>).



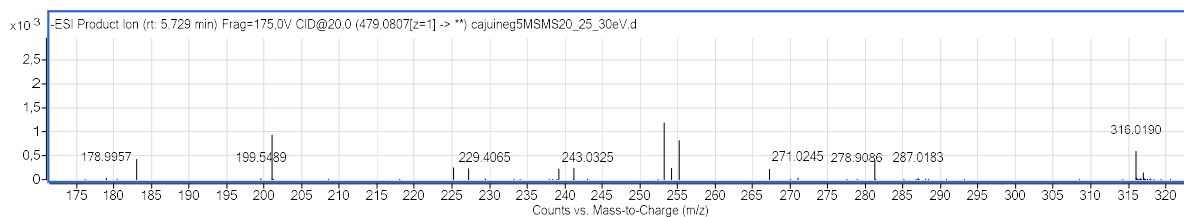
**Suplementar S23.** Cromatograma da fração de n-butanol (ButOH) do extrato etanólico das folhas de *Anacardium humile* obtido por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo).



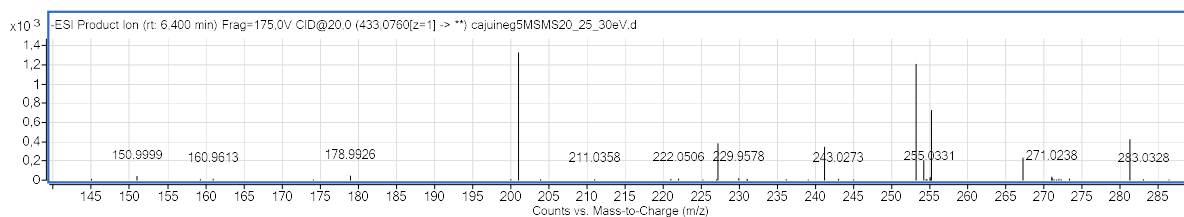
**Suplementar S24.** HPLC-ESI-MS/MS do kaempferol-7-O-glicosídeo presente na fração de n-butanol ( $m/z$  447 [M-H]<sup>-</sup>).



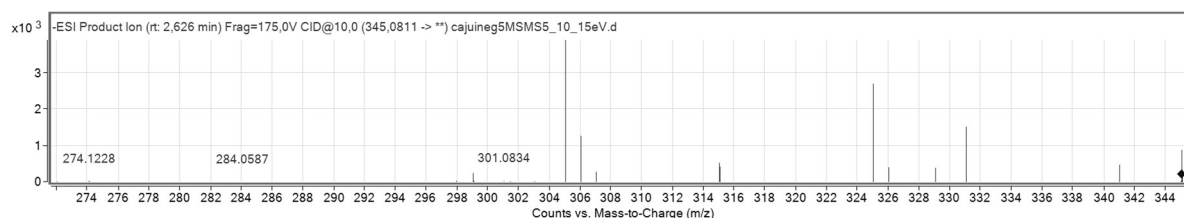
**Suplementar S25.** HPLC-ESI-MS/MS da isoquercetrina presente na fração de n-butanol ( $m/z$  463 [M-H]<sup>-</sup>).



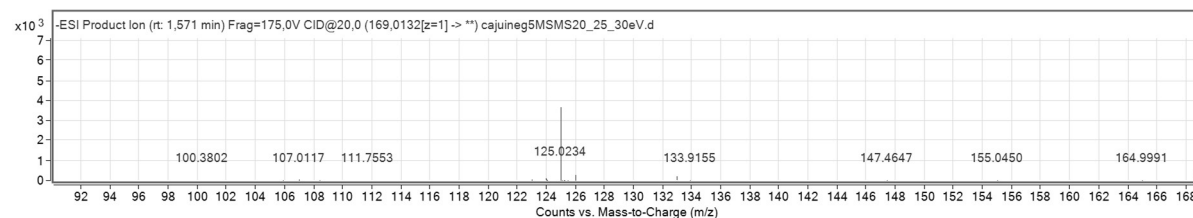
**Suplementar S26.** HPLC-ESI-MS/MS da miricetina-3-O-hexosídeo presente na fração de n-butanol (m/z 479 [M-H]).



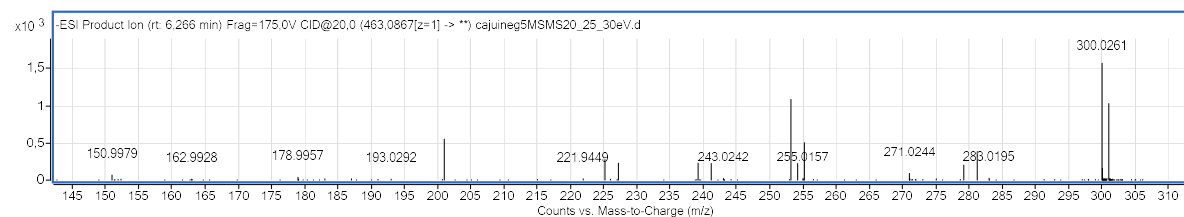
**Suplementar S27.** HPLC-ESI-MS/MS de narigenina-7-O-glicosídeo presente na fração de n-butanol (m/z 433 [M-H]).



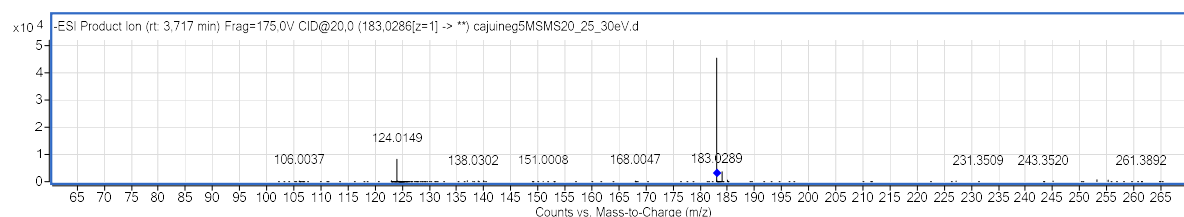
**Suplementar S28.** HPLC-ESI-MS/MS do ácido anacárdico presente na fração de n-butanol (m/z 345 [M-H]).



**Suplementar S29.** HPLC-ESI-MS/MS de ácido gálico presente na fração de n-butanol (m/z 169 [M-H]).



**Suplementar S30.** HPLC-ESI-MS/MS do hexosídeo de ácido elágico presente na fração de n-butanol (m/z 463 [M-H]).



**Suplementar S31.** HPLC-ESI-MS/MS de galato de metila presente na fração de n-butanol (m/z 463 [M-H]).