



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA



Compostos bioativos antioxidantes de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek inibem a peroxidação lipídica e oxidação da LDL e glicação do colágeno frente ao metilgloxal

Aluno: Vinícius Prado Bittar

Orientador: Foued Salmen Espíndola

Uberlândia – MG

2022



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA



Compostos bioativos antioxidantes de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek inibem a peroxidação lipídica e oxidação da LDL e glicação do colágeno frente ao metilglioal

Aluno: Vinícius Prado Bittar

Orientador: Foued Salmen Espíndola

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica.**

Uberlândia – MG

2022



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B624c
2022 Bittar, Vinicius Prado, 1996-
Compostos bioativos antioxidantes de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex
Reissek inibem a peroxidação lipídica e oxidação da LDL e glicação do
colágeno frente ao metilglioxal [recurso eletrônico] / Vinicius Prado
Bittar. - 2022.

Orientador: Foued Salmen Espíndola.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.7008>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

I. Bioquímica. I. Espíndola, Foued Salmen, 1957-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

André Carlos Francisco
Bibliotecário - CRB-6/3408

Uberlândia – MG

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB				
Data:	Dezenove de dezembro de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	16:10h	Hora de encerramento:	16:40h
Matrícula do Discente:	12022GBI012				
Nome do Discente:	Vinícius Prado Bittar				
Título do Trabalho:	Compostos bioativos antioxidantes de <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek inibem a peroxidação lipídica e oxidação da LDL e glicação do colágeno frente ao metilglicoxal.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Bioquímica redox e estresse oxidativo, enzimologia e marcadores bioquímicos.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Plantas Medicinais e Frutos do Cerrado e Diabetes				

Aos dezenove dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e dois, às 16:10 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Cisco Webex, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Foued Salmen Espindola (Orientador), João Paulo Viana Leite e Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Foued Salmen Espindola apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, 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 procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é 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 19/12/2022, às 16:46, 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 **Lúcio Roberto Cançado Castellano, Usuário Externo**, em 20/12/2022, às 11:35, 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 **João Paulo Viana Leite, Usuário Externo**, em 20/12/2022, às 14:36, 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, informando o código verificador **4084238** e o código CRC **B1FEF668**.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOQUÍMICA

Compostos bioativos antioxidantes de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek inibem a peroxidação lipídica e oxidação da LDL e glicação do colágeno frente ao metilglioxal

ALUNO: Vinícius Prado Bittar

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Foued Salmen Espíndola
(Orientador)

Examinadores:

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Foued Salmen Espíndola

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais e minha namorada, que sempre estiveram presentes comigo em todas as etapas deste processo. Sou grato por tudo que fizeram por mim e por todo o apoio e suporte que me deram, eu não teria conseguido se não fosse por essa ajuda.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais por toda a confiança nessa longa jornada. Não conseguiria se não tivesse tanto apoio. Agradeço a minha namorada, Ana Luiza Silva Borges por ser minha companheira não apenas da vida, mas também de trabalho e pesquisa. Dividimos momentos bons e difíceis, aprendemos que é assim que relações fortes e boas são formadas, com confiança, muito trabalho e dedicação. Agradeço aos meus parentes mais próximos (tios, primos e irmão e irmã) por sempre estarem me dando suporte durante esses últimos anos. Agradeço a equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI) por ter me ajudado e apoiado com os experimentos realizados e por serem uma excelente equipe de trabalho, que preza pela harmonia e respeito pelo grupo. Agradeço ao meu orientador Foued Salmen Espíndola, que se não tivesse me acolhido em 2017, eu não estaria realizando este trabalho e me tornando mestre em genética e bioquímica.

Sumário

Capítulo I

1 - Fundamentação Teórica.....	2
--------------------------------	---

Capítulo II

1 - Introdução.....	15
2 - Material e métodos.....	17
2.1 - Preparação do Extrato e frações orgânicas das folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i>	17
2.2 - Análise por HPLC-ESI-MS/MS.....	18
2.3 - Prospecção fitoquímica.....	19
2.3.1 - Determinação de fenóis totais.....	19
2.3.2 - Determinação de flavonoides totais.....	20
2.3.3 - Determinação de taninos condensados.....	20
2.4 - Análise da capacidade antioxidante.....	21
2.4.1 - Método da capacidade de redução do ferro - FRAP.....	21
2.4.2 - Método do sequestro do radical peroxil - ORAC.....	22
2.4.3 - Método do sequestro do radical DPPH - DPPH.....	22
2.5 - Análise da inibição da formação de AGE's.....	23
2.5.1 - Modelo BSA-Metilglioxal.....	24
2.5.2 - Modelo BSA-Frutose.....	25
2.5.3 - Modelo Arginina-Metilglioxal.....	25
2.5.4 - Modelo Colágeno-Metilglioxal.....	26
2.5.5 - Modelo LDL-Metilglioxal.....	26
2.6 - Análise <i>ex vivo</i> em tecido hepático.....	27
2.6.1 - Processamento do tecido hepático.....	27
2.6.2 - Inibição da peroxidação lipídica.....	28

2.7 - Isolamento, oxidação, peroxidação lipídica e glicação da Lipoproteína de baixa densidade (LDL).....	28
2.7.1 - Isolamento da LDL.....	28
2.7.2 - Indução da oxidação da LDL.....	29
2.8 - Análise da capacidade de inibição enzimática.....	29
2.8.1 - Inibição da α -glicosidase.....	30
2.8.2 - Inibição da α -amilase.....	30
2.8.3 - Inibição da butirilcolinesterase e acetilcolinesterase.....	31
2.9 - Análise da atividade antimicrobiana.....	32
2.10 - Análise estatística.....	33
3. - Resultados.....	34
3.1 - Rendimento dos extratos e frações de <i>Maytenus ilicifolia</i>	34
3.2 - Análise HPLC-ESI-MS/MS.....	35
3.3 - Prospecções fitoquímicas.....	40
3.4 - Análise da capacidade antioxidante.....	42
3.5 - Análise da inibição da formação de AGE's.....	43
3.6 - Inibição da peroxidação lipídica.....	46
3.7 - Análise da proteção da oxidação, glicação e peroxidação lipídica da LDL...	47
3.8 - Análise da capacidade de inibição enzimática.....	48
3.9 - Análise da atividade antimicrobiana.....	51
4. - Discussão.....	52
5. - Conclusão.....	57
6. - Referências.....	58
7. - Material suplementar.....	70

Apresentação

A pesquisa realizada no presente trabalho se baseia no estudo e caracterização do extrato etanólico das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek e suas frações orgânicas. Verificamos a atividade antioxidante, antiglicante, inibitória enzimática, capacidade de inibir a peroxidação lipídica de tecido hepático e da lipoproteína de baixa densidade (LDL), analisamos a capacidade das nossas amostras em inibir a oxidação da LDL e verificamos a capacidade antimicrobiana também.

Estudos com produtos naturais devem ser realizados para determinar a real capacidade biológica dos compostos ativos contidos nas plantas. Essa pesquisa tem como base investigar o que as folhas da “espinheira-santa” tem a oferecer.

No Capítulo I, o leitor irá se deparar com o referencial teórico do tema desta pesquisa, onde serão apresentados os motivos dessa pesquisa.

No Capítulo II, introdução, material e métodos, resultados e discussão da pesquisa serão apresentados.

CAPITULO I -

1. Fundamentação Teórica

Espécies reativas de oxigênio (ROS) é um termo que abrange espécies derivadas de O_2 que são mais reativas que o O_2 (Murphy et al., 2022), tais como: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}). Existem também as espécies reativas de nitrogênio (ERN's), onde podemos citar algumas como o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e ânion peroxinitrito ($ONOO^-$). Todas essas moléculas possuem meia-vida distinta, variando de nanossegundos até milissegundos (Frijhoff et al., 2015). Se colocarmos em uma escala de capacidade de oxidação, em primeiro lugar estaria o radical hidroxila (OH^{\bullet}) sendo o mais danoso, seguido por ($O_2^{\bullet-}$) e depois por (H_2O_2) (G. Yang et al., 1993). Em baixas concentrações, as ERO's exercem efeitos regulatórios nas funções celulares, isso inclui diferenciação, migração e sobrevivência (N T Moldogazieva et al., 2018), porém, em altas concentrações, essas espécies podem danificar ácidos graxos, ácidos nucleicos e podem levar a peroxidação lipídica, além disso, podem atuar na sinalização celular para estimular processo inflamatório e apoptose (Schieber & Chandel, 2014a; Sies et al., 2022).

O conceito de antioxidante se baseia em uma substância que elimina diretamente as ROS ou atua indiretamente em sistemas que tem por objetivo eliminar as ROS, as funções antioxidantes atuam para reduzir o estresse oxidativo (Pisoschi & Pop, 2015). Organismos aeróbicos desenvolveram um sistema antioxidante enzimático capaz de neutralizar os radicais livres, as principais moléculas são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR). A SOD realiza a reação de dismutação do O_2 em H_2O_2 , que posterior, catalisada pela GPx ou Catalase, é convertida em H_2O e O_2 (Ighodaro & Akinloye, 2018). As substâncias antioxidantes não enzimáticas envolvem proteínas como ferritina, transferrina e albumina, que por sua vez são capazes de ligar íons metálicos nas ROS impedindo sua formação, além disso, existem também compostos capazes de

capturar os radicais livres e neutraliza-los através da doação de elétrons, podemos citar os compostos: vitamina E, vitamina C, carotenoides, zinco, cobre, selênio e polifenóis (Witkowska, 2018).

O estresse oxidativo em sistemas biológicos é um processo que se caracteriza por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade do organismo em neutralizar essas espécies reativas através de antioxidantes endógenos e exógenos, fazendo com que macromoléculas sejam quimicamente modificadas, como por exemplo os ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Schieber & Chandel, 2014). Este mecanismo tem sido associado a varias patologias (Sies, 2015). Uma das consequências do estresse oxidativo é o processo de peroxidação lipídica, que consiste no dano nos lipídeos de membrana iniciado por agentes oxidantes, principalmente o peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido e os radicais hidroxila (Ramana et al., 2017). Esse processo possui consequências como: alteração na conformação estrutural e dinâmica das membranas celulares, alterando a função vital das proteínas de membrana e seu rompimento pode causar um aumento ainda maior na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), favorecendo o desenvolvimento e surgimento de algumas doenças, tais como: a diabetes *mellitus*, doenças neurodegenerativas, câncer e inflamação sistêmica (Gaschler et al., 2018).

Um mecanismo consequente do estresse oxidativo se baseia nas reações de glicoxidação, que consiste na formação de compostos altamente reativos (aldeídos eletrofílicos, e seus derivados), que por sua vez interagem com grupos amino livres nas proteínas e essa ligação causa modificações estruturais e funcionais na proteína, formando assim os produtos finais de glicação avançada (*Advanced glycation end products* - AGE's) (Vistoli et al., 2013). Esse processo causa danos celulares, prejudica a função da célula e pode desencadear o início da via da apoptose (Nurbubu T Moldogazieva et al., 2019). As consequências dos AGE's para a saúde podem ser severas, desde o surgimento até o agravamento de doenças (Perez Gutierrez & Velazquez, 2020; Zhou et al., 2020).

O acúmulo de ROS consequente da hiperglicemia em indivíduos diabéticos pode provocar o aumento de AGE's (Ferreira et al., 2010). Uma forma de diminuir o aumento da produção de AGE's é controlando os níveis glicêmicos do indivíduo através da inibição das enzimas de hidrólise de carboidratos, α -amilase e α -glicosidase (Kumar et al., 2011). Inibindo as hidrolases glicosídicas, indiretamente a produção de AGE's pode ser diminuída (Rao & Mohan, 2017).

Na doença de Alzheimer, o estresse oxidativo está relacionado com o início da doença, onde as espécies reativas de oxigênio causam dano às mitocôndrias, esses danos provocam alterações na produção energética e estrutura mitocondrial, além disso, o estresse oxidativo causa a geração de aldeído 4-hidroxi-nonenal (HNE), um aldeído neurotóxico que é detectado nos estágios iniciais na doença de Alzheimer (Misrani et al., 2021; Sayre et al., 1997). Estudos da década de 1990 relataram as modificações encontradas na enzima beta amiloide ($A\beta$) na doença de Alzheimer, onde as mesmas se encontravam de maneira agregada no cérebro, logo, esse acúmulo de células pode ser tóxico para a célula, pois podem permeabilizar as membranas celulares e iniciar eventos que levam a morte celular (Glabe, 2006). O estresse oxidativo está ligado a esse evento devido ao acúmulo de íons metálicos como zinco, ferro e cobre serem moduladores dessa agregação e já terem sido encontrados nas placas de $A\beta$ (Cheignon et al., 2017; Lovell et al., 1998).

Outra doença que está correlacionada com o estresse oxidativo é a aterosclerose. A molécula chave dessa doença é a lipoproteína de baixa densidade (LDL) (X. Yang et al., 2017). Durante o estresse oxidativo, a LDL é modificada para LDL oxidada (Ox-LDL) e as ERO's induzem a oxidação lipídica, promovendo modificações na conformação da LDL, fazendo com que sua densidade aumente e ocorra a degradação da única molécula de ApoB encontrada em sua estrutura (Role et al., 1992). A aterosclerose se baseia no acúmulo de Ox-LDL na matriz extracelular das células epiteliais das artérias. Nesse acúmulo, monócitos são recrutados e migram para a região afetada, onde

serão diferenciados em macrófagos para fagocitar a Ox-LDL e seu colesterol. Esse processo de fagocitose gera células espumosas na artéria afetada. As placas ateroscleróticas são as células que restaram desse processo, tecido cicatricial e células espumosas. Essas placas podem levar ao acidente vascular cerebral (AVC) ou infarto (Nelson & Cox, 2013).

A principal função de um composto antioxidante é neutralizar um processo oxidativo, através da estabilização do ROS, podendo então retardar ou impedir processos degenerativos (Gulcin, 2020), assim os agentes antioxidantes podem reduzir o estresse oxidativo (Godić et al., 2020). Atualmente os principais antioxidantes exógenos são: vitamina C, vitamina E e compostos fenólicos (Willett, 2006). Existem alguns tipos de mecanismos pelos quais os compostos antioxidantes atuam, são eles: esgotamento do oxigênio molecular, remoção de íons metálicos pró-oxidantes e sequestro de ROS (Martysiak-Zurowska & Wenta, 2012). Moléculas antioxidantes podem ser encontradas principalmente em plantas, que tem sido a base da medicina tradicional em todo o mundo (Matkowski, 2008). Existe um leque enorme de plantas que possuem em sua composição moléculas antioxidantes, como, terpenos, taninos, flavonoides, catequinas e proantocianidinas (Francenia Santos-Sánchez et al., 2019; Krishnaiah et al., 2011).

Produtos naturais têm promovido um papel importante na descoberta de medicamentos para diversas doenças, como problemas cardiovasculares, doenças infecciosas e inflamação. Os compostos naturais provindos das plantas são divididos em diversas classes: alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, saponinas e taninos (Lin et al., 2020). Os compostos bioativos dessas classes vão atuar inibindo atividades enzimáticas, inibindo formação de produtos avançados de glicação proteica e podem atuar também como agentes antioxidantes (Atanasov et al., 2015; Barba-Ostria et al., 2022; Harvey et al., 2015). Uma pesquisa realizada por Justino et al., (2018) mostrou a capacidade antioxidante, antidiabética, potencial inibitório enzimático frente a alfa amilase e

alfa glicosidase e inibição da peroxidação lipídica da *Annona muricata*. Outra pesquisa realizada por Franco et al., (2018) mostrou a capacidade antioxidante e antiglicante de diferentes produtos naturais, foram eles: *Arctium lappa*, *Bauhinia forficata*, *Camellia sinensis*, *Momordica charantia*, *Rosmarinus officinalis* e *Syzygium cumini*. Existem trabalhos também que isolam compostos ativos de plantas com potencial biológico, que foi o caso da pesquisa realizada por Pereira et al., (2017), onde a estefalagina, isolada da casca da fruta de *Annona crassiflora* foi capaz de inibir a lipase pancreática, podendo atuar como um agente anti-obesidade. Um estudo realizado por Karak (2019) mostrou que os flavonoides quercetina e luteolina podem atuar como agentes anti-inflamatórios, afetando o sistema enzimático que envolve o processo inflamatório, já outra pesquisa realizada por Lima Júnior et al., (2021) mostrou os efeitos benéficos da *Anacardium humile*, planta que possui uma alta concentração de compostos fenólicos como kaempferol, ácido gálico, quercetina e (epi)catequina, compostos que se provaram excelentes no combate ao estresse oxidativo.

O uso de plantas na medicina popular é relatado há vários anos, e atualmente, com a descoberta científica da ampla variedade de biomoléculas ativas nesses produtos naturais, o desenvolvimento de novas pesquisas tem o objetivo principal de elucidar o seu real potencial biológico (Cium et al., 2020; Kopustinskiene et al., 2020).

O gênero *Maytenus* possui aproximadamente 300 espécies e cerca de 50 dessas espécies são encontradas em diversas regiões do Brasil, incluindo Floresta Amazônica, Mata Atlântica, caatinga, cerrado e campos rupestres (Groppo et al., 2014), porém também pode ser encontrada nos países vizinhos Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia. A *Maytenus ilicifolia* é uma planta conhecida popularmente como “espinheira-santa”, “cancrosa”, “espinho de Deus” ou “cancrosa”, e é caracterizada como uma árvore de pequeno porte, podendo chegar até 5 metros de altura, e suas folhas ramificadas é a parte mais utilizada pelo homem, através do chá por infusão, onde o primeiro relato do uso popular de

espinheira-santa é datado de 1958, utilizada para conter distúrbios gastrointestinais (Karyna et al., 2022). Uma das espécies bastante estudada é a *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, da família Celastraceae, tal espécie está listada como fitoterápico capaz de combater a úlcera gástrica e sintomas de dispepsia, na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (Meirelles, 2022). Além disso, outros estudos mostram que ela possui diversas atividades biológicas, como capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória (Chiapetti et al., 2019; Jorge et al., 2004). Todas essas atividades são determinadas pela alta variedade de classes de compostos nas folhas dessa espécie, tais como: terpenóides, alcaloides, flavonoides, fenóis e taninos (L. Zhang et al., 2020), onde podemos encontrar kaempferol, quercetina e epicatequina (Leite et al., 2010; Sannomiya et al., 1998; Vilegas et al., 1999).

A realização de pesquisas envolvendo a *Maytenus ilicifolia* vem se tornando cada vez mais popular (Meirelles, 2022). Um estudo dirigido por Paulino et al., (2019) mostrou o poder da espinheira-santa frente ao combate de úlcera e distúrbios gástricos, outro estudo, conduzido por de Moura et al., (2021) mostrou a capacidade do extrato de *Maytenus ilicifolia* em promover a cicatrização de feridas e aumentar a atividade de pró metaloproteinase (MMP9) e MMP9 devido à presença de compostos fenólicos e taninos na planta. Um trabalho realizado por Marins et al. (2021) mostrou o efeito da espinheira-santa sobre o metabolismo da glicose em ratos hiperglicêmicos, onde os extratos obtidos da folha de espinheira-santa foram eficazes na redução da glicemia em ratos, além disso, o extrato atuou como agente antioxidante no fígado desses animais (Marins et al., 2021). A atividade antimicrobiana da *Maytenus ilicifolia* foi documentada na pesquisa feita por Paula et al., (2021), onde a planta foi submetida ao teste de combate a *H. pylori* (bactéria responsável pela gastrite e úlcera que se aloja na mucosa estomacal) e os resultados obtidos foram que a espinheira-santa pode ser utilizada como medida profilática da infecção por *H. pylory*, pois os compostos contidos na folha impedem que a bactéria adere as células da mucosa estomacal, atuando assim como agente protetora. Todos esses resultados justificam a

realização dos estudos que vem sendo publicados na literatura, porém, novas pesquisas devem ser realizadas para elucidar todas as vias de utilização dessa planta.

CAPÍTULO II

Compostos bioativos antioxidantes de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek inibem a peroxidação lipídica e oxidação da LDL e glicação do colágeno frente ao metilglioxal

RESUMO

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek, mais conhecida pelos nomes populares Espinheira-Santa, Cancerosa ou Cancorosa é comumente utilizada no Brasil para tratar distúrbios gastrointestinais. Este presente estudo teve como objetivo principal analisar *in vitro* e *ex vivo* o extrato etanólico da folha de *Maytenus ilicifolia* (EE-Mi) e suas frações orgânicas hexano (FH-Mi), diclorometano (FDM-Mi), acetato de etila (FAE-Mi), n-butanol (FB-Mi) e resíduo hidrometanólico (FHM-Mi) e submeter essas amostras para análise da capacidade antioxidante, antiglicante, capacidade de inibição enzimática, capacidade de proteção da peroxidação lipídica e capacidade de proteção da oxidação da LDL (*low density lipoprotein*). Em todos os experimentos, as frações FAE-Mi e FB-Mi apresentaram os melhores resultados, a partir dessa conclusão, essas frações foram primordialmente analisadas em HPLC-ESI-MS/MS, onde foi possível identificar compostos com capacidade antioxidante, capacidade para inibição enzimática e inibição de peroxidação lipídica, tais como: ácido málico, catequina e derivados de catequina, quercetina e kaempferol. No ensaio da capacidade de redução do ferro (FRAP), todas as amostras, com exceção da FHM-Mi, apresentaram valores entre 752 ~ 953 $\mu\text{mol Trolox eq.eg}^{-1}$, similares ao controle positivo quercetina (987 $\mu\text{mol Trolox eq.eg}^{-1}$), no método do sequestro do radical peroxil (ORAC), as frações não apresentaram diferença estatística quando comparado com o controle positivo, quercetina (2279 $\mu\text{mol Trolox eq.eg}^{-1}$) variando os valores de 2332 ~ 2509 $\mu\text{mol Trolox eq.eg}^{-1}$ e no sequestro do radical DPPH as amostras foram submetidas ao cálculo de EC_{50} , onde a amostra com melhor resultado foi a FAEMi (2,42 $\mu\text{g/mL}$). Em todos os modelos de glicação (BSA/frutose, BSA/metilglioxal, Arginina/metilglioxal e Colágeno/metilglioxal), as amostras apresentaram potencial antiglicante, com exceção da FHMMi. As frações FAE-Mi (25 $\mu\text{g/mL}$) e FB-Mi (46 $\mu\text{g/mL}$) foram capazes de inibir 50% da glicação do colágeno frente ao metilglioxal, em comparação com o controle positivo. As amostras EE-Mi, FAE-Mi e FB-Mi apresentaram atividade inibitória enzimática da α -amilase, expressando baixos valores de EC_{50} (2,42, 7,95 e 23,83 $\mu\text{g/mL}$), em comparação com o

controle positivo. No modelo *ex vivo* de indução de peroxidação lipídica, foi observado que o EE-Mi (0,11 nmol MDA/mg Proteínas), FAE-Mi (0,10 nmol MDA/mg Proteínas), FB-Mi (0,09 nmol MDA/mg Proteínas) e a quercetina (0,08 nmol MDA/mg Proteínas) apresentaram capacidade inibitória da peroxidação lipídica em comparação com o tecido hepático oxidado (0,36 nmol MDA/mg Proteínas). Com exceção da fração hidrometanólica (FHM-Mi), todas as outras frações foram eficazes na inibição da oxidação da LDL, onde os resultados variaram de 0,76 até 3,45 no cálculo da área sob a curva (AUC) em comparação com a LDL oxidada (15,27) e a LDL sem tratamento (1,30 AUC). Todas as amostras, com exceção da FHM-Mi, apresentaram valores acima de 50% de inibição da glicação da LDL foram capazes de proteger a LDL frente à peroxidação lipídica (100% de inibição). Os resultados obtidos neste trabalho são coerentes com a capacidade medicinal da planta, uma vez que a mesma possui uma alta concentração de flavonoides, compostos fenolicos e taninos condensados. Em conclusão, o extrato etanólico de *Maytenus ilicifolia* e suas frações orgânicas apresentaram um alto potencial biológico, resultados que favorecem a continuação do trabalho em modelo *in vivo*, para elucidar de maneira mais específica os mecanismos de ação da *Maytenus ilicifolia*.

Palavras-chave: *Maytenuus ilicifolia*, antiglicação, LDL

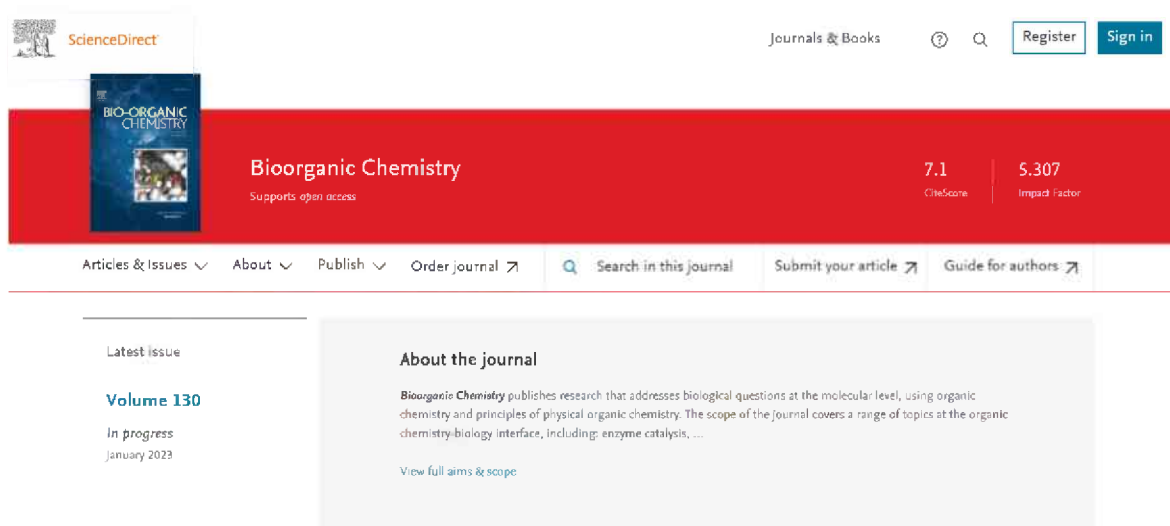
Abstract

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek, better known by the popular names “Espinheira-santa”, “Cancerosa” or “Cancorosa” is commonly used in Brazil to treat gastrointestinal disorders. The main objective of this study was to analyze *in vitro* and *ex vivo* the ethanol extract of the *maytenus ilicifolia* leaf (EE-Mi) and its organic fractions hexane (FH-Mi), dichloromethane (FDM-Mi), ethyl acetate (FAE-Mi), n-butanol (FB-Mi) and hydromethane residue (FHM-Mi) and submit these samples for analysis of antioxidant capacity, antiglycating, enzymatic inhibition capacity, lipid peroxidation protection capacity and low density lipoprotein (LDL) oxidation protection capacity. In all experiments, the FAE-Mi and FB-Mi fractions showed the best results, from this conclusion, these fractions were primarily analyzed in HPLC-ESI-MS/MS, where it was possible to identify compounds with antioxidant capacity, capacity for enzymatic inhibition and inhibition of lipid peroxidation, such as: malic acid, catechin and catechin, quercetin and kaempferol derivatives. In the iron reduction capacity (FRAP) assay, all samples, with the exception of FHM-Mi, presented values between 752 ~ 953 $\mu\text{mol Trolox eq.eg}^{-1}$, similar to the positive control quercetin (987 $\mu\text{mol Trolox eq.eg}^{-1}$), in the peroxyl radical sequestration method (ORAC), the fractions showed no statistical difference when compared with the positive control, quercetin (2279 $\mu\text{mol Trolox eq.eg}^{-1}$) varying the values of 2332 ~ 2509 $\mu\text{mol Trolox eq.eg}^{-1}$ and in the scavenger of the DPPH radical the samples were submitted to the EC_{50} calculation, where the sample with the best result was FAEMi (2.42 $\mu\text{g/mL}$). In all glycation models (BSA/fructose, BSA/methylglyoxal, Arginine/methylglyoxal and Collagen/methylglyoxal), the samples presented antiglycating potential, with the exception of FHM-Mi. The FAE-Mi (25 $\mu\text{g/mL}$) and FB-Mi (46 $\mu\text{g/mL}$) fractions were able to inhibit 50% of collagen glycation against methylglyoxal compared to positive control. The EE-Mi, FAE-Mi and FB-Mi samples showed enzymatic inhibitory activity of α -amylase, expressing low values of EC_{50} (2.42, 7.95 and 23.83 $\mu\text{g/mL}$), compared with the positive control. In the *ex vivo* lipid peroxidation induction model, it was observed that EE-Mi (0.11 $\text{nmol MDA/mg Proteins}$), FAE-

Mi (0.10 nmol MDA/mg Proteins), FB-Mi (0.09 n molmol MDA/mg Proteins) and quercetin (0.08 nmol MDA/mg Proteins) showed inhibitory capacity of lipid peroxidation compared to oxidized liver tissue (0.36 nmol MDA/mg Proteins). With the exception of the hydromethane fraction (FHM-Mi), all other fractions were effective in inhibiting LDL oxidation, where the results ranged from 0.76 to 3.45 in the calculation of the area under the curve (AUC) compared to oxidized LDL (15.27) and untreated LDL (1.30 AUC). All samples, with the exception of FHM-Mi, presented values above 50% of LDL glycation inhibition were able to protect LDL against lipid peroxidation (100% inhibition). The results obtained in this work are consistent with the medicinal capacity of the plant, since it has a high concentration of flavonoids, phenolic compounds and condensed tannins. In conclusion, the ethanolextract of *Maytenus ilicifolia* and its organic fractions presented a high biological potential, results that favor the continuation of the work in an in vivo model, to elucidate more specifically the mechanisms of action of *Maytenus ilicifolia*.

Palavras-chave: *Maytenus ilicifolia*, antiglycation, LDL

Revista escolhida para submissão



The screenshot shows the journal page for *Bioorganic Chemistry* on ScienceDirect. The page features a red header with the journal title, CiteScore (7.1), and Impact Factor (5.307). Below the header is a navigation bar with links for Articles & Issues, About, Publish, Order journal, Search in this journal, Submit your article, and Guide for authors. The main content area includes a 'Latest issue' section for Volume 130 (January 2023) and an 'About the journal' section describing the journal's focus on biological questions at the molecular level.

ScienceDirect

Journals & Books

Register Sign in

Bioorganic Chemistry
Supports open access

7.1 CiteScore | 5.307 Impact Factor

Articles & Issues About Publish Order journal Search in this journal Submit your article Guide for authors

Latest issue

Volume 130
In progress
January 2023

About the journal

Bioorganic Chemistry publishes research that addresses biological questions at the molecular level, using organic chemistry and principles of physical organic chemistry. The scope of the journal covers a range of topics at the organic chemistry-biology interface, including: enzyme catalysis, ...

[View full aims & scope](#)

sciedirect.com/journal/bioorganic-chemistry

Fator de impacto: 5.307

1. Introdução

Espécies reativas de oxigênio (ROS) é um termo que abrange espécies derivadas de O_2 que são mais reativas que o O_2 (Murphy et al., 2022), tais como: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}). O conceito de antioxidante se baseia em uma substância que elimina diretamente as ROS ou atua indiretamente em sistemas que tem por objetivo eliminar as ROS, as funções antioxidantes atuam para reduzir o estresse oxidativo, atualmente os principais antioxidantes exógenos são: vitamina C, vitamina E e compostos fenólicos (Pisoschi & Pop, 2015; Willett, 2006).

O estresse oxidativo em sistemas biológicos é um processo que se caracteriza por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade do organismo em neutralizar essas espécies reativas através de antioxidantes endógenos e exógenos, fazendo com que macromoléculas sejam prejudicadas, como por exemplo, os ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Schieber & Chandel, 2014). Produtos naturais têm promovido um papel importante na redução do estresse oxidativo.

Os compostos naturais provindos das plantas são divididos em diversas classes: alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, saponinas e taninos (Lin et al., 2020). Os compostos bioativos dessas classes podem atuar inibindo atividades enzimáticas, inibindo formação de produtos avançados de glicação proteica e podem atuar também como agentes antioxidantes (Atanasov et al., 2015; Barba-Ostria et al., 2022; Harvey et al., 2015).

O uso de plantas na medicina popular é relatado há vários anos, e atualmente, com a descoberta científica da ampla variedade de biomoléculas ativas nesses produtos naturais, o desenvolvimento de novas pesquisas tem o objetivo principal de elucidar o seu real potencial biológico (Cium et al., 2020; Kopustinskiene et al., 2020).

O gênero *Maytenus* possui aproximadamente 300 espécies e cerca de 50 dessas espécies são encontradas em diversas regiões do Brasil, incluindo Floresta Amazônica, Mata Atlântica, caatinga, cerrado e campos rupestres (Groppo et al., 2014). A *Maytenus ilicifolia* é uma planta conhecida popularmente como “espinheira-santa”, “cancorosa”, “espinho de Deus” ou “cancrosa”, e suas folhas ramificadas é a parte mais utilizada pelo homem, através do chá por infusão, onde o primeiro relato do uso popular de espinheira-santa é datado de 1958, utilizada para conter distúrbios gastrointestinais (Karyna et al., 2022).

Uma das espécies bastante estudada é a *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, da família Celastraceae, tal espécie está listada como fitoterápico capaz de combater a úlcera gástrica e sintomas de dispepsia, na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). Além disso, outros estudos mostram que ela possui diversas atividades biológicas, como capacidade antioxidante e atividade anti-inflamatória (Chiapetti et al., 2019; Jorge et al., 2004). Todas essas atividades são determinadas pela alta variedade de classes de compostos nas folhas dessa espécie, tais como: terpenóides, alcaloides, flavonoides, fenóis e taninos (L. Zhang et al., 2020), onde podemos encontrar kaempferol, quercetina e epicatequina (Leite et al., 2010; Sannomiya et al., 1998; Vilegas et al., 1999).

A realização de pesquisas envolvendo a *Maytenus ilicifolia* vem se tornando cada vez mais popular (Meirelles, 2022). Um estudo dirigido por Paulino et al., (2019) mostrou o poder da espinheira-santa frente ao combate de úlcera e distúrbios gástricos, outro estudo, conduzido por de Moura et al., (2021) mostrou a capacidade do extrato de *Maytenus ilicifolia* em promover a cicatrização de feridas e aumentar a atividade de pró metaloproteinase (MMP9) e MMP9 devido à presença de compostos fenólicos e taninos na planta. A atividade antimicrobiana da *Maytenus ilicifolia* foi documentada na pesquisa feita por Paula et al., (2021), onde a planta obteve sucesso frente ao combate da *H. pylori*. Todos esses resultados justificam a realização dos estudos que vem sendo publicados na

literatura, porém, novas pesquisas devem ser realizadas para elucidar todas as vias de utilização dessa planta.

Este trabalho consiste em investigar, através de ensaios *in vitro* e *ex vivo*, o extrato etanólico de *Maytenus ilicifolia* e suas frações orgânicas, quanto ao seu conteúdo de fenóis, flavonoides e taninos condensados totais, sua capacidade antioxidante, capacidade de inibição enzimática, potencial de inibição de glicação, capacidade de inibição da oxidação da LDL, inibição da peroxidação lipídica de tecido hepático e da LDL e atividade antimicrobiana.

2. Material e métodos

2.1 Preparação do Extrato e frações orgânicas das folhas de *Maytenus ilicifolia*

Folhas secas de *Maytenus ilicifolia* foram compradas da empresa Santos Flora Comércio de Ervas Ltda. (Mariporã, São Paulo, Brasil), devidamente registrada na ANVISA. Para obtenção do extrato etanólico, 800 gramas de folhas secas de *Maytenus ilicifolia* foram submetidas à maceração estática em 4 litros de etanol 98% de pureza (1:5 m/v) durante sete dias em temperatura ambiente e protegida de luz. Ao final do sétimo dia, a solução foi filtrada com filtro de papel comum e o solvente remanescente foi removido por processo de rotaevaporação (Buchi Rotavapor R-215, Suíça) a 40°C sob pressão controlada e reduzida. Após a rotaevaporação, o extrato etanólico de *M.ilicifolia* foi submetido à liofilização (L101, Liotop, Brasil) para completa retirada de água na amostra. Para obtenção das frações orgânicas de *M.ilicifolia*, 4g de extrato etanólico de *M.ilicifolia* (EE-Mi) foram diluídos em solução hidrometanólica 90% (36 ml de metanol e 4 ml de água ultra pura). Após essa diluição, a mistura foi submetida ao processo de particionamento pelo método líquido-líquido, utilizando diferentes solventes orgânicos selecionados. Os solventes foram adicionados com um volume fixo de 40 mL na seguinte ordem crescente de polaridade: hexano (FH-Mi),

diclorometano (FDM-Mi), acetato de etila (FAE-Mi) e n-butanol (FB-Mi). A fração hidrometanólica (FHHM-Mi) representa o resíduo final do processo de particionamento, após todas as adições dos solventes orgânicos. Os solventes que restaram em cada etapa do processo de particionamento foram removidos pelo processo de liofilização (L101, Liotop, Brasil) e secagem. As amostras de EE-Mi, FH-Mi, FDM-Mi, FAE-Mi, FB-Mi e FHM-Mi secas foram congeladas em -20°C até sua utilização nos experimentos.

2.2 Análise por HPLC-ESI-MS/MS

As frações de acetato de etila (FAE-Mi) e n-butanólica (FB-Mi) de *Maytenus ilicifolia* foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência hifenado ao espectrômetro de massas (EM) com fonte de ionização por electrospray CLAE-EM-IES, pois foram as frações mais ativas nos ensaios biológicos. As análises foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (IGEB-UFU) em um cromatógrafo líquido (Agilent – Infinity 1260) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES). Os solventes utilizados como eluentes foram água acidificada com ácido fórmico à 0,1% v v⁻¹ (A) e metanol (B), os parâmetros para análise foram: 10% de B (0 minuto), 98% de B (0-10 minutos) e 98% (11-17 minutos). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8L min⁻¹ a uma temperatura de 220°C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KV, para obtenção dos espectros de massas sequencial (EM/EM) foram aplicados valores de energia entre 5 e 30 eV à fim de se obter espectros com melhor padrão de fragmentação para cada composto presente. Os espectros obtidos foram comparados com bibliotecas online como o Metlin e bancos de dados (Chemspider, Pubchem e Massbank) e com artigos reportados para a identificação dos compostos presentes nas frações mais ativas. Para a identificação foi levado em consideração o erro em ppm dos valores de

razão massa carga (m/z) obtidos em alta resolução, e o erro foi calculado pela equação 1, sendo aceitos erros entre 0 e ± 5 ppm, os valores de massa exata considerados na equação foram obtidos através do software MassHunter®, além disso também foi levado em consideração o padrão de fragmentação observado nos espectros de massa sequencial com os encontrados na literatura.

$$E_{ppm} = \left(\frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \right) \times 10^6$$

Equação 1

2.3 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica do extrato etanólico da *Maytenus ilicifolia* e de suas frações orgânicas FH-Mi, FDM-Mi, FAE-Mi, FB-Mi e FHM-Mi: foram realizadas através do método descritos por Zou et al., (2011), método utilizado para determinação da concentração de fenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados. A leitura foi feita em uma placa de 96 poços à concentração de 1mg/mL para cada amostra, todas diluídas em etanol 98%.

2.3.1 Determinação de fenóis totais

Para determinação do conteúdo de fenóis totais foi utilizado o reagente Folin-Ciocalteu, que por sua vez é reduzido na presença de compostos fenólicos (Galvão et al., 2018). O extrato etanólico da *Maytenus ilicifolia* e suas frações orgânicas diluídos em etanol 98% foram incubados na concentração de 1 mg/mL em um volume de 10 μ L durante 6 minutos a 25°C com 20 μ L Folin-Ciocalteu 10%. Posteriormente, foi adicionado carbonato de sódio 7% (Na_2CO_3) e as amostras testadas foram incubadas por um período de 2 horas a 25°C na ausência de luz. Após a incubação, a absorbância foi medida a 760 nm em uma

leitadora de microplacas (Versamax, Molecular Devices, EUA). Para determinar os valores de fenóis totais foi feita uma curva padrão analítica de ácido gálico em diluição seriada partindo de 2mg/mL. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama (mg EAG/g).

2.3.2 Determinação de flavonoides totais –

Para determinar o conteúdo de flavonoides totais nas amostras, foi feito um método baseado na formação de um complexo entre o íon alumínio (Al^{3+}) com os grupos carbonila e hidroxila presente em flavonóides (Popova et al., 2004). O extrato etanólico da *Maytenus ilicifolia* e suas frações orgânicas foram incubados com uma solução de nitrito de sódio 5% ($NaNO_2$ 5%) e água ultra pura durante 6 minutos à 25°C, na ausência de luz. Após a incubação, foi adicionado cloreto de alumínio ($AlCl_3$ 10%) e o complexo foi novamente incubado por mais 6 minutos à 25°C. A absorbância foi medida a 425 nm em uma leitadora de microplacas (Versamax, Molecular Devices, EUA). Para este ensaio foi realizada uma curva padrão analítica de quercetina diluída de forma seriada, partindo de 2 mg/mL para calcularmos o conteúdo de flavonoides totais presente na amostra. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de quercetina por grama (mg EQ/g).

2.3.3 Determinação de taninos condensados totais

A determinação do conteúdo total de taninos condensados foi realizada através da formação de condensados da reação da vanilina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído) com taninos em ácido clorídrico (HCl) (Popova et al., 2004). O extrato etanólico da *Maytenus ilicifolia* e suas frações orgânicas foram incubados com vanilina 4% e HCl durante 15 minutos a 25°C. Após a incubação, a absorbância foi medida a 500 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). Para realização dos cálculos e obtenção dos valores foi realizada uma curva padrão

analítica a partir da diluição seriada da catequina, partindo de 2 mg/mL. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas equivalentes de catequina por grama (mg EC/g).

2.4 Análise da capacidade antioxidante

Para determinação da capacidade antioxidante foram realizados três ensaios diferentes: FRAP, DPPH e ORAC. Em todos os ensaios as amostras foram diluídas em etanol 98% e em cada método foram utilizadas diferentes concentrações. O Método de FRAP consiste na avaliação da capacidade da amostra de reduzir moléculas de ferro, para esse ensaio as amostras foram diluídas a uma concentração de 285 µg/mL e os resultados foram expressos em µmol de trolox (eq.g⁻¹). No método de ORAC, que consiste na avaliação da amostra em sequestrar o radical peroxil, as amostras foram diluídas a uma concentração de 100 µg/mL e os resultados foram também expressos em µmol de trolox (eq.g⁻¹). Na metodologia de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) as amostras são desafiadas a reduzir o radical DPPH a hidrazina, neste ensaio as amostras foram testadas a uma concentração inicial de 250 µg/mL e foi realizada uma diluição seriada para determinação do EC₅₀ e os resultados são expressos em porcentagem de capacidade antioxidante.

2.4.1 Método da capacidade de redução do Ferro – FRAP

A metodologia de FRAP consiste na medida da capacidade de determinado composto em reduzir o Fe³⁺ a Fe²⁺, que por sua vez forma um complexo com o reagente 2,4,6-tri-(2 piridril)-s-triazida (TPTZ), resultando em um complexo de Fe²⁺ + TPTZ de coloração azul intensa (Antolovich et al., 2002). As amostras foram incubadas com o reagente FRAP (tampão acetato de sódio 300mM pH 3,6, 2,4,6-tri-(2 piridril)-s-triazida (TPTZ) e cloreto férrico 20mM na proporção de 10:1:1

respectivamente), em microplaca de 96 poços durante 6 minutos a 37°C para que ocorra a reação. Após esse tempo, a absorbância dos poços foi medida a 593nm em uma leitora de microplacas (Versamax, Molecular Devices, EUA). Para confiança, análise e cálculo dos resultados, foi feita uma curva padrão de Trolox. A quercetina foi utilizada como controle positivo. Os resultados foram expressos em μmol de trolox (eq.g^{-1}).

2.4.2 Método do sequestro do radical peroxil - ORAC

É um método utilizado para quantificar a capacidade antioxidante das amostras através da redução da taxa de decaimento da fluorescência devido a oxidação da fluoresceína (sonda fluorescente) na presença de radicais peroxilas gerados através da reação com o reagente Azobis (Diidrocloreto de 2,2-azobis (2-metilpropionamidina)) (Litescu et al., 2014).

O extrato etanólico e as frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia* foram incubadas com Fluoresceína 0,085 mM e Azobis 153 mM, ambos reagentes diluídos em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4, em uma placa de 96 poços. A fluorescência foi medida a 485 nm de excitação e 528 nm de emissão durante 90 minutos a 37°C em uma leitora de microplacas (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Uma curva padrão analítica de trolox foi construída com finalidade de mensurar a capacidade antioxidante das amostras no ensaio. Tampão fosfato foi utilizado como controle negativo e a quercetina foi utilizada como controle positivo.

2.4.3 Método do sequestro do radical DPPH – DPPH

A metodologia do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada amostra em sequestrar o radical estável DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Essa captura é feita por um antioxidante, neutralizando o radical DPPH através de doação de átomos de hidrogênio.

Quanto mais antioxidante a amostra, mais amarelo ficará a solução, porém quanto menos antioxidante a amostra, a coloração ficará com aspecto de cor violeta, que caracteriza presença do radical DPPH (Huang et al., 2005).

O extrato etanólico e as frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia* foram testadas a uma concentração inicial de 250 µg/mL e foi realizada uma diluição seriada de 10 pontos até uma concentração final de 0,48 µg/mL para estimar o valor de EC₅₀. Em uma placa de 96 poços, as amostras foram incubadas com o radical DPPH 60mM (diluído em metanol) durante um período de 30 minutos a 37°C na ausência de luz e posteriormente a absorbância foi medida a 517nm em uma leitora de microplacas (Versamax, Molecular Devices, EUA). O cálculo da atividade antioxidante das amostras foi realizado baseado na seguinte equação matemática:

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

Equação 2

onde “*X controle*” se refere a absorbância do DPPH diluído em metanol. “*X amostra*” se refere a absorbância do conjunto DPPH + amostra. “*X branco*” se refere as amostras diluídas em metanol sem a presença do DPPH (metanol + amostras). Como controle negativo utilizamos o metanol e como controle positivo foi utilizado a quercetina.

2.5 Análise da inibição da formação de AGEs

Os métodos de avaliação de capacidade de inibição da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) se basearam na metodologia descrita por Wang et al., (2011). Foram utilizados cinco modelos de inibição de glicação: BSA-Metilglioxal, BSA-Frutose, Arginina-Metilglioxal, Colágeno-

Metilglioxal e LDL-Metilglioxal. A utilização de albumina de soro bovino (BSA), colágeno, arginina e lipoproteína de baixa densidade (LDL) permite avaliar os estágios e alvos de algumas proteínas e aminoácidos que podem sofrer glicação. O extrato etanólico e as frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia* e a quercetina (controle positivo) foram diluídas em etanol 98% de maneira seriada, partindo da concentração de 625 µg/mL para determinação dos valores de EC₅₀. A porcentagem de inibição da glicação foi calculada usando a seguinte equação matemática:

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

Equação 3

onde *X controle* representa o valor obtido da fluorescência na ausência das amostras/controlado positivo, *X amostra* representa o valor obtido da fluorescência na presença das amostras/controlado positivo e *X branco* é o valor obtido da fluorescência na ausência do agente que irá promover a glicação (frutose ou metilglioxal) e das amostras/controlado positivo. Como controle positivo foi utilizado a quercetina e como controle negativo foi utilizado tampão fosfato (200 mM, pH7,4).

2.5.1 Modelo BSA-Metilglioxal

O extrato etanólico e as frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia* e a quercetina (controle positivo) foram diluídas em série partindo da concentração de 625 µg/mL a fim de determinarmos o valor de EC₅₀ e foram incubadas com albumina sérica bovina (BSA) 50 mg/mL e metilglioxal (MGO) 53,3 mM, preparados em tampão fosfato 200 mM, pH 7,4 com azida sódica 0,02% durante um período de 72 horas à 37°C na ausência de luz (Wang et al., 2011). Após o período de incubação, foi adicionada uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% e essa mistura foi centrifugada a 10.000xg por 10 minutos. O sobrenadante

resultante da centrifugação foi descartado e o pellet foi ressuspenso com tampão fosfato. A intensidade de fluorescência das amostras foi medida a 340 nm de excitação e 380 nm de emissão em uma leitora de microplacas (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Como controle negativo foi utilizado o etanol 98% e como controle positivo foi utilizado a quercetina. Para realizar os cálculos matemáticos, na amostra denominada “branca” o metilglioxal foi substituído por tampão fosfato.

2.5.2 Modelo BSA-Frutose

O extrato etanólico e as frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia* e a quercetina (controle positivo) foram diluídas em série partindo da concentração de 625 µg/mL a fim de determinarmos o valor de EC₅₀ e foram incubadas com albumina sérica bovina (BSA) 50 mg/mL e frutose 1,25 M, preparados em tampão fosfato 200 mM, pH 7,4 com azida sódica 0,02% durante um período de 72 horas à 37°C na ausência de luz (Wang et al., 2011). Após o período de incubação, foi adicionada uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% e essa mistura foi centrifugada a 10.000xg por 10 minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e o pellet foi ressuspenso com tampão fosfato. A intensidade de fluorescência das amostras foi medida a 350 nm de excitação e 420 nm de emissão em uma leitora de microplacas (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Como controle negativo foi utilizado o etanol 98% e como controle positivo foi utilizado a quercetina. Para realizar os cálculos matemáticos, na amostra denominada “branca” a frutose foi substituído por tampão fosfato.

2.5.3 Modelo Arginina-Metilglioxal

O extrato etanólico e as frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia* e a quercetina (controle positivo) foram diluídas em série partindo da concentração de 625 µg/mL a fim de determinarmos o valor de EC₅₀ e foram incubadas com

arginina 106,6 mM preparada em tampão fosfato 200 mM, pH 7,4 com azida sódica 0,02% e metilglioxal (MGO) 53,3 mM durante um período de 72 horas à 37°C na ausência de luz (Wang et al., 2011). A intensidade de fluorescência das amostras foi medida a 340 nm de excitação e 380 nm de emissão em uma leitora de microplacas (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Como controle negativo foi utilizado o etanol 98% e como controle positivo foi utilizado a quercetina. Para realizar os cálculos matemáticos, na amostra denominada “branca” o metilglioxal foi substituído por tampão fosfato.

2.5.4 Modelo Colágeno-Metilglioxal

O extrato etanólico e as frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia* e a quercetina (controle positivo) foram diluídas em série partindo da concentração de 625 µg/mL a fim de determinarmos o valor de EC₅₀ e foram incubadas com colágeno 30 µg/mL preparada em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 com azida sódica 0,02% e metilglioxal (MGO) 1 mM durante um período de 72 horas à 37°C na ausência de luz (Alqahtani et al., 2021). A intensidade de fluorescência das amostras foi medida a 340 nm de excitação e 380 nm de emissão em uma leitora de microplacas (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Como controle negativo foi utilizado o etanol 98% e como controle positivo foi utilizado a quercetina. Para realizar os cálculos matemáticos, na amostra denominada “branca” o metilglioxal foi substituído por tampão fosfato.

2.5.5 Modelo Lipoproteína de baixa densidade (LDL) -Metilglioxal

A LDL humana foi isolada e incubada na concentração de 190 µg/mL com Metilglioxal (MGO) 1 mM, tampão fosfato (100 mM, pH 7,4, e azida 0,02%) e o EE-Mi, suas frações orgânicas e quercetina durante 72 horas a 37°C na ausência de luz. A intensidade de fluorescência foi mensurada a 340nmex/380nmem

(EnSpire, PerkinElmer, EUA). Etanol 98% foi utilizado como controle negativo. As amostras foram testadas na concentração de 100 µg/mL.

2.6 Análise *ex vivo* em tecido hepático

2.6.1 Processamento do tecido hepático

A análise *ex vivo* do tecido hepático foi feita adotando a metodologia de indução e oxidação tecidual com Fe²⁺-ascorbato descrito por Justino et al., (2019). Ratos da espécie Wistar foram obtidos do biotério central da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e possuíam de 6-8 semanas de vida (OFÍCIO Nº 7/2022/CEUA/PROPP/REITO-UFU de 14 de julho de 2022). Os ratos foram mantidos em condições padrões de temperatura, água e alimento. Para análise do tecido, os animais foram anestesiados e posteriormente eutanasiados por deslocamento cervical e o fígado removido foi armazenado em um ultra freezer à -70°C até o momento dos ensaios. Para realização do ensaio, as amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato-salino (PBS 1:10) e centrifugadas a 3.000xg por 10 minutos à 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 (FeSO₄) 0,1 mM e ácido ascórbico 0,1 mM para a formação do Fe²⁺-ascorbato (Tecido hepático oxidado (THO), utilizado como controle positivo). Nos micro tubos que continham THO, foi adicionado extrato etanólico e as frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia* e quercetina a 160 µg/mL, diluídas em etanol 98%, a fim de determinar se as amostras conseguem inibir o dano oxidativo. Uma amostra contendo apenas PBS foi utilizada como controle negativo. A quercetina foi utilizada a título de comparação com as amostras.

2.6.2 Inibição da Peroxidação Lipídica –

Este método avalia a capacidade da amostra em inibir a peroxidação lipídica. O ensaio foi feito seguindo a metodologia de Justino et al., (2019). As amostras foram incubadas junto com ácido tricloroacético (TCA) 10% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% durante 2 horas em banho-maria a 100°C. Após a incubação, foi adicionado 400 µL de butanol para extração do malondialdeído, produto da peroxidação lipídica. Após a adição do butanol, a mistura foi centrifugada a 3.000xg por 10 minutos e a absorbância foi medida a 532 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). Os valores obtidos são representados como nmol MDA/mg Proteína.

2.7 Isolamento, oxidação, peroxidação e glicação da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)

2.7.1 Isolamento da LDL

Amostras de sangue foram coletadas de voluntário humano saudável e não-fumante em tubo vacutainer com EDTA 10% e centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para obtenção do plasma. Uma solução de brometo de potássio (KBr) foi adicionado para ajustar a densidade do plasma para 1,21. Aprotinina (5 µL/mL de plasma), benzamidina (2mM), PMSF (0,5 M), cloranfenicol (20 µL/mL de plasma) e azida sódica (10 µL/mL de plasma) também foram adicionados ao plasma. Posteriormente, o plasma foi centrifugado a 40000 rpm, por 2 horas e 30 minutos a 4 °C para isolamento da LDL humana. O sobrenadante correspondente à LDL foi coletado e a lipoproteína foi submetida à diálise em solução de tampão fosfato (PBS) 20mM, pH 7,4 durante 24 horas com trocas de 6 em 6 horas. O material foi armazenado a 4°C, na ausência de luz, até a data das análises.

2.7.2 Indução da oxidação e peroxidação da LDL

A oxidação da LDL foi induzida por CuSO₄ 5µM e processo foi monitorado durante 2 horas com leituras de 2 em 2 minutos à 37°C em microplaca, a 234 nm (EnSpire, PerkinElmer, EUA). O EE-Mi e suas frações orgânicas foram avaliados numa concentração de 1 µM e PBS foi utilizado como controle negativo. Posteriormente, as amostras foram retiradas diretamente da placa e foi realizada a quantificação da peroxidação lipídica de acordo com o método TBARS já descrito neste trabalho.

2.8 Análise da capacidade de inibição enzimática

Os ensaios de inibição das enzimas α-glicosidase, α-amilase, butirilcolinesterase e acetilcolinesterase foram baseados na metodologia descrita por Franco et al., (2018), onde ele analisa a capacidade de determinado composto em inibir enzimas específicas através do consumo do substrato. O extrato etanólico e as frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia* e os controles positivos (acarbose, rivastigmina e galantamina) foram diluídos em etanol 98%. Para o ensaio de α-glicosidase utilizamos a concentração de 230 µg/mL e 550 µg/mL para butirilcolinesterase e acetilcolinesterase. No método de inibição da α-amilase, devido à alta atividade da *Maytenus ilicifolia*, foi realizada uma diluição seriada das amostras em até 10 pontos, começando em 25 µg/mL, para determinação do EC₅₀. As porcentagens de inibição foram calculadas seguindo a seguinte fórmula matemática:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{X \text{ controle} - X \text{ amostra}}{X \text{ controle}} \times 100$$

Equação 4

onde *X controle* indica a área sob a curva calculada usando a medida de absorvância obtida na ausência dos compostos e *X amostra* indica a área sob a curva calculada usando a medida de absorvância obtida na presença do extrato etanólico, frações orgânicas e controles positivos.

2.8.1 Inibição de α -glicosidase

Este método consiste em avaliar se a amostra é capaz de inibir a atividade da enzima α -glicosidase, através da metodologia de Toma et al., (2014). O extrato etanólico e as frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia* foram incubadas com glutathiona reduzida 1,5 mM, diluída em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8, e solução enriquecida com α -glicosidase do pó cetônico de ratos por 20 minutos a 37°C. A α -glicosidase foi obtida por meio de homogeneização de 100 mg de pó cetônico de intestino de rato em 3 mL de tampão fosfato. Em seguida, o substrato p-nitrofenil-alfa-D-glicopiranosídeo (4 mM) foi adicionado e a absorvância das amostras foi medida a 405 nm durante 30 minutos (Versamax, Molecular Devices, EUA). Etanol 98% foi utilizado como controle negativo e Acarbose foi utilizada como controle positivo.

2.8.2 Inibição da α -amilase

Este método consiste em avaliar se a amostra é capaz de inibir a atividade da enzima α -amilase. A saliva foi coletada de 10 voluntários humanos saudáveis pelo método de Navazesh, (1993) com algumas modificações. As amostras do sobrenadante de saliva foram dialisadas e fracionadas por cromatografia de troca iônica em resina Q-sefarose (Da Silva Santos et al., 2012). A fração enriquecida de α -amilase foi diluída em tampão MES (2-tanossulfônico) 50 mM, pH 6.4. Para o preparo do tampão foi utilizado cloreto de sódio 300 mM, cloreto de cálcio 5 mM e tiocianato de potássio 140 mM diluídos em água ultra pura. O extrato etanólico e

as frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia* e o controle positivo (acarbose) foram incubados com a fração enriquecida de α -amilase por 30 minutos à 37°C. Logo após a incubação, foi adicionado o substrato 2-cloro-4-nitrofenil-4- β -D galactopiranosilmaltosídeo (GalG2CNP) e a absorbância das amostras foi medida a 405 nm por 3 minutos em intervalos de 1 minuto (Versamax, Molecular Devices, EUA). Como controle negativo foi utilizado o etanol.

2.8.3 Inibição da butirilcolinesterase e acetilcolinesterase

A atividade inibitória da butirilcolinesterase e acetilcolinesterase do extrato etanólico de *Maytenus ilicifolia* e frações orgânicas (550 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi mensurada seguindo os métodos de Ellman et al., (1961); Marston et al., (2002); Rhee et al., (2001) com modificações. Este método se baseia na capacidade da enzima em hidrolisar os substratos acetiltiocolina ou butiriltiocolina para produzir tiocolina, essa, por sua vez pode reagir com 5,5', ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB) para formar 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato, que pode ser detectados em 405 nm. Para o ensaio, foram feitos três tampões diferentes, tampão A (Tris-HCl 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8), tampão B (Tris-HCl 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ contendo albumina sérica bovina 0,1%) e tampão C (Tris-HCl 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ contendo NaCl 0,10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Os substratos butiriltiocolina e acetiltiocolina (3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) foram diluídas em água, DTNB (3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) diluído em tampão C e as amostras a serem testadas foram diluídas em tampão A.

Para realização do ensaio foi utilizada uma placa de 96 poços. Em cada poço foi adicionado os seguintes reagentes: substrato, tampão B, DTNB e amostra diluída em tampão A. Após essa sequência, a enzima acetilcolinesterase ou butirilcolinesterase a 0,2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi adicionada para promover a reação e a absorbância foi medida a 405 nm em uma leitora de microplacas (Versamax, Molecular Devices, EUA) a cada 30 segundos durante 20 minutos à temperatura

de 30°C. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte equação matemática:

$$Inibição (\%) = \frac{X \text{ branco} - X \text{ amostra}}{X \text{ branco}} \times 100$$

Equação 5

onde *X branco* representa o valor obtido da leitura sem amostra/controle positivo (10% metanol diluído em tampão A) e *X amostra* representa o valor obtido na presença da amostra/controle positivo. As amostras utilizadas como controle positivo foram galantamina e rivastigmina.

2.9 Análise da atividade antimicrobiana

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada em triplicata utilizando uma placa de microdiluição de 96 poços. O ensaio foi feito seguindo a metodologia de CLSI do ano de 2007 e 2012. Para preparação das amostras, o EE-Mi e frações orgânicas foram solubilizadas em 5% dimetilsulfóxido (DMSO; Merck, Darmstadt, HE, Germany), e diluídas em *Brain Heart Infusion broth* (BHI; Difco) para o teste em bactérias aeróbias e caldo Shadler (Difco) suplementado com hemina (5mg/mL, Sigma, St.Louis, MO, USA) e menadionina (1mg/mL, Sigma) para as bactérias anaeróbicas. Após a diluição, um total de doze concentrações (0.195-400 µg/mL) das amostras foram testadas. A concentração de bactérias de 5×10^5 colônias por unidade (UFC/mL) foi padronizada no experimento para bactérias aeróbicas e 1×10^6 para bactérias anaeróbicas. DMSO 5% e os microrganismos testados foram incubados isolados para verificar a toxicidade do meio e foi confirmado que nessa concentração houve crescimento bacteriano. Após essa etapa, as placas contendo microrganismos anaeróbicos foram incubadas a 37°C durante 72 horas em uma

estufa anaeróbica contendo 5-10% de H₂, 10% de CO₂ e 80-85% de N₂ (Don Whitley Scientific, Bradford, UK), e as bactéria aeróbicas foram incubadas a 37°C em condições aeróbicas padrões. Após a incubação, 30 µL de solução aquosa 0,02% de resazurina (Sigma) foi adicionado em cada poço. Resazurina é um composto oxiredutor, que permite analisar o crescimento bacteriano imediatamente. A cor azul representa o não proliferação e a cor vermelha representam o crescimento bacteriano.

2.10 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média, exceto para o cálculo do EC₅₀, em que os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. A análise da variância entre os grupos foi realizada pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos. Tanto as análises estatísticas como a plotagem dos gráficos foram realizadas com o *software* GraphPad Prism 8.0.

3. Resultados

3.1 Rendimento dos extratos e frações de *Maytenus ilicifolia*

O rendimento obtido através do processo de extração e particionamento das folhas de *Maytenus ilicifolia* são exibidos na figura abaixo. 800 gramas de folhas rasuradas foram utilizadas para obtenção de 32 gramas (4% de aproveitamento) de extrato etanólico de *Maytenus ilicifolia* (EE-Mi).

Para obtenção das frações orgânicas, foram utilizados 4 gramas de EE-Mi e o rendimento total de cada fração foi: FH-Mi (3,17%), FDM-Mi (19,12%), FAE-Mi (37,12%), FB-Mi (26,75%) e FHM-Mi (11,92%).

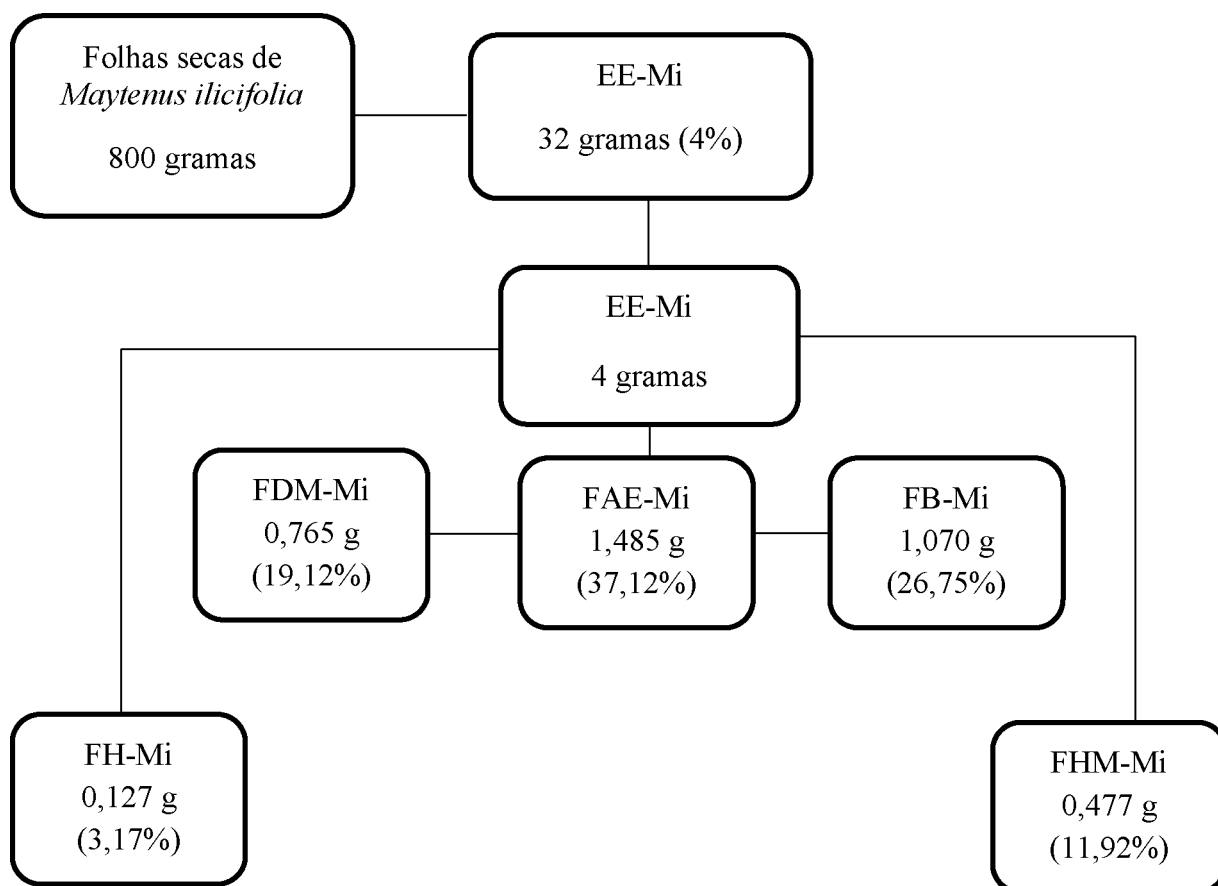


Figura 1: Rendimento do processo de extração e particionamento das folhas de *Maytenus ilicifolia*.

3.2 Análise HPLC-ESI-MS/MS

Tabela 1: Compostos identificados através de comparação da literatura das frações acetato de etila e n-butanol do extrato etanólico de *Maytenus ilicifolia* por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo).

t_R (min)	$[M - H]^-$	Massa exata	Erro (ppm)	Íons fragmentos (m/z) EM/EM	Fórmula molecular	Tentativa de identificação	Amostra	Ref.
0,76	181,0721	181,0718	1,66	15 eV: 163, 101, 89, 71, 59 , 55	$C_6H_{14}O_6$	Sorbitol	FB-Mi	(Lima et al., 2022)
0,83	133,0143	133,0142	0,75	10 eV: 115 , 71	$C_4H_6O_5$	Ácido málico	FAE-Mi, FB-Mi	(Fraternal et al., 2015; Gómez-Romero et al., 2010)
1,43	849,2045	849,2036	1,06	25 eV: 831, 723, 697, 679, 577 , 559, 425, 407, 397, 289, 287, 125	$C_{45}H_{38}O_{17}$	(epi)afz-(epi)cat-(epi)cat I	FAE-Mi, FB-Mi	(Ge et al., 2016; Gu et al., 2003; Olivaro et al., 2022)
1,98	315,0727	315,0722	1,59	25 eV: 153, 152 , 109, 108	$C_{13}H_{16}O_9$	Ácido protocatecuico hexosídeo	FB-Mi	(Abu-Reidah et al., 2015)
2,02	305,0669	305,0667	0,66	20 eV: 261, 219, 167, 165, 137, 125	$C_{15}H_{14}O_7$	(epi)galocat equina	FAE-Mi, FB-Mi	(de Moura et al., 2021; de Moura Martins et al., 2020; Olivaro et al., 2022)

2,03	833,208 5	833,20 87	- 0,24	30 eV: 561, 543, 407, 289 , 273, 125	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₆	(epi)afz- (epi)afz- (epi)cat I	FAE- Mi, FB- Mi	(de Souza et al., 2008; Gu et al., 2003; Olivaro et al., 2022)
2,60	593,130 9	593,13 01	1,35	20 eV: 575, 467, 441, 423 , 407, 305, 289, 273, 177, 125	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	(epi)cat- (epi)gal	FAE- Mi, FB- Mi	(Ge et al., 2016; Olivaro et al., 2022)
2,95	577,135 5	577,13 51	0,69	25 eV: 559, 451, 425, 407, 289 , 245, 161, 125	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	(epi)cat- (epi)cat	FAE- Mi, FB- Mi	(de Souza et al., 2008; Olivaro et al., 2022; Sobeh et al., 2018)
3,15	849,204 4	849,20 36	0,94	25 eV: 723, 697, 679, 577, 561, 559 , 543, 407, 289, 271, 125	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₇	(epi)afz- (epi)cat- (epi)cat II	FAE-Mi	(Ge et al., 2016; Gu et al., 2003; Olivaro et al., 2022)
	865,198 5	865,19 85	0,0	25 eV: 847, 739, 713, 695, 577, 575, 451, 425, 305, 287, 245, 125	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	(epi)cat- (epi)cat- (epi)cat ou (epi)afz- (epi)cat- (epi)gal	FAE-Mi	(Olivar o et al., 2022)

3,31	305,0670	305,0667	0,98	20 eV: 287, 261, 219, 179, 167, 165, 137, 135, 125	$C_{15}H_{14}O_7$	(epi)galocatequina	FAE-Mi, FB-Mi	(de Moura et al., 2021; de Moura Martins et al., 2020; Olivaro et al., 2022)
	289,0719	289,0718	0,35	20 eV: 271, 245, 203, 151, 137, 125, 123, 109	$C_{15}H_{14}O_6$	(epi)catequina	FAE-Mi, FB-Mi	(de Moura et al., 2021; do Nascimento et al., 2020; Olivaro et al., 2022)
3,51	561,1410	561,1402	1,43	20 eV: 435, 407, 289 , 271, 245, 125	$C_{30}H_{26}O_{11}$	(epi)afz-(epi)cat I	FAE-Mi, FB-Mi	(de Souza et al., 2008; Ge et al., 2016; Olivaro et al., 2022)
3,56	833,2099	833,2087	1,44	25 eV: 707, 561, 543 , 289, 271, 125	$C_{45}H_{37}O_{16}$	(epi)afz-(epi)afz-(epi)cat II	FAE-Mi	(de Souza et al., 2008; Ge et al., 2016; Olivaro et al., 2022)
3,70	577,1351	577,1351	2,08	20 eV: 451, 425, 407 , 289, 245, 161, 125	$C_{30}H_{25}O_{12}$	(epi)cat-(epi)cat	FAE-Mi, FB-Mi	(Olivaro et al., 2022; Sobeh et al., 2018)
4,30	289,0723	289,0718	1,73	20 eV: 271, 245, 203, 151, 137,	$C_{15}H_{14}O_6$	(epi)catequina	FAE-Mi, FB-Mi	(de Moura et al., 2021; do

				125, 123, 109				Nascimento et al., 2020; Olivaro et al., 2022)
4,48	849,2044	849,2036	0,94	25 eV: 723, 697, 679, 559 , 433, 425, 407, 289, 271, 125	$C_{45}H_{37}O_{17}$	(epi)afz-(epi)cat-(epi)cat III	FAE-Mi, FB-Mi	(Ge et al., 2016; Gu et al., 2003; Olivaro et al., 2022)
4,50	545,1477	545,1453	4,40	20 eV: 419, 273 , 164, 125	$C_{30}H_{25}O_{10}$	(epi)afz-(epi)afz	FAE-Mi	(Costa Silva et al., 2019; Ge et al., 2016)
4,66	833,2081	833,2087	-0,72	25 eV: 707, 561, 543 , 435, 289, 271, 125	$C_{45}H_{37}O_{16}$	(epi)afz-(epi)afz-(epi)cat III	FAE-Mi, FB-Mi	(de Souza et al., 2008; Ge et al., 2016; Olivaro et al., 2022)
4,85	273,0772	273,0768	1,46	15 eV: 255, 229, 205, 187, 169, 151, 137 , 125, 109, 87	$C_{15}H_{13}O_5$	afzelequina	FAE-Mi	(Costa Silva et al., 2019)
5,25	755,2034	755,2040	-0,79	30 eV: 301, 300	$C_{33}H_{40}O_{20}$	Quercetina ramnosil rutinosídeo	FAE-Mi, FB-Mi	(de Moura et al., 2021; Olivaro et al., 2022)
5,30	609,1474	609,1461	2,13	30 eV: 343, 300 , 271, 178	$C_{27}H_{30}O_{16}$	quercetina-robinosídeo I	FAE-Mi, FB-Mi	(de Souza et al., 2008; Olivaro et al., 2022; Sakna et al., 2019)
5,61	561,1410	561,1402	2,85	20 eV: 435, 407, 289 ,	$C_{30}H_{26}O_{11}$	(epi)afz-(epi)cat II	FAE-Mi	(de Souza et

				271, 245, 125				al., 2008; Ge et al., 2016; Olivaro et al., 2022)
5,66	739,2094	739,2091	0,41	20 eV: 593, 575, 285, 284 , 257, 255	$C_{33}H_{39}O_{19}$	Canferol diramnosídeo hexosídeo	FAE-Mi, FB-Mi	(Sakna et al., 2019)
5,73	593,1527	593,1512	2,53	30 eV: 327, 285, 284 , 255, 178	$C_{27}H_{30}O_{15}$	Canferol robinosídeo	FAE-Mi, FB-Mi	(de Souza et al., 2008; Sakna et al., 2019)
6,02	609,1477	609,1461	2,63	30 eV: 301, 300 , 271, 178	$C_{27}H_{30}O_{16}$	Quercetina robinosídeo II	FB-Mi	(de Souza et al., 2008; Olivaro et al., 2022; Sakna et al., 2019)
6,04	463,0890	463,0882	1,72	30 eV: 301 , 271, 255, 179, 151, 121	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Quercetina hexosídeo	FAE-Mi, FB-Mi	(de Souza et al., 2008; Olivaro et al., 2022; Sakna et al., 2019)
	833,2083	833,2087	-0,48	25 eV: 707, 561 , 543, 435, 289, 271, 125	$C_{45}H_{38}O_{16}$	(epi)afz-(epi)afz-(epi)cat IV	FAE-Mi	(de Souza et al., 2008; Ge et al., 2016; Olivaro et al., 2022)
6,34	447,0949	447,0933	3,58	30 eV: 327, 284, 285 , 255, 227, 151	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Canferol ou luteolina hexosídeo	FAE-Mi	(Abu-Reidah et al., 2015; de Moura et al.,

								2021)
6,43	563,1414	563,1406	1,42	30 eV: 285, 284 , 255, 227, 179	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	Canferol ramnosídeo o pentosídeo	F AE- Mi, FB- Mi	(Hamed et al., 2016)

Os números em negrito indicam o pico-base. Nota: FAE-Mi: fração de acetato de etila, FB-Mi: fração n-butanol, cat: catequina, afz: afzelequina, gal: galocatequina.

Em todos os ensaios deste presente estudo, as amostras que obtiveram melhores resultados foram FAE-Mi e FB-Mi. Uma análise por HPLC-ESI-MS/MS foi conduzida para identificar as moléculas bioativas presentes nessas frações responsáveis pela atividade biológica apresentada. As moléculas foram identificadas e interpretadas sobre o tempo de retenção, valores de erro, perfil de padrões de fragmentação, espectro de massa sequencial e informações retiradas da literatura. A Tabela 1 apresenta as moléculas encontradas na FAE-Mi e FB-Mi.

Dentre as moléculas encontradas, podemos destacar algumas com potencial antioxidante já datado na literatura, como quercetina, kaempferol e derivados glicosilados e derivados de catequina.

3.3 Prospecções fitoquímicas – Fenóis totais, flavonoides e taninos condensados

Os valores de referencia do conteúdo de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados presentes no extrato etanólico e frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia* são mostrados na tabela 2 abaixo. No conteúdo de fenóis totais, as frações com menores valores de referencia foram FHM-Mi (50,71 ± 38,87 mg EAG/g) e FDM-Mi (72,87 ± 13,09 mg EAG/g), as demais frações apresentaram valores acima de 100 mg EAG/g. No conteúdo de flavonoides, as frações com maiores valores de referência foram FAE-Mi (656,52 ± 32,19 mg EQ/g) e FB-Mi (439,38 ± 34,72 mg EQ/g), e a fração com menor valor foi a FHM-Mi (60,61 ± 6,14

mg EQ/g). Já no ensaio de análise de taninos condensados, as frações com maiores valores foram novamente FAE-Mi (2676,38 ± 182,42 mg EC/g) e FB-Mi (1014,86 ± 61,47 mg EC/g) e as de menores valores foram FHM-Mi (67,02 ± 1,98 mg EC/g) e FDM-Mi (152,55 ± 3,96 mg EC/g).

Tabela 2 – quantificação do conteúdo de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados do extrato etanólico de *Maytenus ilicifolia* e suas frações orgânicas.

Amostras	Fenóis Totais (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	Taninos condensados (mg EC/g)
EE-Mi	187,33 ± 11,50 ^{ac}	351,40 ± 37,61 ^{ae}	797,53 ± 7,93 ^a
FH-Mi	115,51 ± 17,05 ^{ac}	270,33 ± 11,93 ^a	386,70 ± 21,81 ^b
FDM-Mi	72,87 ± 13,09 ^{ac}	260,35 ± 16,63 ^a	152,55 ± 3,96 ^{bd}
FAE-Mi	299,82 ± 72,99 ^b	656,52 ± 32,19 ^b	2676,38 ± 182,42 ^c
FB-Mi	206,40 ± 9,91 ^{ab}	439,38 ± 34,72 ^{ec}	1014,86 ± 61,47 ^a
FHM-Mi	50,71 ± 38,87 ^c	60,61 ± 6,14 ^d	67,02 ± 1,98 ^d

Nota: EE-Mi: extrato etanólico, FH-Mi: fração de hexano, FDM-Mi: fração de diclorometano, FAE-Mi: fração de acetato de etila, FB-Mi: fração n-butanol, FHM-Mi: fração aquosa. Letras diferentes indicam significância estatística (p < 0,05).

3.4 Análise da capacidade antioxidante

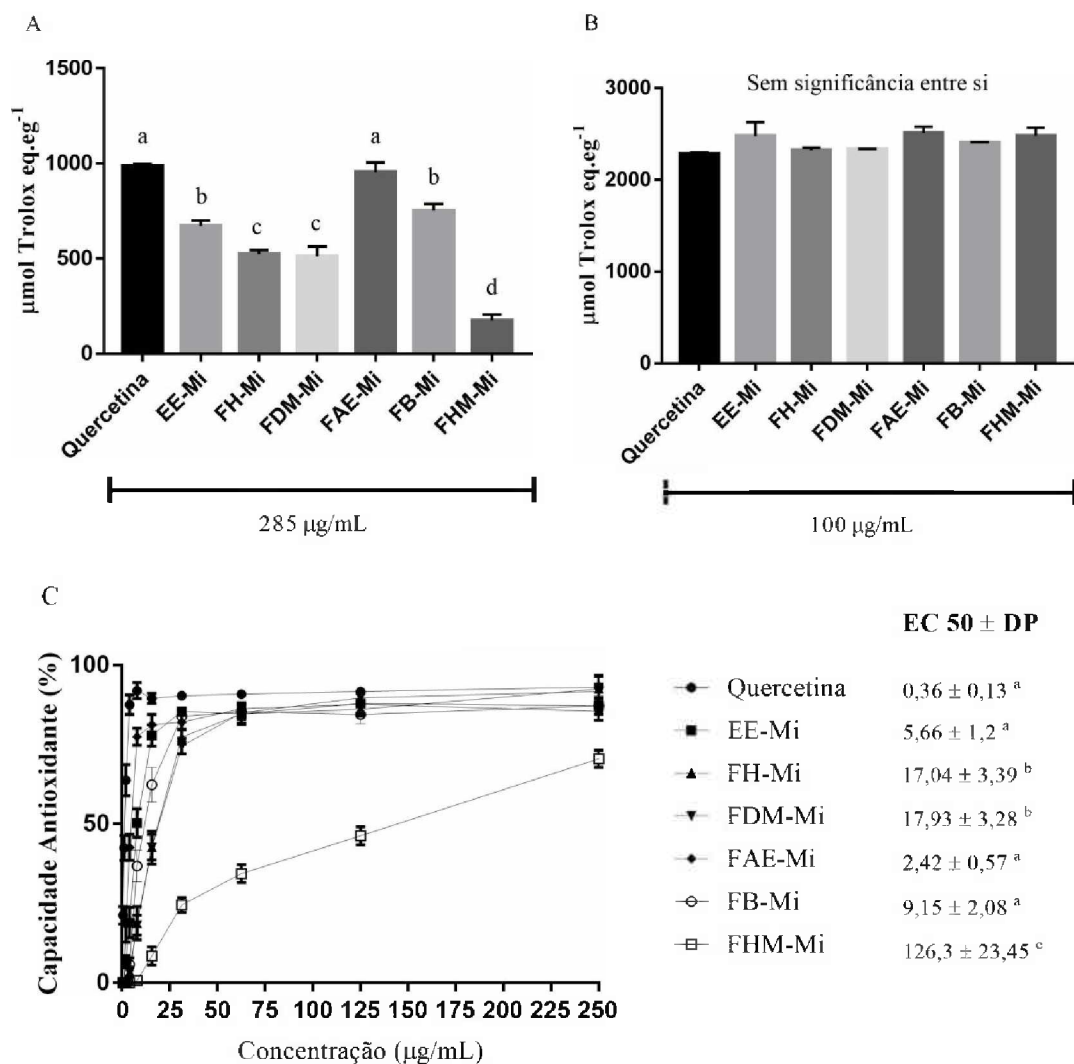


Fig. 2. Análise da capacidade antioxidante do extrato etanólico e frações orgânicas da *Maytenus ilicifolia* nos métodos de FRAP (A), ORAC (B) e DPPH (C). Os valores da média e desvio padrão (\pm) são expressos como μmol de trolox (eq.g^{-1}) nos dois métodos FRAP e ORAC e porcentagem da capacidade antioxidante (%) no ensaio de DPPH. Valores de EC_{50} são expressos como média e erro padrão da média (\pm). Nota: EE-Mi: extrato etanólico, FH-Mi: fração de hexano, FDM-Mi: fração de diclorometano, FAE-Mi: fração de acetato de etila, FB-Mi: fração n-butanol, FHM-Mi: fração aquosa. Quercetina foi usada como controle positivo. Letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0.05$).

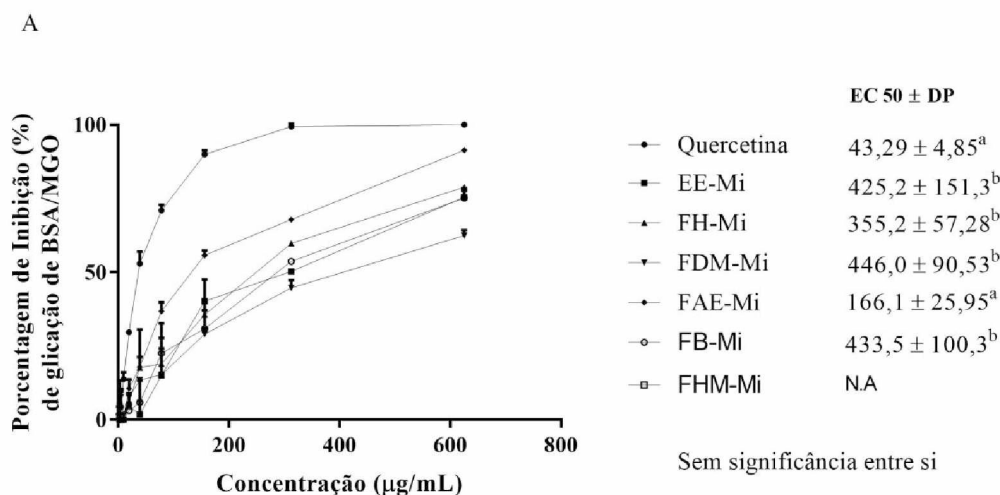
No método de FRAP (A), a FAE-Mi obteve a maior capacidade antioxidante ($954 \pm 51,43 \mu\text{mol trolox eq.eg}^{-1}$), conseguindo ser similar ao controle positivo quercetina ($987.8 \pm 10,15 \mu\text{mol trolox eq.eg}^{-1}$). EE-Mi (671.2 ± 29.34) e FB-Mi

(752 ± 34.83) obtiveram melhores valores em relação à FH-Mi (524.6 ± 20), FDM-Mi (511.8 ± 50.96) e FHM-Mi (174.2 ± 31.89).

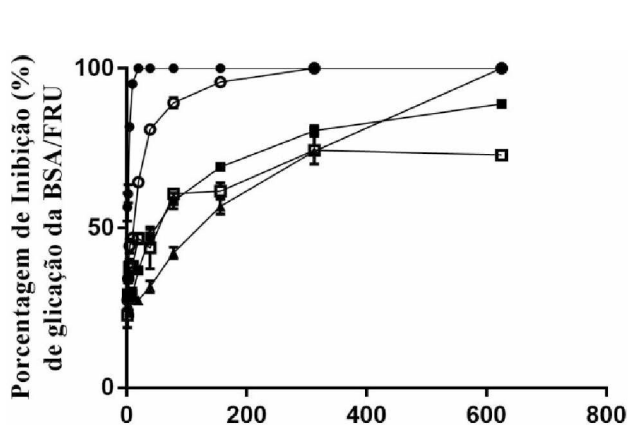
Na metodologia do ORAC (B), todas as frações apresentaram capacidade antioxidante frente à oxidação do radical peroxil, sendo que todos os valores foram maiores que o controle positivo, porém sem significância estatística entre si. A fração com maior valor bruto foi FAE-Mi (2510 ± 67.98). Quercetina foi utilizada como controle positivo (2279 ± 18.45).

No ensaio de DPPH, o controle positivo quercetina e as amostras FAE-Mi e EE-Mi obtiveram os menores valores de EC₅₀ (0.36 ± 0.13; 2.42 ± 0.57; 5.66 ± 1.2 respectivamente). As frações FH-Mi, FDM-Mi e FHM-Mi obtiveram os maiores valores de IC₅₀ e conseqüentemente diferença estatística em relação ao controle positivo.

3.5 Análise da inibição da formação de AGEs



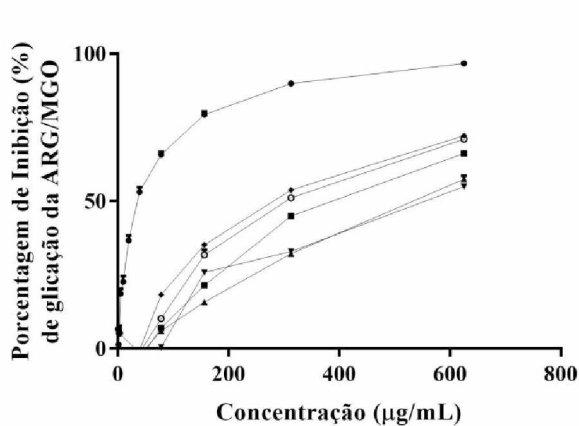
B



EC 50 ± DP

● Quercetina	1,62 ± 0,60 ^a
■ EE-Mi	113,7 ± 16,48 ^b
▲ FH-Mi	588,3 ± 72,36 ^c
▼ FDM-Mi	N.A
◆ FAE-Mi	N.A
○ FB-Mi	18,26 ± 2,04 ^b
◻ FHM-Mi	43,82 ± 13,72 ^b

C

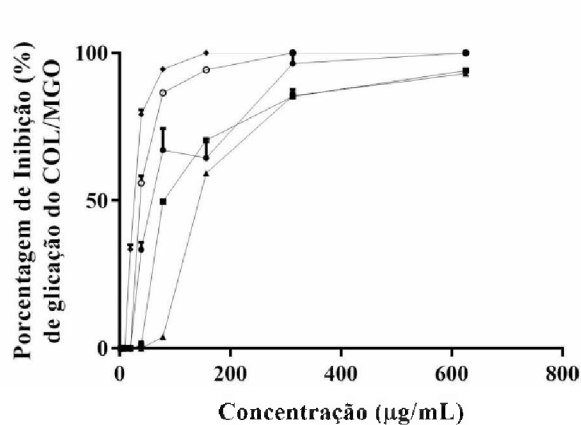


EC 50 ± DP

● Quercetina	35,83 ± 3,22 ^a
■ EE-Mi	521,2 ± 110,6 ^b
▲ FH-Mi	561 ± 137,5 ^b
▼ FDM-Mi	416,8 ± 165,9 ^b
◆ FAE-Mi	218,6 ± 35,87 ^b
○ FB-Mi	493,7 ± 241,2 ^b
◻ FHM-Mi	N.A

Sem significância entre si

D



EC 50 ± DP

● Quercetina	86,44 ± 21,66 ^a
■ EE-Mi	140,7 ± 40,46 ^a
▲ FH-Mi	336,9 ± 139,5 ^b
▼ FDM-Mi	N.A
◆ FAE-Mi	25,03 ± 6,69 ^a
○ FB-Mi	46,36 ± 14 ^a
◻ FHM-Mi	N.A

Fig. 3. Atividade de inibição da glicação do extrato etanólico e frações orgânicas da *Maytenus ilicifolia* em modelo BSA/MGO (A), BSA/FRUTOSE (B), BSA/ARG (C) e COLÁGENO/MGO (D). Os valores da média e erro padrão (\pm) são expressos como valores de EC_{50} . Nota: EE-Mi: extrato etanólico, FH-Mi: fração de hexano, FDM-Mi: fração de diclorometano, FAE-Mi: fração de acetato de etila, FB-Mi: fração n-butanol, FHM-Mi: fração aquosa. Quercetina foi utilizada como controle positivo em todos os modelos. N.A: Não atividade. Letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0,05$).

No modelo de BSA-MGO, nenhuma amostra conseguiu inibir a glicação de BSA ao mesmo nível que o controle positivo quercetina ($0,04 \pm 0,004$), porém as frações orgânicas que obtiveram os melhores valores de EC_{50} e consequentemente foram estatisticamente idênticas em relação a quercetina foram FAE-Mi ($0,16 \pm 0,02$) e FH-Mi ($0,35 \pm 0,05$). A fração com maior valor de EC_{50} foi FDM-Mi ($0,44 \pm 0,09$) seguida da FB-Mi ($0,43 \pm 0,10$) e EE-Mi ($0,42 \pm 0,15$). A fração aquosa não obteve atividade.

No modelo de BSA-FRU, as frações com melhor atividade antiglicante frente a frutose foram FB-Mi ($18,26 \pm 2,04$) e FHM-Mi ($43,82 \pm 13,72$), obtendo um valor próximo ao do controle positivo quercetina ($1,62 \pm 0,60$), porém estatisticamente diferentes. As amostras FDM-Mi e FAE-Mi não obtiveram atividade antiglicante suficiente para realização do EC_{50} .

No modelo de ARG-MGO, as frações com menor valor de EC_{50} e consequentemente melhor atividade antiglicante foram FAE-Mi ($0,21 \pm 0,03$) e FDM-Mi ($0,41 \pm 0,16$). As demais frações obtiveram valores similares (EE-Mi $0,52 \pm 0,11$; FH-Mi $0,56 \pm 0,13$; FB-Mi $0,49 \pm 0,24$), porém nenhuma capaz de inibir a glicação tanto quanto o controle positivo quercetina ($0,03 \pm 0,003$). A fração FHM-Mi não obteve resultado.

No modelo de COL-MGO, as frações FAE-Mi ($0,010 \pm 0,002$) e FB-Mi ($0,018 \pm 0,005$) foram as que obtiveram menor valor de EC_{50} , sendo capazes de ter maior atividade antiglicante até mesmo em relação ao controle positivo quercetina ($0,034 \pm 0,008$). As frações EE-Mi ($0,056 \pm 0,016$) e FH-Mi ($0,134 \pm 0,055$) obtiveram maiores valores de EC_{50} . As frações FDM-Mi e FHM-Mi não apresentaram atividade.

3.6 Inibição da Peroxidação Lipídica

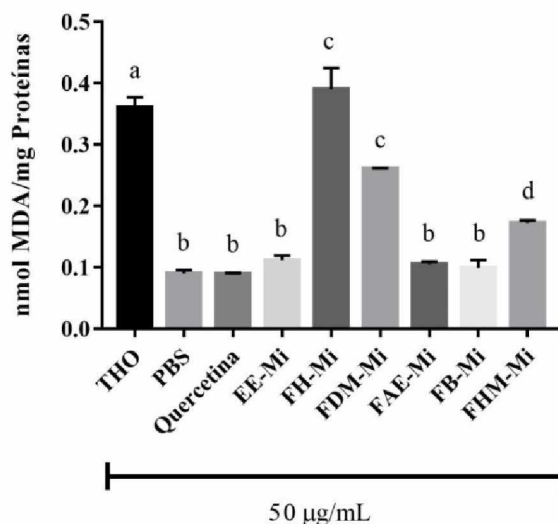


Fig. 4. Análise da peroxidação lipídica em fígado de rato saudável tratado com extrato etanólico e frações orgânicas da *Maytenus ilicifolia*. Os valores da média e desvio padrão (\pm) são expressos como nmol MDA/mg de proteína. Nota: EE-Mi: extrato etanólico, FH-Mi: fração de hexano, FDM-Mi: fração de diclorometano, FAE-Mi: fração de acetato de etila, FB-Mi: fração n-butanol, FHM-Mi: fração aquosa. Quercetina foi usada como controle positivo. Letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0.05$).

No método de medição de malondialdeído (TBARS), o tecido hepático que sofreu oxidação e peroxidação lipídica apresentou um valor de (THO $0,36 \pm 0,011$), significativamente diferente e distante do tecido não oxidado (PBS $0,09 \pm 0,03$), ambos utilizados como controle. O tecido hepático oxidado que foi tratado com as frações orgânicas EE-Mi ($0,11 \pm 0,005$), FAE-Mi ($0,10 \pm 0,003$) e FB-Mi ($0,09 \pm 0,008$) apresentaram baixa peroxidação lipídica em comparação com as frações FHM-Mi ($0,17 \pm 0,002$), FH-Mi ($0,39 \pm 0,024$) e FDM-Mi ($0,26 \pm 0,008$). Quercetina ($0,08 \pm 0,001$) foi utilizada como controle positivo e também inibiu a peroxidação lipídica.

3.7 Análise da proteção da oxidação, glicação e peroxidação lipídica da LDL

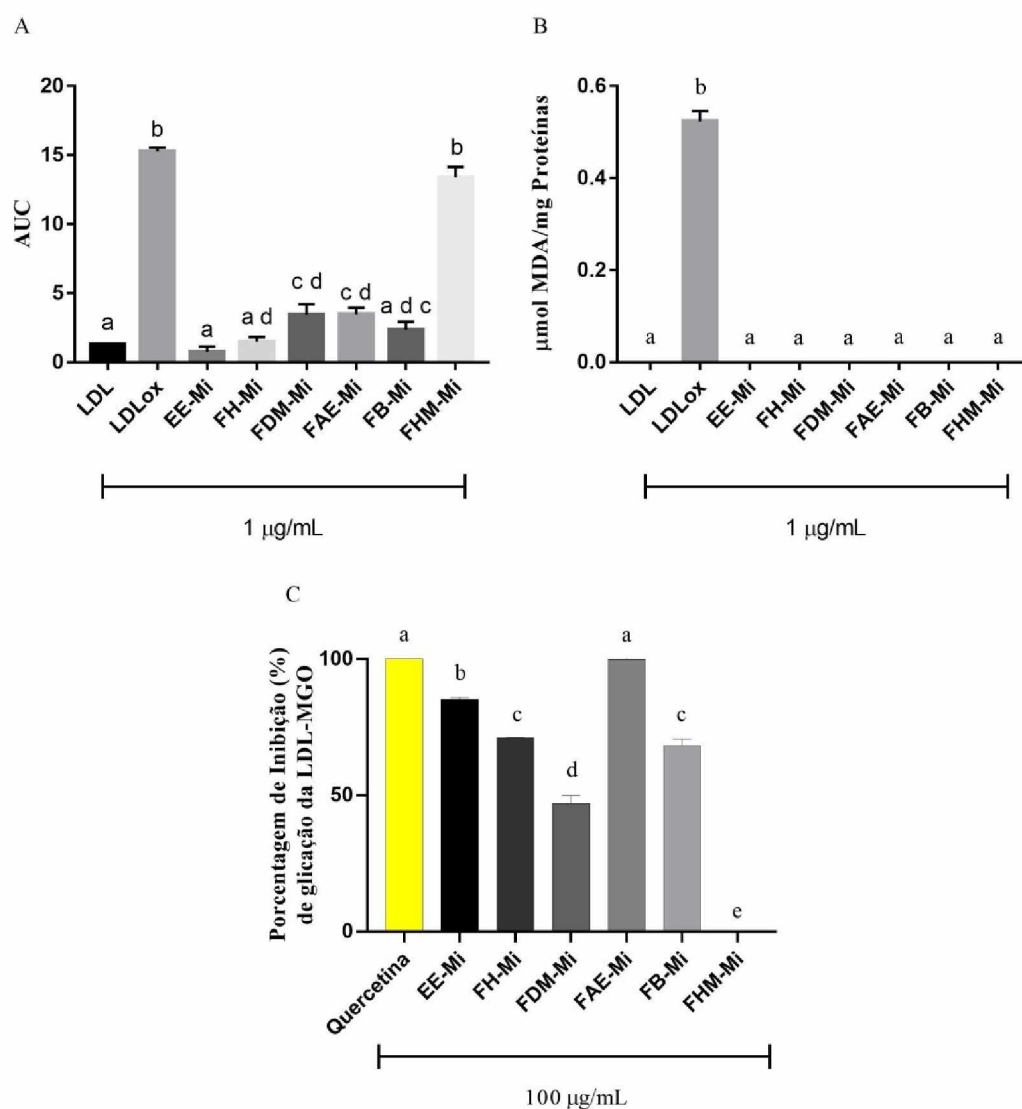


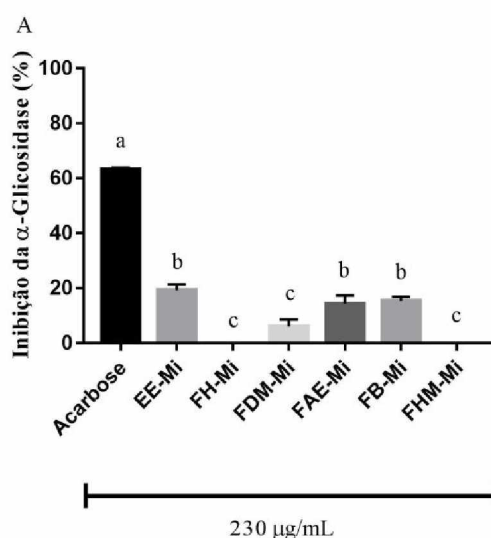
Fig. 5. Análise da oxidação (A), peroxidação lipídica (B) e inibição da glicação (C) de LDL humana tratada com extrato etanólico e frações orgânicas de *Maytenus ilicifolia*. Os valores da média e desvio padrão (\pm) são expressos como AUC – “área under curve” para oxidação (A), $\mu\text{mol MDA/mg Proteínas}$ para peroxidação lipídica (B) e porcentagem de inibição da glicação (C). Nota: EE-Mi: extrato etanólico, FH-Mi: fração de hexano, FDM-Mi: fração de diclorometano, FAE-Mi: fração de acetato de etila, FB-Mi: fração n-butanol, FHM-Mi: fração aquosa. LDL: *low-density lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade) e LDLox: *low-density lipoprotein oxidated* (lipoproteína de baixa densidade oxidada). Quercetina foi usada como controle positivo. Letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0.05$).

No método de inibição da oxidação da LDL, as frações orgânicas com melhor potencial de inibição foram as frações de EE-Mi ($0,76 \pm 0,38$), FH-Mi ($1,50 \pm 0,34$) e FB-Mi ($2,35 \pm 0,58$) estatisticamente semelhantes à LDL ($1,30 \pm 0,002$). As frações FDM-Mi, FAE-Mi e FHM-Mi obtiveram os respectivos valores: $3,45 \pm 0,75$; $3,49 \pm 0,46$ e $13,42 \pm 0,74$.

Surpreendentemente, no método de quantificação de malondialdeído (TBARS), todas as amostras, incluindo o controle positivo, foram capazes de inibir 100% da peroxidação lipídica. A LDL oxidada obteve valor de $0,52 \pm 0,02 \mu\text{mol MDA/ mg Proteínas}$.

No ensaio de inibição de glicação da LDL frente ao MGO, a fração FAE-Mi ($99,91 \pm 0,12$) obteve a melhor resposta e foi estatisticamente semelhante ao controle positivo quercetina (100 ± 0). As demais frações EE-Mi ($85,19 \pm 0,68$), FH-Mi ($71,16 \pm 0,12$), FDM-Mi ($47,01 \pm 2,92$) e FB-Mi ($68,01 \pm 2,57$) conseguiram inibir a glicação porém com menor intensidade. A Fração FHM-Mi não obteve nenhuma atividade inibitória da glicação.

3.8 Análise da capacidade de inibição enzimática



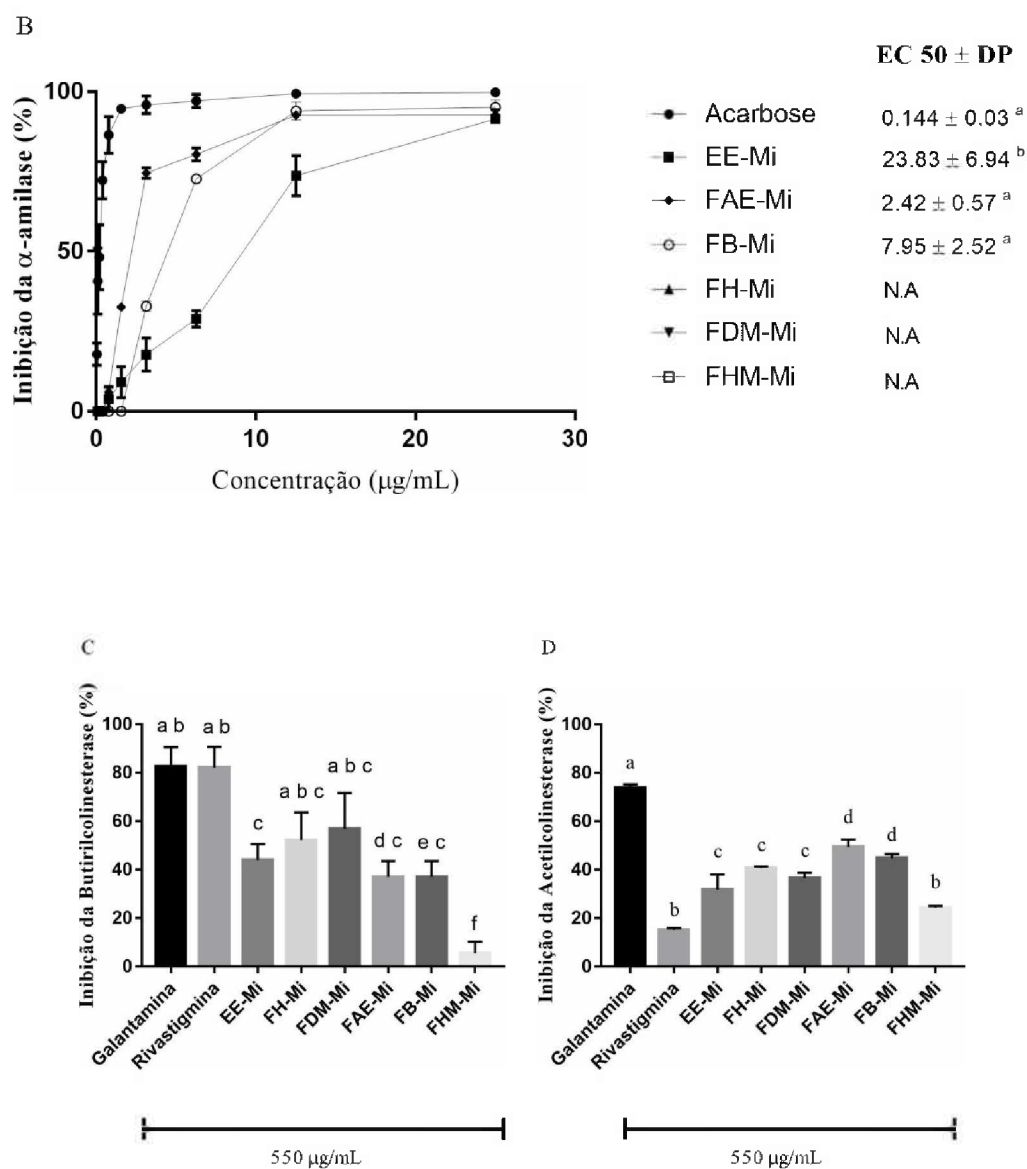


Fig. 6. Atividade de inibição da α -glicosidase (A), α -amilase (B), butirilcolinesterase (C) e acetilcolinesterase (D) do extrato etanólico e frações orgânicas da *Maytenus ilicifolia*. Os valores da média e desvio padrão (\pm) são expressos como porcentagem de inibição (%) das enzimas e valores de EC₅₀ são expressos como média e erro padrão da média (\pm). Nota: EE-Mi: extrato etanólico, FH-Mi: fração de hexano, FDM-Mi: fração de diclorometano, FAE-Mi: fração de acetato de etila, FB-Mi: fração n-butanol, FHM-Mi: fração aquosa. Acarbose foi usada como controle positivo nos ensaios de inibição da α -glicosidase e inibição da α -amilase. Galantamina e Rivastigmina foram utilizadas como controle positivo nos ensaios de inibição da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. N.A: Não atividade. Letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0.05$).

No método de inibição enzimática da α -glicosidase (A) nenhuma fração orgânica teve potencial de inibição acima do controle positivo acarbose (63,27%). As frações EE-Mi (19,32%), FAE-Mi (14,40%) e FB-Mi (15,46%) apresentam valores significativamente maiores que as demais frações (FH-Mi: 0%; FDM-Mi: 6,13%; FHM-Mi: 0%).

No método de inibição enzimática da α -amilase (B) as frações orgânicas que se mostraram com melhor atividade foram FAE-Mi (0.09 ± 0.022), FB-Mi (0.31 ± 0.101) e EE-Mi (0.953 ± 0.277). FH-Mi, FDM-Mi e FHM-Mi não obtiveram atividade. O controle positivo acarbose teve o menor valor de EC_{50} no experimento (0.005 ± 0.001).

No método de inibição enzimática da butirilcolinesterase (C) nenhuma fração orgânica conseguiu inibir tanto quanto os controles positivos, galantamina (82,69%) e rivastigmina (82,15%), porém as frações orgânicas com melhor atividade inibitória capazes de ser significativamente semelhante aos controles foram FDM-Mi (56,84%) e FAE-Mi (52,18%). As demais frações apresentaram resultados inferiores a 50% de inibição e foram significativamente diferentes relacionadas os controles (EE-Mi: 44,01%; FB-Mi: 37,02%; FH-Mi: 37,02%; FHM-Mi: 5,42%).

No método de inibição enzimática da acetilcolinesterase (D) nenhuma fração orgânica conseguiu inibir tanto quanto o controle positivo Galantamina (73,88 %). As frações orgânicas com melhor atividade inibitória foram FAE-Mi (49,49%) e FB-Mi (44,77%). As demais frações obtiveram valores inferiores. As frações de EE-Mi (31,75%), FH-Mi (40,67%) e FDM-Mi (36,49%) foram significativamente semelhantes entre si. A fração com resultado mais baixo inibitório de acetilcolinesterase foi FHM-Mi (24,37%).

3.9 Análise da atividade antimicrobiana

Resultados em µg/mL				
BACTERIAS PELE				
<i>Maytenus ilicifolia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 1228	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416
EE-Mi	250	125	500	125
FH-Mi	500	125	500	125
FDM-Mi	500	250	500	125
FAE-Mi	250	125	250	62,5
FB-Mi	500	125	500	125
FHM-Mi	2000	500	500	250
Quercetina	500	62,5	2000	250
Cloranfenicol	-	-	-	>5,9
Gentamicina	0,7375	0,0461	0,7375	-

BACTERIAS PELE - Anaeróbia	
<i>Maytenus ilicifolia</i>	<i>Cutibacterium acnes</i> ATCC 11827
EE-Mi	15,62
FH-Mi	7,81
FDM-Mi	7,81
FAE-Mi	125
FB-Mi	500
FHM-Mi	500
Quercetina	1000
Gentamicina	5,9

-: Não avaliado

Concentrações das amostras avaliadas frente às bactérias = 0,98 µg/mL a 200 µg/mL

Concentrações do controle positivo testado Cloranfenicol = 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/mL

Concentrações do controle positivo testado Gentamicina = 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/mL

Tabela 3. Atividade antimicrobiana *in vitro* (MIC) do extrato etanólico e frações orgânicas da *Maytenus ilicifolia* contra bactérias da pele aeróbias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* e bactéria da pele anaeróbia *Cutibacterium acnes*. Os valores de inibição foram expressos em µg/mL. Nota: EE-Mi: extrato etanólico, FH-Mi: fração de hexano, FDM-Mi: fração de diclorometano, FAE-Mi: fração de acetato de etila, FB-Mi: fração n-butanol, FHM-Mi: fração aquosa. Cloranfenicol e Gentamicina foram utilizadas como controle positivo. Quercetina foi testada à título de comparação com os demais ensaios deste artigo.

Os valores de MIC foram expressos como concentração de amostra frente às bactérias, a fração que obteve melhor atividade antimicrobiana em bactérias da pele aeróbias foi EtOAc, variando sua concentração entre 62,5 até 250 µg/mL,

porém nenhuma outra fração orgânica e até mesmo a quercetina foram capazes de inibir as bactérias com a mesma intensidade que o controle positivo Gentamicina e Cloranfenicol. No teste de MIC em bactéria anaeróbia, as frações de FH-Mi (7,81), FDM-Mi (7,81) e EE-Mi (15,62) obtiveram valores próximos ao controle positivo (5,9), mostrando assim uma excelente atividade antimicrobiana. As demais frações testadas e a quercetina não se mostraram eficientes frente à *Cutibacterium acnes*, tendo valores superiores a 125.

4. Discussão

Uma das vantagens dos compostos bioativos naturais está associada a suas propriedades antioxidantes, inibidores da formação de produtos avançados de glicação e da inibição da atividade de enzimas, como as hidrolases glicosídicas. A identificação por espectroscopia de massas de alta resolução obtida na análise de HPLC-ESI-MS/MS confirmaram a anotação de diversas moléculas bioativa na folha de *Maytenus ilicifolia*. Na análise de FAEMi, foram encontradas flavonoides, compostos fenólicos e taninos condensados. Os compostos ativos encontrados quercetina, kampferol, rutina e derivados de catequina (Tabela 1) são responsáveis pelo alto potencial biológico do composto estudado. Biomoléculas similares foram também identificadas na fração FBMi, em acordo com as polaridades próximas entre esses dois solventes durante a partição líquido-líquido do extrato etanólico. Estudos conduzidos por Baggio et al., (2009) identificaram compostos bioativos que corroboram com o presente estudo, entre estes, quercetina, kaempferol, catequina e cpigalocatequina e tanino contendo oligômeros dessas catequinas também foram identificadas nas folhas de *Maytenus ilicifolia* (Olivaro et al., 2022).

O teor de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados encontrados (Tabela 2) nas folhas de *Maytenus ilicifolia* explica a elevada capacidade antioxidante das frações. Os compostos identificados no HPLC-ESI-MS/MS são

frequentemente reportados na literatura como potentes antioxidantes como, por exemplo, a quercetina, (epi)catequina e kampferol. Neste estudo foram escolhidos três métodos para elucidar a atividade antioxidante total das amostras, cada método conseguimos verificar uma via de antioxidação diferente, sendo que no FRAP verificamos a capacidade da amostra em quelar íons metálicos através da doação de elétrons, no DPPH verificamos a capacidade da amostra em sequestrar um radical e no ORAC verificamos a capacidade da amostra de reduzir moléculas de hidrogênio (Figura 1 – A/B/C). Concluímos que todas as amostras testadas, com exceção da FHMMi no ensaio de FRAP, obtiveram capacidade antioxidante. Os compostos ativos encontrados nas amostras possuem capacidade de sequestrar um radical livre, reduzir moléculas de hidrogênio e atuar como doadoras de elétrons (Grzesik et al., 2018; Xu et al., 2019). Estudos anteriores já haviam mostrado que a capacidade antioxidante de *Maytenus ilicifolia* é proporcional a sua quantidade de polifenóis totais (Pessuto et al., 2009). O presente estudo é um dos primeiros a relatar níveis de ORAC para a *M. ilicifolia*, mas estudos anteriores relataram a atividade de espécies distintas do mesmo gênero *Maytenus*, porém em diferentes formas de extração e diluição.

A oxidação da LDL pode ser iniciada pelo processo de estresse oxidativo, que à longo prazo, acarreta complicações no organismo, podendo até levar ao surgimento de aterosclerose (Niki, 2018). O presente estudo revela um grande potencial da *Maytenus ilicifolia* na proteção da oxidação da LDL. A capacidade antioxidante de compostos naturais ajuda a estabilizar as membranas celulares eliminando os radicais livres formados (peroxil, ROS e radicais superóxido), e pode auxiliar a diminuir o estresse oxidativo e conseqüentemente diminuir o processo de oxidação.

Estudos mostram que flavonoides, como quercetina e catequina, interagem com a superfície da LDL através de sítios contendo ácidos graxos ou resíduos de açúcar, protegendo assim essas estruturas de ataques de radicais livres (Aviram & Fuhrman, 2002).

O extrato etanólico e frações de *M. ilicifolia*, na concentração de apenas 1 µg/mL, foi capaz de inibir 100% da peroxidação lipídica induzida pela oxidação da LDL. Devido à polaridade de cada diluente orgânico utilizado no fracionamento líquido-líquido ser diferente, diversas classes de compostos como, por exemplo: alcalóides, triterpenos, diterpenos, flavonoides e taninos estavam presentes nas amostras. Essas classes possuem moléculas que por sua vez conseguem inibir o processo de peroxidação lipídica por meio da interação com o íon metálico Cu^{2+} (Kaurinovic & Vastag, 2019), utilizado no experimento para induzir a oxidação da LDL ou até mesmo podem interagir diretamente com a porção hidrofóbica dos lipídeos de membrana para proteger da oxidação e manter a integridade da membrana ou ainda, conseguem doar um elétron para estabilizar um radical livre presente no meio (Cium et al., 2020). Já no teste de quantificação de malondialdéido em tecido hepático, as EEMi, FAEMi e FBMi apresentaram elevada capacidade de redução da peroxidação lipídica. A presença de compostos antioxidantes diminui o processo de peroxidação lipídica através do controle da produção das espécies reativas de oxigênio (Gaschler et al., 2018). Um estudo realizado por Justino et al., (2018) mostrou que o extrato etanólico e frações orgânicas de *Annona muricata* foram capazes de inibir a peroxidação lipídica devido a alta concentração de derivados glicosilados de quercetina, kaempferol e catequina, tais compostos também encontrados no extrato etanólico e frações de *M. ilicifolia*.

No presente estudo, as amostras FAEMi, FBMi foram as melhores candidatas a inibirem a atividade da enzima α -amilase. Essas amostras possuem em sua composição a catequina e análogos de catequina, que por sua vez são descritas como fortes inibidores de α -amilase, devido à capacidade das estruturas oligoméricas não hidrolisáveis ocuparem o sítio de ligação do substrato na enzima (Yilmazer-Musa et al., 2012). Estudos do nosso grupo já mostraram a alta capacidade inibitória de outros compostos orgânicos com grupamentos catequina frente à atividade da enzima α -amilase (Allisson Benatti Justino et al., 2022). A atividade da enzima α -glicosidase não foi inibida da mesma intensidade. Grupos

galato eterificados para posição 3 de anéis C de flavonoides são essenciais para inibição da α -glicosidase (Kamiyama et al., 2010), tais grupos não são encontrados nas amostras testadas neste estudo.

O potencial inibitório de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase das frações orgânicas da folha de *Maytenus ilicifolia* até então não haviam sido elucidadas e os resultados obtidos foram que as amostras FDMMi, FAEMi e FBMi obtiveram os maiores valores de inibição. Pesquisas anteriores mostraram que ambas as enzimas possuem 50% de similaridade estrutural (Rosenberry et al., 2017; Silman & Sussman, 2017) e são susceptíveis a ação de compostos e solventes orgânicos (Novales & Schwans, 2022), portanto, novos estudos devem ser realizados para elucidar a atividade dos compostos encontrados nas folhas de espinheira-santa.

Os produtos de glicação avançada (AGEs) podem integrar o organismo de duas formas, através da dieta ou através da hiperglicemia. Métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antiglicante de determinado composto para proteger moléculas alvo. No presente estudo, identificamos que a fração FAEMi apresentou o menor valor de EC₅₀ da capacidade de inibição da glicação de BSA frente ao metilglioxal e arginina frente ao metilglioxal. A fração FBMi apresentou capacidade de inibição da glicação de BSA frente ao agente glicante frutose. Uma pesquisa previamente realizada mostrou que a formação de AGEs pode ser prevenida por meio de compostos antioxidantes e quelantes de íons metálicos (Zhou et al., 2020). No caso da FAEMi e FBMi o mecanismo de inibição pode ter ocorrido devido a presença de catequinas e proantocianidinas, que possuem capacidade de bloquear a formação das bases de Schiff pela inibição da ligação de grupos amino, inibir compostos carbonílicos reativos e inibir a auto oxidação de açúcares (Perez Gutierrez & Velazquez, 2020). Outros estudos corroboram com os achados, Franco et al., (2020) mostrou o efeito do extrato etanólico e frações de *Bauhinia forficata*, que possuem moléculas ativas

similares as encontradas na *M. ilicifolia*, como derivados de kaempferol e quercetina na inibição da formação de produtos avançados de glicação.

Novas medidas devem ser tomadas para entender e conter os problemas dermatológicos oriundos do envelhecimento da pele, um melhor entendimento de fatores intrínsecos e extrínsecos ajuda a determinar qual o grau de influência que fatores externos (raios UV, dieta, atividade física, etc) e internos (glicação de proteínas) possuem sobre o envelhecimento da pele (Farage et al., 2008). Uma abordagem relativa ao estudo *in vitro* da formação de AGE's em decorrência do envelhecimento tem chamado bastante atenção de pesquisadores de todo o mundo, o "skin ageing", refere-se à expressão em inglês para envelhecimento da pele, onde o colágeno é o principal alvo de glicação (Gkogkolou et al., 2012). Supreendentemente, as FAEMi e FBMi foram capazes de inibir a glicação do colágeno frente ao metilglioxal. A quebra dos AGEs por compostos fenólicos naturais é conhecida pela capacidade desses compostos em prender espécies reativas de carbonila, e além disso, conseguiram proteger o núcleo lipídico dessa lipoproteína (Heung et al., 2021; Meyer et al., 1998).

Esses achados reforçam as aplicações da *Maytenus ilicifolia* na cicatrização de feridas, como demonstrado por de Moura et al., (2021). Até então, nenhum modelo *in vitro* de antiglicação de colágeno frente ao metilglioxal com frações da folha de espinheira-santa havia sido feito. Novos estudos *in vivo* devem ser realizados para determinar a real capacidade dessa espécie, e uma vez elucidados, novos fitoterápicos podem ser desenvolvidos à base de espinheira-santa para tratamento de úlcera ou gastrite, assim como já é descrito no RENAME.

Pesquisas comprovaram que extratos de plantas podem atuar como agentes antimicrobianos, porém a atividade inibitória pode ser dependente da polaridade e da classificação da bactéria, onde extratos mais apolares inibem mais o crescimento bacteriano em relação a extratos polares (Vieitez et al., 2018). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as frações de FHeMi e FDMMi

apresentaram uma alta atividade (similar ao controle positivo) frente a bactéria anaeróbia gram-positiva *Cutibacterium acnes* ATCC11827, causadora da acne, este resultado confirma a hipótese da influência da polaridade na inibição do crescimento bacteriano, onde compostos apolares são mais eficientes em relação a compostos polares. A *C. acnes* é encontrada em baixos níveis na pele, porém, é uma bactéria resistente em ambiente hiperseborreico (folículos sebáceos) (Dréno et al., 2018) e tem se tornado um problema muito comum nas últimas décadas, principalmente em indivíduos de idade entre 15 e 20 anos, possivelmente, a proliferação da bactéria está ligada a questões hormonais (Alkhawaja et al., 2020). A resistência da *C. acnes* frente aos antibióticos está aumentando em todo o mundo e os padrões de resistência são variados, seja resistência a um antibiótico, a dois antibióticos ou até mesmo a múltiplas drogas diferentes (N. Zhang et al., 2019), além disso, os efeitos colaterais do uso de antibióticos por tempo prolongado prejudica a saúde e pode também promover a resistência bacteriana. Moléculas bioativas provindas de fonte botânica atraem a atenção de pesquisadores, uma vez que muitas são eficientes em combater as bactérias e podem apresentar outras funções adjuntas, como ação anti-inflamatória, antioxidante e cicatrizante (Pineau et al., 2019). Até então, a utilização de frações orgânicas de *M. ilicifolia* no tratamento da *C. acnes* não havia sido elucidado. A atividade antimicrobiana da *Maytenus ilicifolia* foi documentada em uma pesquisa feita por Paula et al., (2021), porém a planta foi utilizada no combater a *H. pylori* (bactéria responsável pela gastrite e úlcera que se aloja na mucosa estomacal) e os resultados mostram que a adesão da bactéria na célula da mucosa estomacal foi reduzida na presença da planta.

5. Conclusão

Em resumo, as FAEMi e FBMi apresentaram os maiores valores no conteúdo de fenóis totais, atividade antioxidante, inibição da oxidação e peroxidação lipídica da LDL e em tecido hepático, atividade inibitória da enzima α -amilase e atividade

inibitória da glicação de BSA, Colágeno e LDL frente ao metilglioxal, e as frações de FHeMi e FDMMi foram capazes de inibir o desenvolvimento da bactéria causadora da acne.

Várias biomoléculas conhecidas como potentes antioxidantes foram encontradas nas amostras FAEMi e FBMi. Além disso, este trabalho mostra novos estudos biológicos realizados com extrato etanólico da folha de *Maytenus ilicifolia* e suas frações orgânicas, apresentando o grande potencial que essa planta pode oferecer.

6. Referências

- Abu-Reidah, I. M., Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2015). HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chemistry*, *166*, 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.011>
- Alkhawaja, E., Hammadi, S., Abdelmalek, M., Mahasneh, N., Alkhawaja, B., & Abdelmalek, S. M. (2020). Antibiotic resistant *Cutibacterium acnes* among acne patients in Jordan: a cross sectional study. *BMC Dermatology*, *20*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12895-020-00108-9>
- Alqahtani, A. S., Li, K. M., Razmovski-Naumovski, V., Kam, A., Alam, P., & Li, G. Q. (2021). Attenuation of methylglyoxal-induced glycation and cellular dysfunction in wound healing by *Centella cordifolia*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(1), 813–824. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.016>
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, *127*(1), 183–198. <https://doi.org/10.1039/b009171p>
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, *33*(8), 1582–1614. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>
- Aviram, M., & Fuhrman, B. (2002). Wine flavonoids protect against LDL oxidation

and atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 146–161. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02913.x>

- Baggio, C. H., Freitas, C. S., Mayer, B., dos Santos, A. C., Twardowschy, A., Potrich, F. B., Cipriani, T. R., de Souza, L. M., Sasaki, G. L., Iacomini, M., Marques, M. C. A., & Mesia-Vela, S. (2009). Muscarinic-dependent inhibition of gastric emptying and intestinal motility by fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reissek. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3), 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.037>
- Barba-Ostria, C., Carrera-Pacheco, S. E., Gonzalez-Pastor, R., Heredia-Moya, J., Mayorga-Ramos, A., Rodríguez-Pólit, C., Zúñiga-Miranda, J., Arias-Almeida, B., & Guamán, L. P. (2022). Evaluation of Biological Activity of Natural Compounds: Current Trends and Methods. *Molecules*, 27(14), 1–35. <https://doi.org/10.3390/molecules27144490>
- Cheignon, C., Tomas, M., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2017). Author 's Accepted Manuscript. *Redox Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
- Chiapetti, T. P., Malavasi, U. C., Braga, G. C., & Malavasi, M. M. (2019). Effects of the extraction method and chromatographic separation solvent in the antioxidant activity of different species of “espinheira-santa.” *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 5056–5062. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03978-1>
- Cium, L., Milaciu, M. V., Runcan, O., Vesa, C., Negrean, V., Pern, M., & Donca, V. I. (2020). *molecules The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases*. 1–18.
- Costa Silva, T. da, Justino, A. B., Prado, D. G., Koch, G. A., Martins, M. M., Santos, P. de S., Morais, S. A. L. de, Goulart, L. R., Cunha, L. C. S., Sousa, R. M. F. de, Espindola, F. S., & de Oliveira, A. (2019). Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory capacity of α -amylase, α -glucosidase, lipase and non-enzymatic glycation, in vitro, of the leaves of *Cassia bakeriana* Craib. *Industrial Crops and Products*, 140(July), 111641. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111641>
- Da Silva Santos, T. V., Teixeira, R. R., Franco, D. L., Madurro, J. M., Brito-Madurro, A. G., & Espindola, F. S. (2012). Bioelectrode for detection of human salivary amylase. *Materials Science and Engineering C*, 32(3), 530–535. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.12.005>
- de Moura, F. B. R., Ferreira, B. A., Deconte, S. R., Landim, B. C., Justino, A. B., Aro, A. A. de, Espindola, F. S., Rodrigues, R. A. F., Ribeiro, D. L., Araújo, F. de A., & Tomiosso, T. C. (2021). Wound healing activity of the hydroethanolic extract of the leaves of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reis. *Journal of Traditional*

- and Complementary Medicine*, 11(5), 446–456.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.03.003>
- de Moura Martins, C., Morais, S. A. L. d., Martins, M. M., Cunha, L. C. S., V. da Silva, C., Teixeira, T. L., B. Santiago, M., de Aquino, F. J. T., Nascimento, E. A., Chang, R., Martins, C. H. G., & de Oliveira, A. (2020). Antifungal and cytotoxicity activities and new proanthocyanidins isolated from the barks of *Inga laurina* (Sw.) Willd. *Phytochemistry Letters*, 40(August), 109–120.
<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.10.001>
- de Souza, L. M., Cipriani, T. R., Iacomini, M., Gorin, P. A. J., & Sasaki, G. L. (2008). HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1), 59–67.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.008>
- do Nascimento, M. N. G., Machado Martins, M., Scalon Cunha, L. C., de Souza Santos, P., Goulart, L. R., de Souza Silva, T., Gomes Martins, C. H., de Morais, S. A. L., & Pivatto, M. (2020). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Senna* and *Cassia* species (Fabaceae) extracts. *Industrial Crops and Products*, 148(November 2019), 112081.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112081>
- Dréno, B., Pécastaings, S., Corvec, S., Veraldi, S., Khammari, A., & Roques, C. (2018). *Cutibacterium acnes* (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 32, 5–14. <https://doi.org/10.1111/jdv.15043>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2008). *Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing : a review*. 87–95.
- Ferreira, L. T., Saviolli, I. H., & Abreu, L. C. De. (2010). *Diabetes melito : hiperglicemia crônica e suas complicações Diabetes mellitus : hyperglycemia and its chronic complications*. 182–188.
- Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants*, 1–28. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>
- Franco, R. R., da Silva Carvalho, D., de Moura, F. B. R., Justino, A. B., Silva, H. C. G., Peixoto, L. G., & Espindola, F. S. (2018). 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, 215, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.032>

- Franco, R. R., Hugo, V., Alves, M., Fernando, L., Zabisky, R., Justino, A. B., Martins, M. M., Saraiva, A. L., Goulart, L. R., & Espindola, F. S. (2020). Biomedicine & Pharmacotherapy 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*, 123(November 2019), 109798. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109798>
- Fraternale, D., Ricci, D., Verardo, G., Gorassini, A., Stocchi, V., & Sestili, P. (2015). Activity of vitis vinifera tendrils extract against phytopathogenic fungi. *Natural Product Communications*, 10(6), 1037–1042. <https://doi.org/10.1177/1934578x1501000661>
- Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., Knight, A. R., Taylor, E. L., Oettrich, J., Ruskovska, T., Gasparovic, A. C., Cuadrado, A., Weber, D., Poulsen, H. E., Grune, T., Schmidt, H. H. H. W., & Ghezzi, P. (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 23(14), 1144–1170. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6317>
- Galvão, M. A. M., Arruda, A. O. de, Bezerra, I. C. F., Ferreira, M. R. A., & Soares, L. A. L. (2018). 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*, 61, 1–20. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018170586>
- Gaschler, M. M., Stockwell, B. R., Corner, S. N., Northwest, S., & Building, C. (2018). *HHS Public Access*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>.Lipid
- Ge, Y. W., Zhu, S., Kazuma, K., Wei, S. L., Yoshimatsu, K., & Komatsu, K. (2016). Molecular ion index assisted comprehensive profiling of B-type oligomeric proanthocyanidins in rhubarb by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(13), 3555–3570. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9433-z>
- Gkogkolou, P., Böhm, M., Gkogkolou, P., & Böhm, M. (2012). *Advanced glycation end products Advanced glycation end products Key players in skin aging ? 1980*. <https://doi.org/10.4161/derm.22028>
- Glabe, C. G. (2006). *Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease*. 27, 570–575. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.04.017>
- Godić, A., Pojšak, B., Adamič, M., & Dahmane, R. G. (2020). Corrigendum to “The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–1.

<https://doi.org/10.1155/2020/1969760>

- Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*, *71*(16), 1848–1864. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.08.002>
- Groppo, M., Simmons, M. P., Cappa, J. J., Biral, L., & Lombardi, J. A. (2014). A new species of maytenus (Celastraceae) with fleshy fruits from eastern Brazil, with notes on the delimitation of maytenus. *Systematic Botany*, *39*(2), 478–484. <https://doi.org/10.1600/036364414X680726>
- Grzesik, M., Naparło, K., Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2018). Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food Chemistry*, *241*(August 2017), 480–492. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.117>
- Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Zhang, Z., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., & Prior, R. L. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *Journal of Mass Spectrometry*, *38*(12), 1272–1280. <https://doi.org/10.1002/jms.541>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. In *Archives of Toxicology* (Vol. 94, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Hamed, A. I., Said, R. Ben, Kontek, B., Al-Ayed, A. S., Kowalczyk, M., Moldoch, J., Stochmal, A., & Olas, B. (2016). LC-ESI-MS/MS profile of phenolic and glucosinolate compounds in samh flour (*Mesembryanthemum forsskaei* Hochst. ex Boiss) and the inhibition of oxidative stress by these compounds in human plasma. *Food Research International*, *85*, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.009>
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., & Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, *14*(2), 111–129. <https://doi.org/10.1038/nrd4510>
- Heung, C., Ga, C., Youm, H., Kim, M., Kim, S., Ji, E., Young, S., Nam, D., & Hoon, S. (2021). Evaluation of the Relationship Between Bioactive Components in Seaweeds and Advanced Glycation End - Products Inhibitory Activities Using Principal Component Analysis. *Plant Foods for Human Nutrition*, 326–333. <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00908-5>
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants- superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (

- GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Jorge, R. M., Leite, J. P. V., Oliveira, A. B., & Tagliati, C. A. (2004). Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.04.019>
- Justino, Allisson B., Franco, R. R., Silva, H. C. G., Saraiva, A. L., Sousa, R. M. F., & Espindola, F. S. (2019). B procyanidins of *Annona crassiflora* fruit peel inhibited glycation, lipid peroxidation and protein-bound carbonyls, with protective effects on glycated catalase. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55779-3>
- Justino, Allisson Benatti, Guerra Silva, H. C., Franco, R. R., de Oliveira Cavalcante Pimentel, I., Silva, N. F., Saraiva, A. L., & Espindola, F. S. (2022). Flavonoids and proanthocyanidins-rich fractions from *Eugenia dysenterica* fruits and leaves inhibit the formation of advanced glycation end-products and the activities of α -amylase and α -glucosidase. *Journal of Ethnopharmacology*, 285(September 2021). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114902>
- Justino, Allisson Benatti, Miranda, N. C., Franco, R. R., Martins, M. M., Silva, N. M. da, & Espindola, F. S. (2018). *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 100(January), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.172>
- Kamiyama, O., Sanae, F., Ikeda, K., Higashi, Y., Minami, Y., Asano, N., Adachi, I., & Kato, A. (2010). In vitro inhibition of α -glucosidases and glycogen phosphorylase by catechin gallates in green tea. *Food Chemistry*, 122(4), 1061–1066. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.075>
- Karak, P. (2019). *BIOLOGICAL ACTIVITIES OF FLAVONOIDS : AN OVERVIEW INTRODUCTION : Polyphenols are chemical*. 10(May). [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(4\).1567-74](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1567-74)
- Karyna, M., Pereira, C., Gabriel, V., & Ferreira, F. (2022). *Atividade cicatrizante e antioxidante da Maytenus ilicifolia (espinheira-santa) : uma revisão Healing and antioxidant activity of Maytenus ilicifolia (espinheira-santa) : a review Actividad cicatrizante y antioxidante de Maytenus ilicifolia (espinheira*. 2022, 1–8.
- Kaurinovic, B., & Vastag, D. (2019). *Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants*.
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020).

Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12(2), 1–25.
<https://doi.org/10.3390/nu12020457>

- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocess Processing*, 89(3), 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
- Kumar, B. S. A., Lakshman, K., Nandeesh, R., Kumar, P. A. A., Manoj, B., Kumar, V., & Shekar, D. S. (2011). In vitro alpha-amylase inhibition and in vivo antioxidant potential of *Amaranthus spinosus* in alloxan-induced oxidative stress in diabetic rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.08.002>
- Leite, J. P. V., Braga, F. C., Romussi, G., Persoli, R. M., Tabach, R., Carlinid, E. A., & Oliveirab, A. B. (2010). Constituents from maytenus ilicifolia leaves and bioguided fractionation for gastroprotective activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(2), 248–254. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000200009>
- Lima, D. D. C., Pitorro, T. E. A., Santiago, M. B., Franco, R. R., Silva, T. da C., Prado, D. G., Cunha, L. C. S., Espindola, F. S., Tavares, D. C., Nicolella, H. D., Martins, C. H. G., & Novais, V. R. (2022). In vitro evaluation of the antibacterial and cytotoxic activities of the *Euclea natalensis* crude extract and fractions against oral infection agents. *Archives of Oral Biology*, 143(May). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105546>
- Lima Júnior, J. P. de, Franco, R. R., Saraiva, A. L., Moraes, I. B., & Espindola, F. S. (2021). *Anacardium humile* St. Hil as a novel source of antioxidant, antiglycation and α -amylase inhibitors molecules with potential for management of oxidative stress and diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 268(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113667>
- Lin, S., Hsu, C. C. C., Tsai, M., Cheng, H., Leong, M. K., Chen, P. S. J., & Weng, C. (2020). *Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. April 2019*, 1409–1423. <https://doi.org/10.1111/bph.14816>
- Litescu, S. C., Eremia, S. A. V., Tache, A., Vasilescu, I., & Radu, G. L. (2014). The Use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assays in the Assessment of Beverages' Antioxidant Properties. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00025-8>
- Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L., & Markesbery, W. R. (1998). *Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques*. 158, 47–52.
- Marins, K., Santin, M., Schindler, Z., Felipe, J., Regginato, A., Mezzomo, H.,

- Paula, A., Luiz, A., Dal, J., & Zanatta, L. (2021). *Characterization of the chemical profile and the effects of ethanolic extracts of Maytenus ilicifolia Mart . ex Reissek on glucose metabolism in normal hyperglycemic rats*. 276(December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114173>
- Marston, A., Kissling, J., & Hostettmann, K. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, 13(1), 51–54. <https://doi.org/10.1002/pca.623>
- Martysiak-Zurowska, D., & Wenta, W. (2012). A comparison of abts and dpph methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 11(1), 83–89.
- Matkowski, A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnology Advances*, 26(6), 548–560. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.001>
- Meirelles, G. D. C. (2022). *Phytochemistry and Pharmaceutical Technology Studies on Monteverdia ilicifolia (Maytenus ilicifolia): a Traditionally Used Medicinal Plant*.
- Meyer, A. S., Heinonen, M., & Frankel, E. N. (1998). Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 61(1–2), 71–75. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00100-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00100-3)
- Misrani, A., Tabassum, S., & Yang, L. (2021). *Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer ' s Disease*. 13(February), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.617588>
- Moldogazieva, N T, Mokhosoev, I. M., Feldman, N. B., & Lutsenko, S. V. (2018). ROS and RNS signalling : adaptive redox switches through oxidative / nitrosative protein modifications. *Free Radical Research*, 52(5), 507–543. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1457217>
- Moldogazieva, Nurbubu T, Mokhosoev, I. M., Mel, T. I., Porozov, Y. B., & Terentiev, A. A. (2019). *Review Article Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases*. 2019.
- Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V. E., Kalyanaraman, B., Larsson, N. G., Milne, G. L., Nyström, T., Poulsen, H. E., Radi, R., Van Remmen, H., ... Halliwell, B. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, 4(6), 651–662. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z>

- Navazesh, M. (1993). PDFlib PLOP : PDF Linearization , Optimization , Protection Page inserted by evaluation version Methods for Collecting Saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 72–77.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013). Lehninger. In *Book*. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2011.03.016>
- Niki, E. (2018). Free Radical Biology and Medicine Oxidant-specific biomarkers of oxidative stress . Association with atherosclerosis and implication for antioxidant effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 120(March), 425–440. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.001>
- Novales, N. A., & Schwans, J. P. (2022). Comparing the effects of organic cosolvents on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. *Analytical Biochemistry*, 654(February), 114796. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114796>
- Olivaro, C., Escobal, M., de Souza, G., & Mederos, A. (2022). Chemical characterisation and in vitro anthelmintic activity of phenolic-rich extracts from the leaves and branches of *Maytenus ilicifolia*, a native plant from South America. *Natural Product Research*, 36(12), 3168–3172. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1948844>
- Paula, M. N. De, Kelm, M., Symma, N., Garcia, R., Pilatti, F., Sendker, J., Hensel, A., Carlos, J., & Mello, P. De. (2021). Anti - adhesive Activity of *Maytenus ilicifolia* Against *Helicobacter pylori*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 726–731. <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00214-w>
- Paulino, N., Vieira, G. F., Ikegawa, M., Beatriz, L., Carvalho, D. L., Bernardo, I. P., & Nogueira, V. F. (2019). *Development of effervescent medical powder containing Maytenus ilicifolia extract Mart . ex Reissek for treatment of gastric disorders*. <https://doi.org/10.15171/ijpni.2019.14>
- Pereira, M. N., Justino, A. B., Martins, M. M., Peixoto, L. G., Vilela, D. D., Santos, P. S., Teixeira, T. L., da Silva, C. V., Goulart, L. R., Pivatto, M., & Espindola, F. S. (2017). Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. *Industrial Crops and Products*, 97, 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.038>
- Perez Gutierrez, R. M., & Velazquez, E. G. (2020). Glucopyranoside flavonoids isolated from leaves of *Spinacia oleracea* (spinach) inhibit the formation of advanced glycation end products (AGEs) and aldose reductase activity (RLAR). *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 128(April), 110299. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110299>
- Pessuto, M. B., Casemiro, I., Souza, A. B. De, Michely, F., Carlos, J., & Petereit, F. (2009). *Artigo*. 32(2), 412–416.

- Pineau, R. M., Hanson, S. E., Lyles, J. T., & Quave, C. L. (2019). *Growth Inhibitory Activity of Callicarpa americana Leaf Extracts Against Cutibacterium acnes*. 10(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01206>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). European Journal of Medicinal Chemistry The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., & Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, 15(4), 235–240. <https://doi.org/10.1002/pca.777>
- Ramana, K. V., Srivastava, S., & Singhal, S. S. (2017). Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease 2016. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–2. <https://doi.org/10.1155/2017/2163285>
- Rao, P. S., & Mohan, G. K. (2017). In vitro alpha-amylase inhibition and in vivo antioxidant potential of Momordica dioica seeds in streptozotocin-induced oxidative stress in diabetic rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6), 1262–1267. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.010>
- Rhee, I. K., Van De Meent, M., Ingkaninan, K., & Verpoorte, R. (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, 915(1–2), 217–223. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00624-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00624-0)
- Role, T. H. E., Lipid, O. F., Oxidative, I. N., & Of, M. (1992). *THE ROLE OF LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANTS IN OXIDATIVE MODIFICATION OF LDL*. 13, 341–390.
- Rosenberry, T. L., Brazzolotto, X., MacDonald, I. R., Wandhammer, M., Trovaslet-Leroy, M., Darvesh, S., & Nachon, F. (2017). Comparison of the binding of reversible inhibitors to human butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase: A crystallographic, kinetic and calorimetric study. *Molecules*, 22(12), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules22122098>
- Sakna, S. T., Mocan, A., Sultani, H. N., El-fiky, N. M., Wessjohann, L. A., & Farag, M. A. (2019). Metabolites profiling of Ziziphus leaf taxa via UHPLC/PDA/ESI-MS in relation to their biological activities. *Food Chemistry*, 293(February), 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.097>
- Sannomiya, M., Vilegas, W., Rastrelli, L., & Pizza, C. (1998). A flavonoid glycoside from Maytenus aquifolium. *Phytochemistry*, 49(1), 237–239. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00842-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00842-X)

- Sayre, L. M., Zelasko, D. A., Harris, L. R., Perry, G., Salomon, R. G., & Smith, M. A. (1997). 4-Hydroxynonenal-Derived Advanced Lipid Peroxidation End Products Are Increased in Alzheimer ' s Disease.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014a). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014b). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *CURBIO*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Murphy, M. P., Yamamoto, M., & Winterbourn, C. (2022). Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(7), 499–515. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>
- Silman, I., & Sussman, J. L. (2017). Recent developments in structural studies on acetylcholinesterase. *Journal of Neurochemistry*, 142, 19–25. <https://doi.org/10.1111/jnc.13992>
- Sobeh, M., Mahmoud, M. F., Abdelfattah, M. A. O., Cheng, H., El-Shazly, A. M., & Wink, M. (2018). A proanthocyanidin-rich extract from *Cassia abbreviata* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 213(November 2017), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.007>
- Toma, A., Makonnen, E., Mekonnen, Y., Debella, A., & Addisakwattana, S. (2014). Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-180>
- Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I., & Alborés, S. (2018). Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *Journal of Supercritical Fluids*, 133(August 2017), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.025>
- Vilegas, W., Sanommiya, M., Rastrelli, L., & Pizza, C. (1999). Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 403–406. <https://doi.org/10.1021/jf980114i>
- Vistoli, G., Maddis, D. De, Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., Aldini, G., Maddis, D.

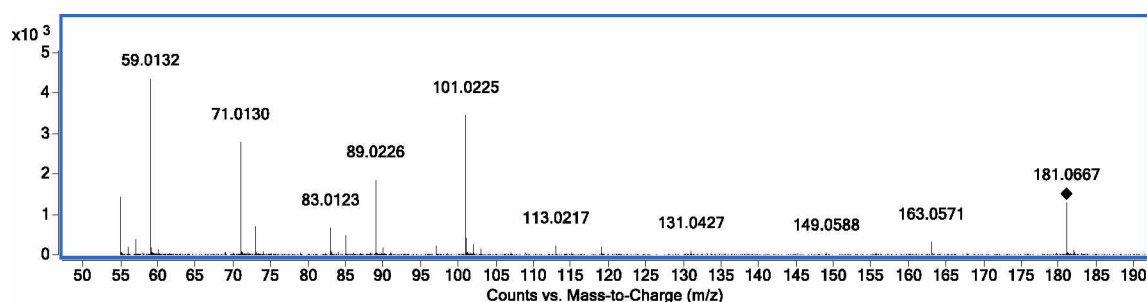
- De, Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., & Aldini, G. (2013). *Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation.* 5762. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.815348>
- Wang, W., Yagiz, Y., Buran, T. J., Nunes, C. do N., & Gu, L. (2011). Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food Research International*, 44(9), 2666–2673. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.022>
- Willett, W. C. (2006). The Mediterranean diet: science and practice. *Public Health Nutrition*, 9(1a), 105–110. <https://doi.org/10.1079/phn2005931>
- Witkowska, A. M. (2018). *Advances in Medical Sciences Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body.* 63, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>
- Xu, D., Hu, M. J., Wang, Y. Q., & Cui, Y. L. (2019). Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061123>
- Yang, G., Sau, C., Lai, W., Cichon, J., & Li, W. (1993). *the Spin Trapping of Superoxide and Hydroxyl Free Radicals With Dmpo (5,5-Dimethylpyrroline-N-Oxide): More About Iron.* 344(6188), 1173–1178.
- Yang, X., Li, Y., Li, Y., Ren, X., Zhang, X., & Hu, D. (2017). *Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis : Mechanisms and Therapies.* 8(August), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00600>
- Yilmazer-Musa, M., Griffith, A. M., Michels, A. J., Schneider, E., & Frei, B. (2012). Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α -amylase and α -glucosidase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8924–8929. <https://doi.org/10.1021/jf301147n>
- Zhang, L., Bin, M. J., Li, Q. Q., Liu, K. Z. J., & Li, M. (2020). CHEMISTRY Phytochemicals and biological activities of species from the genus Maytenus. *Medicinal Chemistry Research*, 575–606. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02509-4>
- Zhang, N., Yuan, R., Xin, K. Z., Lu, Z., & Ma, Y. (2019). Antimicrobial Susceptibility, Biotypes and Phylotypes of Clinical Cutibacterium (Formerly Propionibacterium) acnes Strains Isolated from Acne Patients: An Observational Study. *Dermatology and Therapy*, 9(4), 735–746. <https://doi.org/10.1007/s13555-019-00320-7>
- Zhou, Q., Cheng, K. W., Xiao, J., & Wang, M. (2020). The multifunctional roles of flavonoids against the formation of advanced glycation end products (AGEs) and AGEs-induced harmful effects. *Trends in Food Science and Technology*,

103(January), 333–347. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.002>

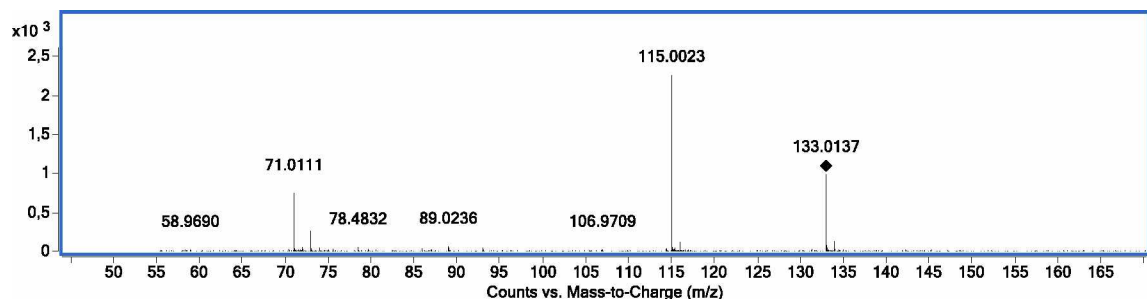
Zou, Y., Chang, S. K. C., Gu, Y., & Qian, S. Y. (2011). Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2268–2276. <https://doi.org/10.1021/jf104640k>

7.0 Material Suplementar

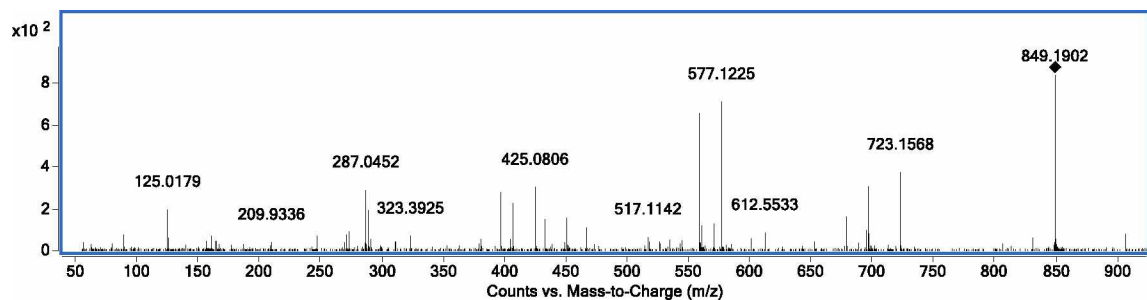
(–)-IES/EMEM do sorbitol (m/z 181.0721 [M – H][–]).



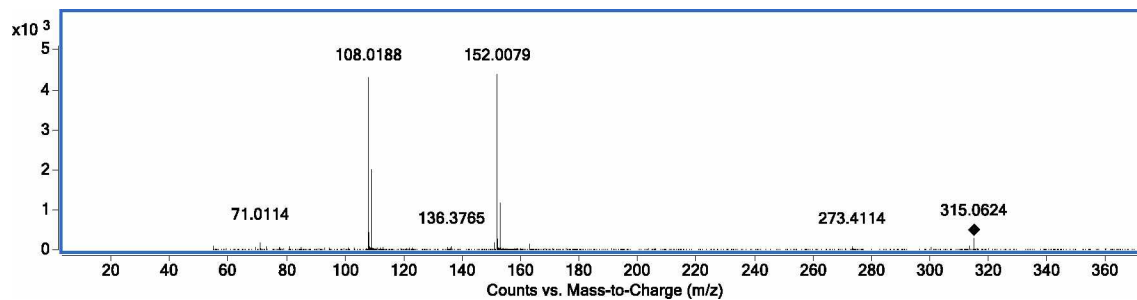
(–)-IES/EMEM do ácido málico (m/z 133.0143 [M – H][–]).



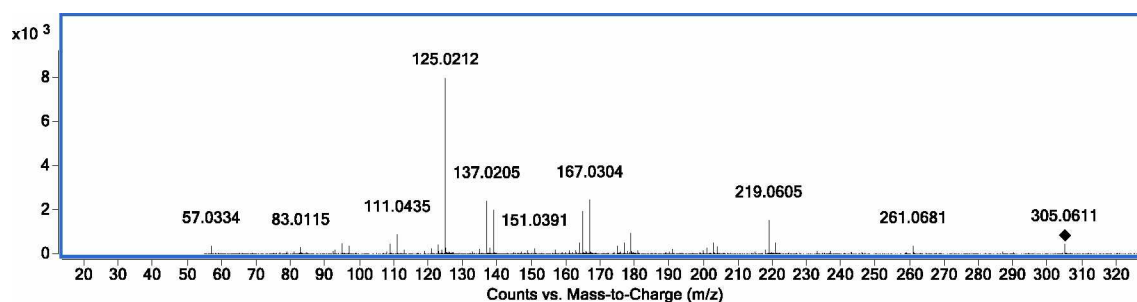
(–)-IES/EMEM do (epi)afz-(epi)cat-(epi)cat (m/z 849.2045 [M – H][–]).



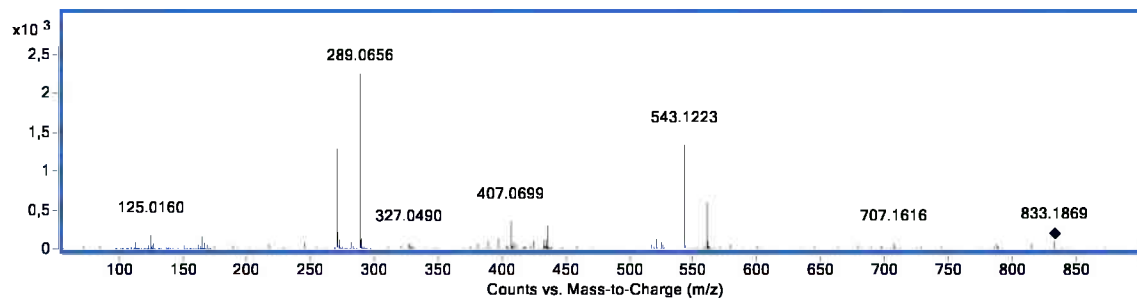
(-)-IES/EMEM do ácido protocatecuico hexosídeo (m/z 315.0727 $[M - H]^-$).



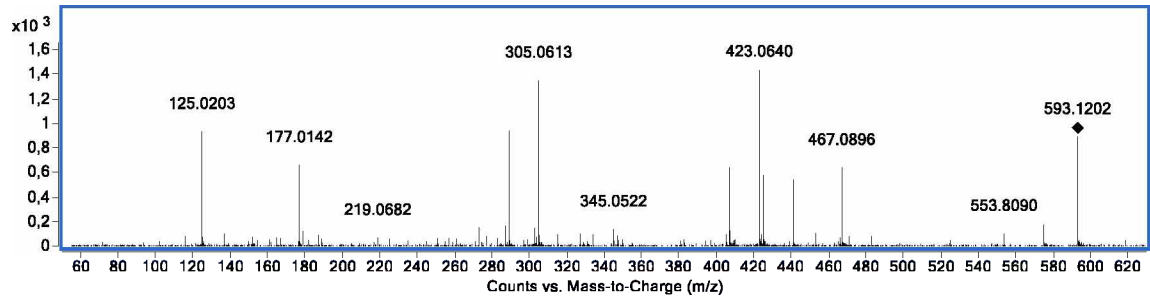
(-)-IES/EMEM do (epi)galocatequina (m/z 305.0669 $[M - H]^-$).



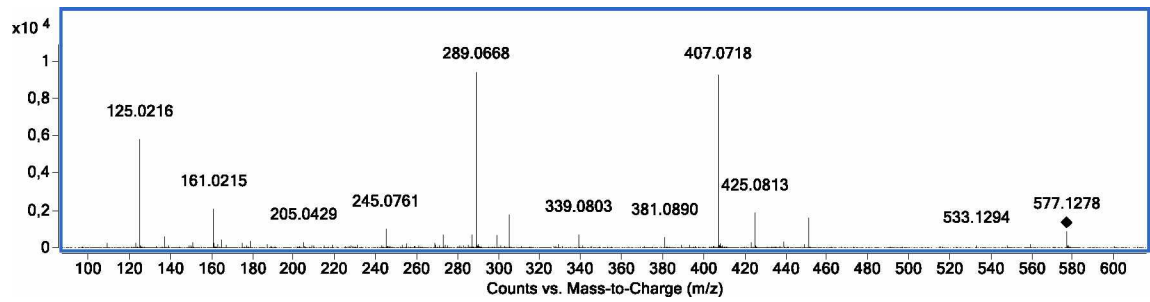
(-)-IES/EMEM do (epi)afz-(epi)afz-(epi)cat I (m/z 833.2085 $[M - H]^-$).



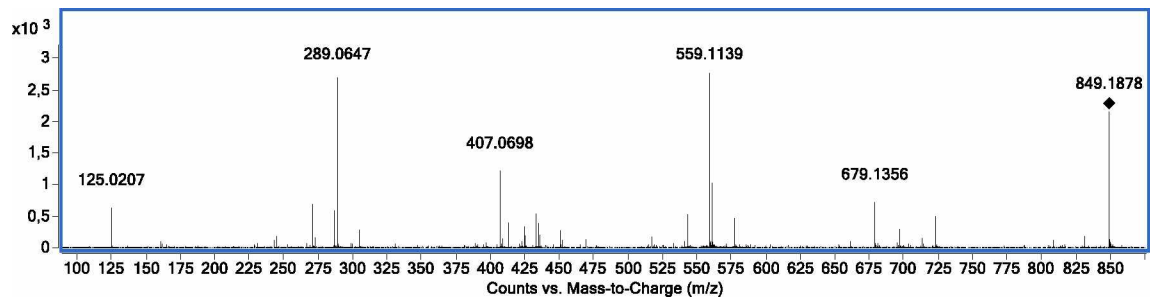
(-)-IES/EMEM do (epi)cat-(epi)gal (m/z 593.1309 $[M - H]^-$).



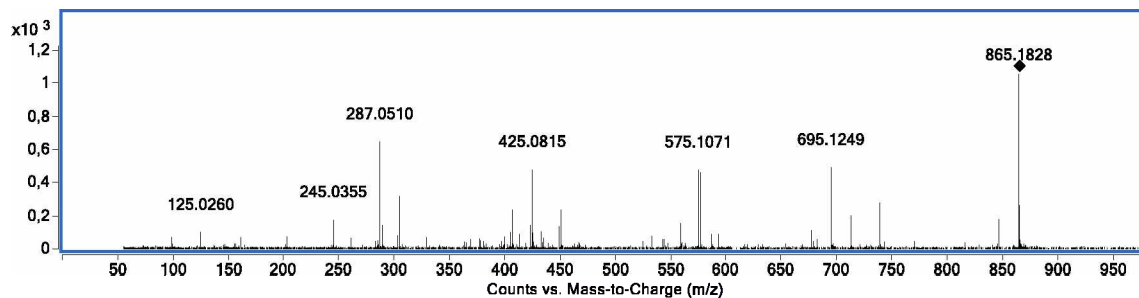
(-)-IES/EMEM do (epi)cat-(epi)cat (m/z 577.1355 $[M - H]^-$).



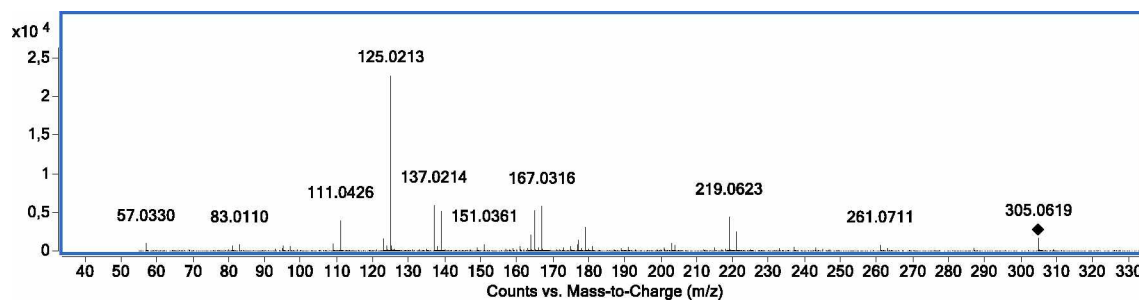
(-)-IES/EMEM do (epi)afz-(epi)cat-(epi)cat II (m/z 849.2044 $[M - H]^-$).



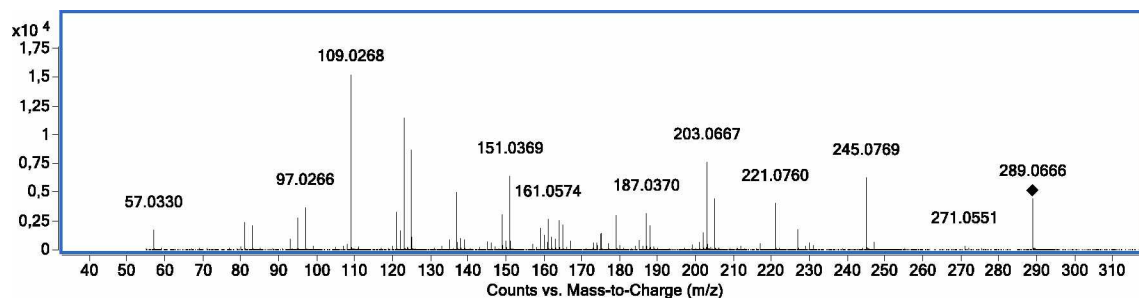
(-)-IES/EMEM do (epi)cat-(epi)cat-(epi)cat (m/z 865.1985 $[M - H]^-$).



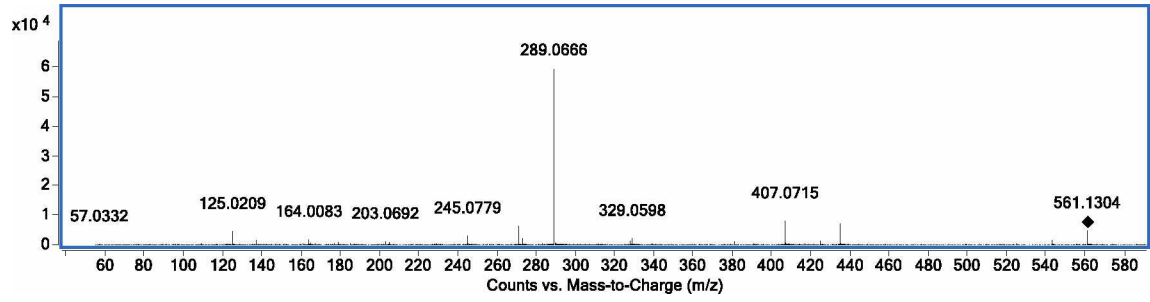
(-)-IES/EMEM do (epi)galocatequina (m/z 305.0670 $[M - H]^-$).



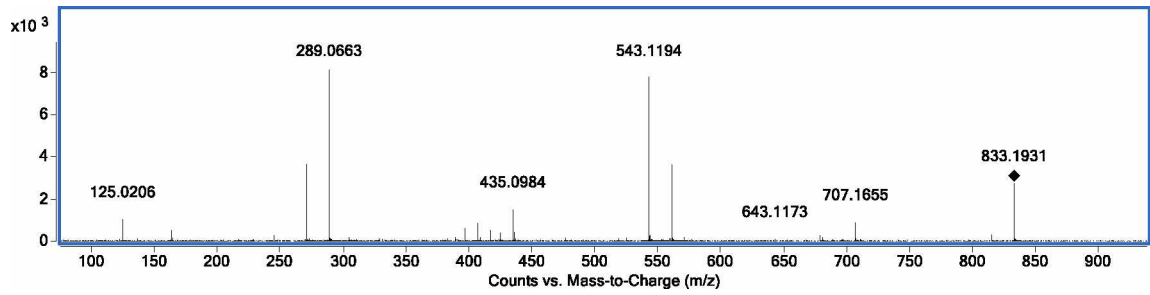
(-)-IES/EMEM do (epi)catequina (m/z 289.0719 $[M - H]^-$).



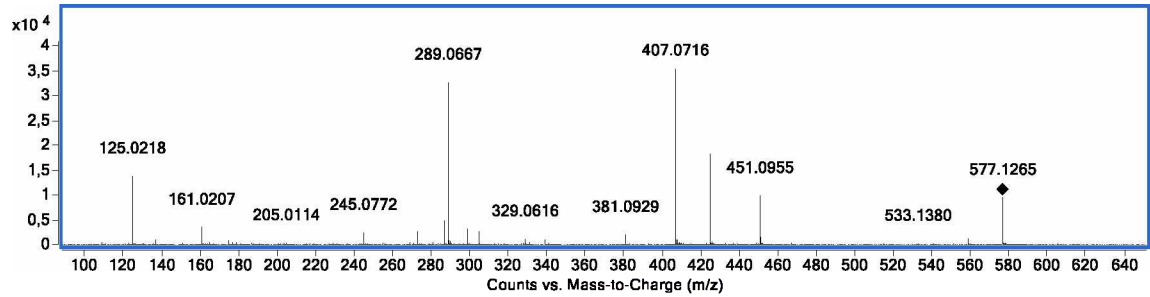
(-)-IES/EMEM do (epi)afz-(epi)cat (m/z 561.1410 $[M - H]^-$).



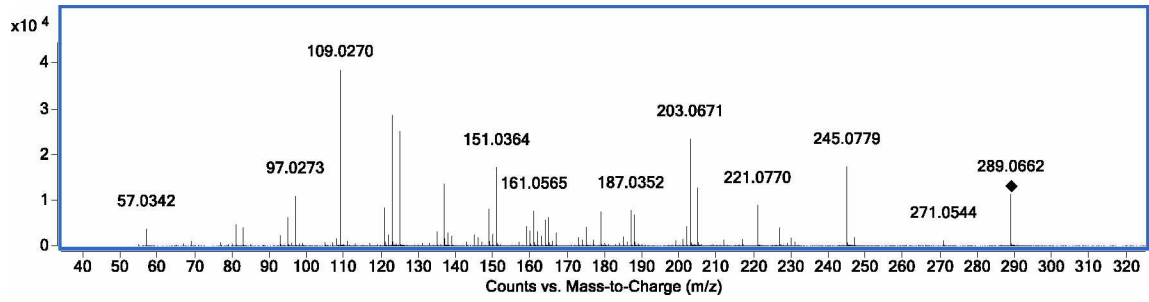
(-)-IES/EMEM do (epi)afz-(epi)afz-(epi)cat (m/z 833.2099 $[M - H]^-$).



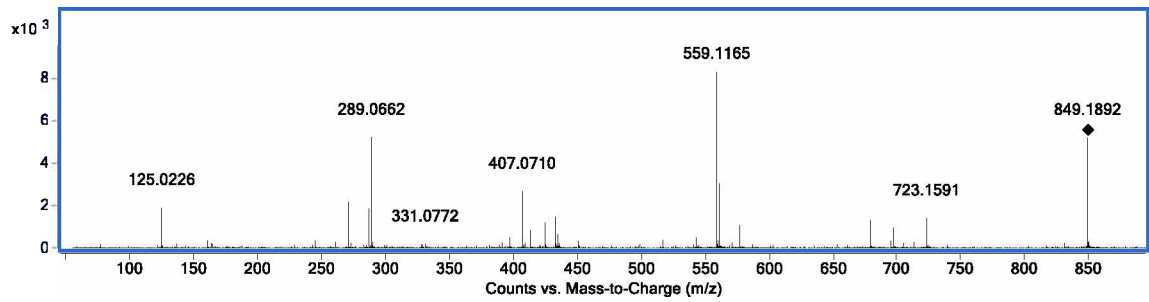
(-)-IES/EMEM do (epi)cat-(epi)cat (m/z 577.1363 $[M - H]^-$).



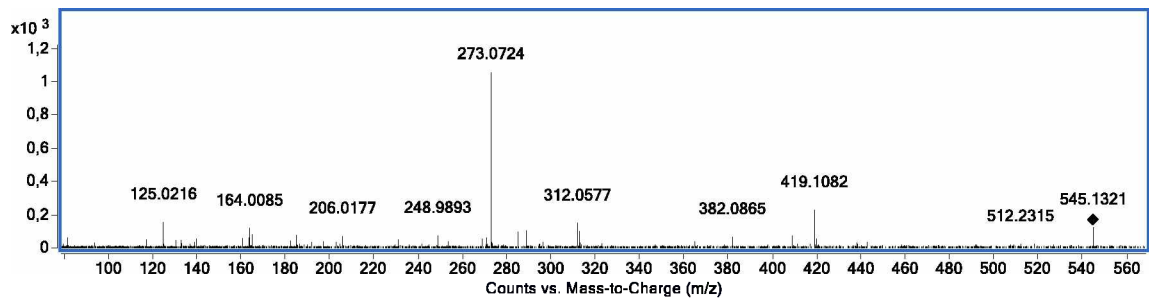
(-)-IES/EMEM do (epi)catequina (m/z 289.0723 $[M - H]^-$).



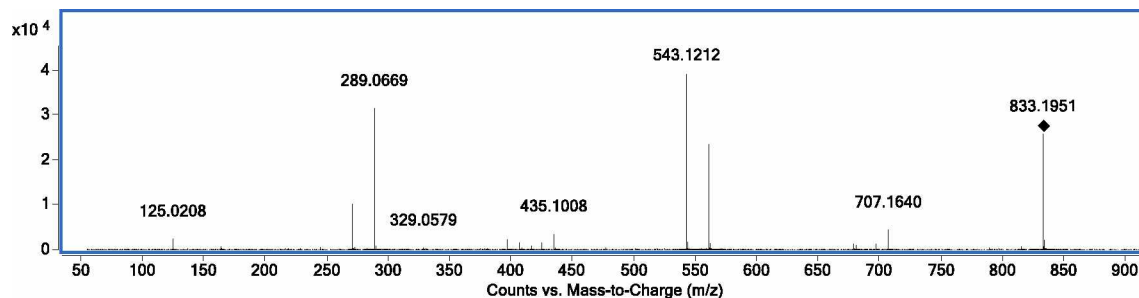
(-)-IES/EMEM do (epi)afz-(epi)cat-(epi)cat III (m/z 849.2044 $[M - H]^-$).



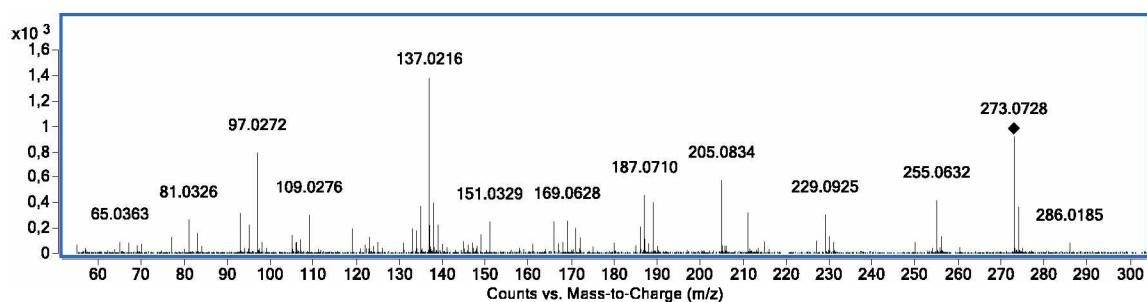
(-)-IES/EMEM do (epi)afz-(epi)afz (m/z 545.1477 $[M - H]^-$).



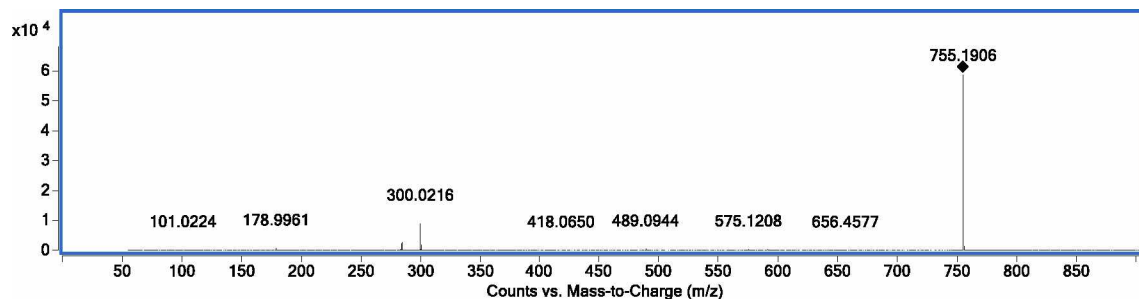
(-)-IES/EMEM do (epi)afz-(epi)afz-(epi)cat III (m/z 833.2081 $[M - H]^-$).



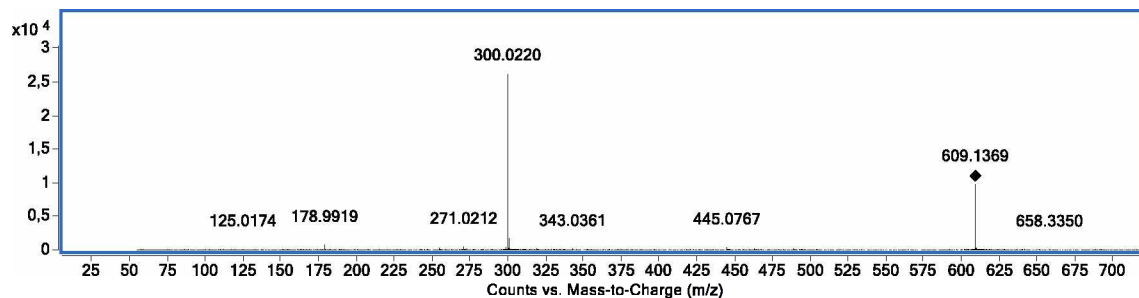
(-)-IES/EMEM do afzelequina (m/z 273.0772 $[M - H]^-$).



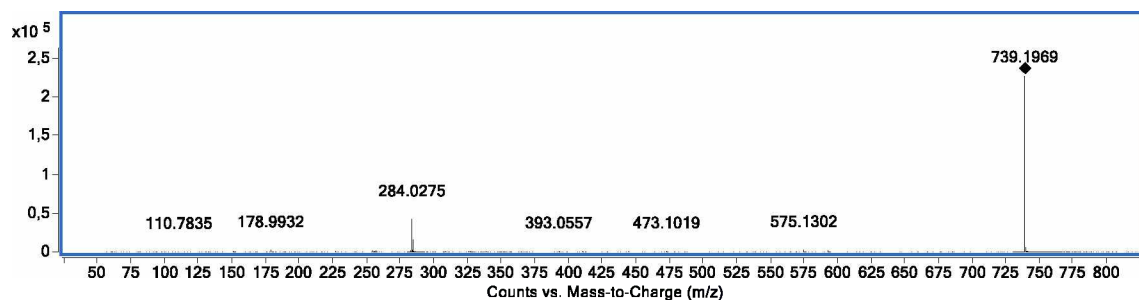
(-)-IES/EMEM da quercetina ramnosilrutinosideo (m/z 755.2034 $[M - H]^-$).



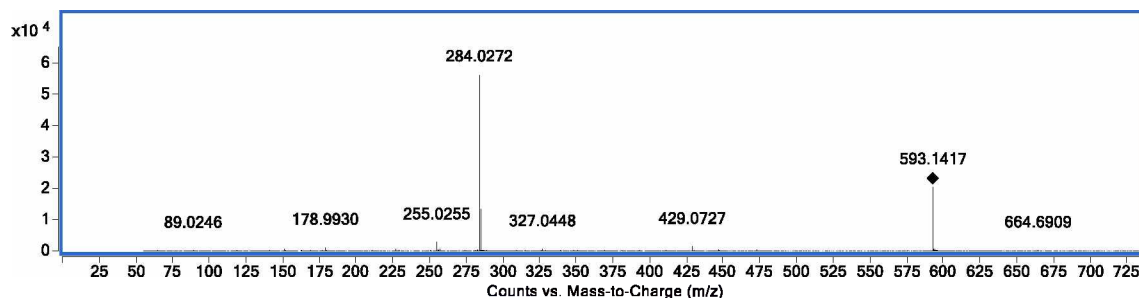
(-)IES/EMEM da quercetina-deoxihexosil-hexosideo I (m/z 609.1474 [M – H]⁻).



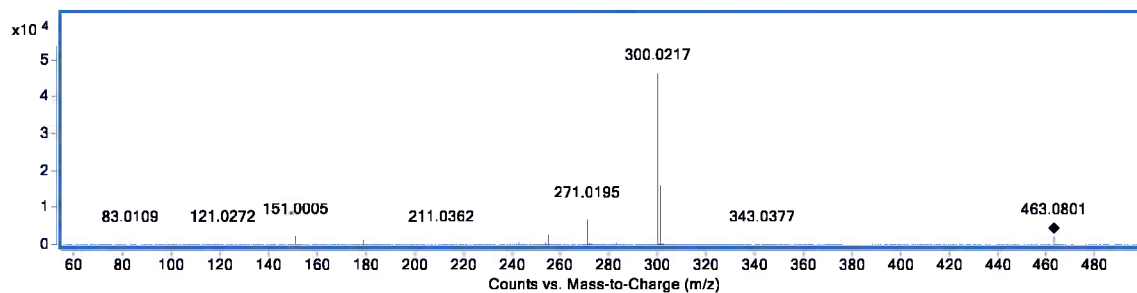
(-)IES/EMEM do kaempferol-3-O-(2,6-dirhamnosyl)-hexosideo (m/z 739.2094 [M – H]⁻).



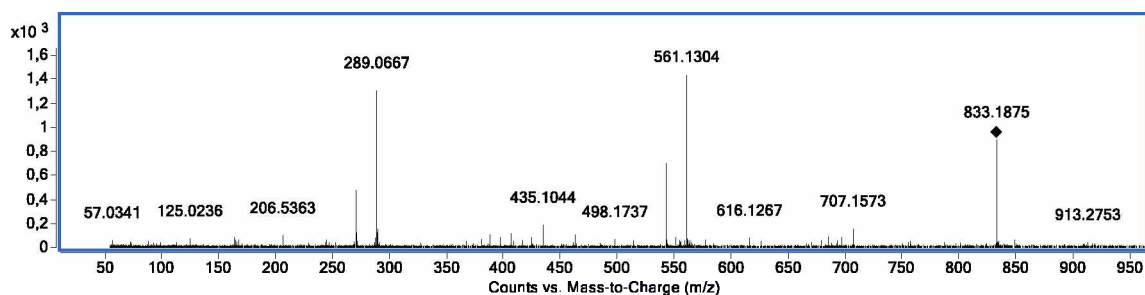
(-)IES/EMEM do kaempferol-3-O-robinosideo (m/z 593.1527 [M – H]⁻).



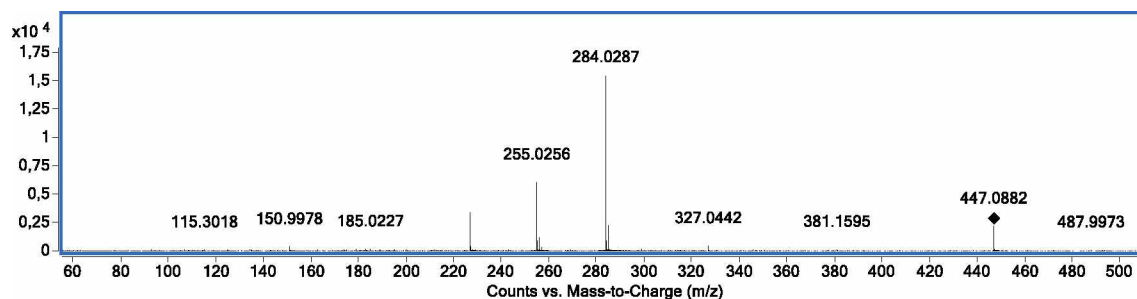
(-)-IES/EMEM da quercetina-hexosideo (m/z 463.0890 $[M - H]^-$).



(-)-IES/EMEM do (epi)afz-(epi)afz-(epi)cat IV (m/z 833.2083 $[M - H]^-$).



(-)-IES/EMEM do kaempferol hexosideo ou luteolina hexosideo (m/z 447.0949 $[M - H]^-$).



(-)-IES/EMEM do kaempferol-O-rhamnosideo-O-pentosideo (m/z 563.141 $[M - H]^-$).

