

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIADIPOGÊNICO DO  
EXTRATO ACETATO DE ETILA E PROANTOCIANIDINAS DO ARATICUM (*Annona  
crassiflora* Mart.) EM ADIPÓCITOS 3T3-L1

ARISSA DE OLIVEIRA SATO

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

UBERLÂNDIA – MG

FEVEREIRO – 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIADIPOGÊNICO DO  
EXTRATO ACETATO DE ETILA E PROANTOCIANIDINAS DO ARATICUM (*Annona  
crassiflora* Mart.) EM ADIPÓCITOS 3T3-L1

ARISSA DE OLIVEIRA SATO

DRA. FRANÇOISE VASCONCELOS BOTELHO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA – IBTEC

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

UBERLÂNDIA – MG

FEVEREIRO – 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIADIPOGÊNICO DO  
EXTRATO ACETATO DE ETILA E PROANTOCIANIDINAS DO ARATICUM (*Annona  
crassiflora* Mart.) EM ADIPÓCITOS 3T3-L1

ARISSA DE OLIVEIRA SATO

DRA. FRANÇOISE VASCONCELOS BOTELHO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA – IBTEC

Homologado pela Coordenação do  
Curso de Biotecnologia em  
\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

DR. NILSON NICOLAU JÚNIOR

UBERLÂNDIA – MG

FEVEREIRO – 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

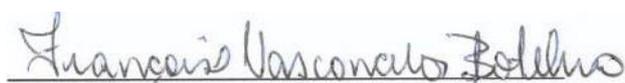
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIADIPOGÊNICO DO  
EXTRATO ACETATO DE ETILA E PROANTOCIANIDINAS DO ARATICUM (*Annona  
crassiflora* Mart.) EM ADIPÓCITOS 3T3-L1

ARISSA DE OLIVEIRA SATO

Aprovado pela Banca Examinadora em: **03/02/2023** Nota: **100**



Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

Uberlândia, 03 de fevereiro de 2023

## AGRADECIMENTOS

As finalizações de etapas da vida são um marco àqueles que prezam por ela. Finalizar a conclusão de um curso superior envolve pessoas e diversos momentos e emoções vivenciados durante o período acadêmico. Relembrá-los é recordar de toda a trajetória de vida e daqueles que compartilharam dela comigo. Sou grata primeiramente à Vida por cada oportunidade e aprendizado concedidos e por colocar em meu caminho pessoas que agregaram tanto à minha jornada. Agradeço a todos os indivíduos que de alguma forma se fizeram presente e contribuíram para minha evolução pessoal.

Sou imensamente grata à minha família pelo carinho e zelo, especialmente à minha mãe, Adriana, e ao meu pai, Marcelo, por me apoiarem, incentivarem e darem bagagem para minha jornada. Serei sempre muito grata aos meus tios César e Patrícia que sempre me forneceram apoio e incentivo necessários para a conclusão deste momento, além de serem grandes referências para mim. Agradeço às minhas amigas são gotardenses pelo companheirismo e afeto, em especial a Sayuri, Camila, Ana Clara e Lara. Agradeço às amigadas que fiz durante o curso, Alice, Ana Paula, Dhara, Isabela, Nicole, Larissa, Ludmilla e Sofia, as quais carrego para além do meio acadêmico, por compartilharem de momentos de desesperos comuns e por proporcionarem alegrias durante esses 5 anos. Agradeço à família do Heitor, Izabel, Edison, Camila e Jacqueline, por me acolheram de forma tão carinhosa e por todo apoio que me proporcionaram nos últimos 3 anos. Por fim, agradeço ao Heitor pelo apoio e ajuda diários, por compartilhar a vida e os objetivos futuros comigo.

Agradeço ao Laboratório de Biofármacos do Instituto Butantan que me proporcionou entender como é a área da pesquisa, principalmente à minha supervisora de estágio, Dra. Sonia Andrade, e aos butan-amigos que me proporcionaram risos e reflexões diários. Agradeço a todos os colaboradores do Laboratório de Nanotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia e a Prof. Dra. Françoise Botelho que me auxiliaram na conclusão deste projeto.

Dedico esta realização aos meus queridos avós, Hitomi, Koji e Salvador, que ocupam um lugar especial em minhas lembranças.

A todos, meus agradecimentos.

## RESUMO

A obesidade é uma preocupação de saúde pública mundial, uma vez que seu crescimento exponencial ilustra sua característica pandêmica. Esse distúrbio metabólico resulta do aumento do tamanho e número de adipócitos e pode favorecer o desenvolvimento de distúrbios metabólicos como a *diabetes mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares e osteoporose. Na obesidade, há uma estreita relação entre condição de peso excessivo e estresse oxidativo, em que os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) aumentam expressivamente. Estudos apontam que o estresse oxidativo contribui para a intensificação da adipogênese ao aumentar a ativação e expressão de proteínas adipogênicas. Neste sentido, a aplicação de compostos antioxidantes na terapêutica da obesidade é interessante para um efeito antiobesidade. Sabe-se que as frações acetato de etila e proantocianidinas da casca do fruto araticum (*Annona crassiflora* Mart.) possui atividade antioxidante. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos das frações do extrato da casca do araticum em células 3T3-L1 e a possível atividade antiadipogênica por meio do estudo da capacidade antioxidante dos tratamentos e de métodos de coloração dos lipídios intracelulares (*Oil Red O* e Vermelho Nilo). Os tratamentos foram realizados em diferentes concentrações (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 µg/mL), porém, não foi possível confirmar se apresentam atividade inibitória da adipogênese, uma vez que não houve indução adipogênica dos pré-adipócitos 3T3-L1. Além disso, é inviável relacionar a produção de EROs com a adipogênese. Entretanto, é possível inferir que as frações acetato de etila e proantocianidinas do araticum possuem atividade antioxidante.

**Palavras-chave:** Adipogênese, antioxidantes, estresse oxidativo, obesidade, araticum.

## LISTA DE ABREVIATURAS

C/EBPs: proteínas de ligação ao intensificador CCAAT

CAT: catalase

C/EBP- $\alpha$ : isoforma alfa da proteína de ligação ao intensificador CCAAT

C/EBP- $\beta$ : isoforma beta da proteína de ligação ao intensificador CCAAT

C/EBP- $\gamma$ : isoforma delta da proteína de ligação ao intensificador CCAAT

DEX: dexametasona

EROs: espécies reativas de oxigênio

FAE: fração acetato de etila do extrato da casca do araticum

FP: fração proantocianidinas do extrato da casca do araticum

GSH-Px: glutathiona peroxidase

IBMX: isobutilmetilxantina

MDI: meio de indução

NOX: enzimas NADPH oxidases

ORO: *Oil Red O*

PPAR- $\gamma$ : receptor gama ativado por peroxissomas

SFB: soro fetal bovino

SOD: superóxido dismutase

TAB: tecido adiposo branco

VN: vermelho Nilo

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Obesidade .....	10
1.2 Tecido adiposo .....	11
1.3 Adipogênese .....	13
1.4 Fatores transcricionais da adipogênese .....	14
1.5 3T3-L1: linhagem de pré-adipócitos murina.....	15
1.5 EROs e estresse oxidativo .....	17
1.6 Propriedades antioxidante e antiobesogênico de compostos bioativos.....	19
1.7 <i>Annona crassiflora</i> Mart. (Araticum ou marolo) .....	20
2. OBJETIVO GERAL.....	21
2.1 Objetivos específicos .....	21
3. METODOLOGIA.....	22
3.1 Obtenção da fração acetato de etila e proantocianidinas de folhas de <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	22
3.2 Obtenção e manutenção das células 3T3-L1 .....	22
3.3 Ensaio de citotoxicidade do extrato acetato de etila e fração de protoantocianidinas do araticum em adipócitos 3T3-L1 .....	22
3.4 Avaliação do extrato acetato de etila e da fração de proantocianidinas do araticum na diferenciação adipogênica de adipócitos 3T3-L1 .....	23
3.5 Verificação da diferenciação adipogênica:.....	24
3.5.1 Ensaio de quantificação lipídica com <i>Oil Red O</i> .....	24
3.5.2 Ensaio de quantificação lipídica com Vermelho Nilo .....	24
3.6. Medida das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) intracelulares .....	25
3.7 Análise estatística .....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
4.1 Viabilidade celular .....	25
4.2 Capacidade de diferenciação dos adipócitos .....	28

4.3	Efeito antiadipogênico: Coloração de <i>Oil Red O</i> e Vermelho Nilo .....	31
4.4	Avaliação das frações acetato de etila e proantocianidinas da casca do araticum nas espécies reativas de oxigênio .....	34
5.	CONCLUSÃO.....	37
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade

Nas últimas três décadas, a obesidade ganhou destaque na agenda pública internacional devido à sua proporção global e crescente prevalência (DIAS *et al.*, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) o sobrepeso e a obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que podem prejudicar a saúde. Além disso, é definida como um distúrbio crônico complexo e multifatorial (LEAL; MAFRA, 2013; MECHANICK *et al.*, 2012) que envolve complexas interações entre fatores genéticos, metabólicos, comportamentais, ambientais (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019; QASIM *et al.*, 2017) e contextos socioeconômico, político e cultural (WANDERLEY; FERREIRA, 2010).

A causa fundamental do sobrepeso e da obesidade, segundo a OMS, é o desequilíbrio energético entre calorias consumidas e gastas (Organização Mundial da Saúde, 2022). Esse comportamento advém do aumento da ingestão de alimentos ricos em gorduras e açúcares aliada à crescente inatividade física devido à prevalência do sedentarismo das novas formas de trabalho, à mudança dos modos de transporte e ao aumento da urbanização (Organização Mundial da Saúde, 2022).

O excesso de peso está relacionado ao aumento de risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como *diabetes mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, doenças musculoesqueléticas, doença de Alzheimer, depressão, osteoporose e alguns tipos de cânceres (BLÜHER, 2019; DE SOUZA, 2010; DIAS *et al.*, 2017). Estudos de Chooi *et al.*, (2019) apontam que a ocorrência de casos de obesidade aumentou em adultos e crianças de todas as idades indiscriminadamente por região geográfica, etnia ou *status* econômico.

No Brasil, o Ministério da Saúde via Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) divulgou estimativas de indicadores para o ano de 2021 apontando a frequência de adultos com excesso de peso e obesidade nas 26 cidades capitais do país e no Distrito Federal (Vigitel Brasil, 2021). Os resultados do monitoramento apontam que, em 2021, aproximadamente 57,2% da população se classificava nos padrões de sobrepeso e 22,4% eram obesos (Vigitel Brasil, 2021). Comparando aos dados divulgados em 2020, em que 57,5% e 21,5% da população estava sobrepeso e obeso, respectivamente (Vigitel Brasil, 2020), nota-se o aumento na frequência de indivíduos obesos no Brasil.

## 1.2 Tecido adiposo

O tecido adiposo é um órgão dinâmico que exerce papel fundamental em processos fisiológicos importantes (SARJEANT; STEPHENS, 2012) como a sensibilidade à insulina, a homeostase energética, as respostas inflamatórias, o apetite, a angiogênese, a pressão sanguínea e as funções reprodutivas a partir da secreção de fatores controladores mediada por células denominadas adipócitos (LEFTEROVA; LAZAR, 2009). Além disso, o tecido adiposo medeia numerosos processos patológicos (ALI *et al.*, 2013), o qual se inclui a obesidade.

O tecido adiposo é constituído por dois tipos que se distinguem em suas origens, funções e morfologia (KURYŁOWICZ; PUZIANOWSKA-KUŹNICKA, 2020). O tecido adiposo branco (TAB), tipo predominante em humanos adultos, armazena o excesso de energia em forma de triglicérides (LEE *et al.*, 2019) e mobiliza-os em situações de privação alimentar, fornecendo combustível metabólico de longo prazo por meio da lipólise e da liberação de ácidos graxos (LEE *et al.*, 2019).

Além disso, o TAB exerce funções hormonais, sendo considerado um órgão endócrino, e está relacionado às funções imunes (CHENG *et al.*, 2021). Este órgão se encontra distribuído no corpo e é dividido em depósitos visceral, ao redor dos órgãos, e subcutâneo, abaixo da pele (BARGUT *et al.*, 2017; PARK, 2014). Os adipócitos brancos (**Figura 1**) apresentam forma esférica em que uma gota lipídica ocupa o citoplasma, comprimindo o núcleo celular entre a gordura e a membrana plasmática (SARJEANT; STEPHENS, 2012) com poucas mitocôndrias (BARGUT *et al.*, 2017; FRIGOLET; GUTIÉRREZ-AGUILAR, 2020).

Já o tecido adiposo marrom (TAM) é responsável por gerar calor por meio da termogênese (LEE *et al.*, 2019), utilizando a glicose e/ou os ácidos graxos para dissipar energia, constituindo-se em um órgão fundamental para regular o metabolismo desses nutrientes (SINGH *et al.*, 2018). O TAM é bem desenvolvido em bebês e crianças, sendo caracterizado como tecido adiposo marrom constitutivo (cTAM) (KURYŁOWICZ; PUZIANOWSKA-KUŹNICKA, 2020) e, em adultos, encontra-se nas regiões cervical, supraclavicular, paravertebral, mediastinal e perirenal, em menores proporções comparadas às crianças (PARK, 2014).

Os adipócitos marrons possuem forma elipsóide com o núcleo centralizado no citoplasma e as outras organelas clássicas são presentes (**Figura 1**) (SARJEANT; STEPHENS, 2012). As mitocôndrias se encontram abundantemente distribuídas pelo citoplasma e suas cristas expressam a proteína desacopladora 1 (UCP-1) (SARJEANT; STEPHENS, 2012). Essa proteína, denominada de termogenina, é responsável pelo desacoplamento do transporte de

elétrons da produção de energia química na forma de adenosina trifosfato (ATP), resultando na alteração do balanço de elétrons e prótons na membrana mitocondrial dissipando energia por meio do calor (KURYŁOWICZ; PUZIANOWSKA-KUŹNICKA, 2020).

Além dos adipócitos branco e marrom, existe um terceiro tipo, os adipócitos bege, que se desenvolvem a partir de estímulos, como exposição ao frio e exercício físico (BARGUT *et al.*, 2017; CHENG *et al.*, 2021; KURYŁOWICZ; PUZIANOWSKA-KUŹNICKA, 2020; VITALI *et al.*, 2012). Essas células constituem o tecido adiposo bege, intermediário entre TAB e TAM, as quais são definidas de bege, pois derivam de precursores de adipócitos brancos e se encontram em aglomerados espalhados dentro do TAB (BARGUT *et al.*, 2017; KAISANLAHTI; GLUMOFF, 2019). Porém, expressam o fenótipo de adipócitos marrons sob estimulação adquirida, contribuindo para o gasto energético corporal, expressando maior quantidade de mitocôndrias, comparado aos adipócitos brancos, e, conseqüentemente, a proteína UCP-1 (**Figura 1**) (BARGUT *et al.*, 2017; KAISANLAHTI; GLUMOFF, 2019).

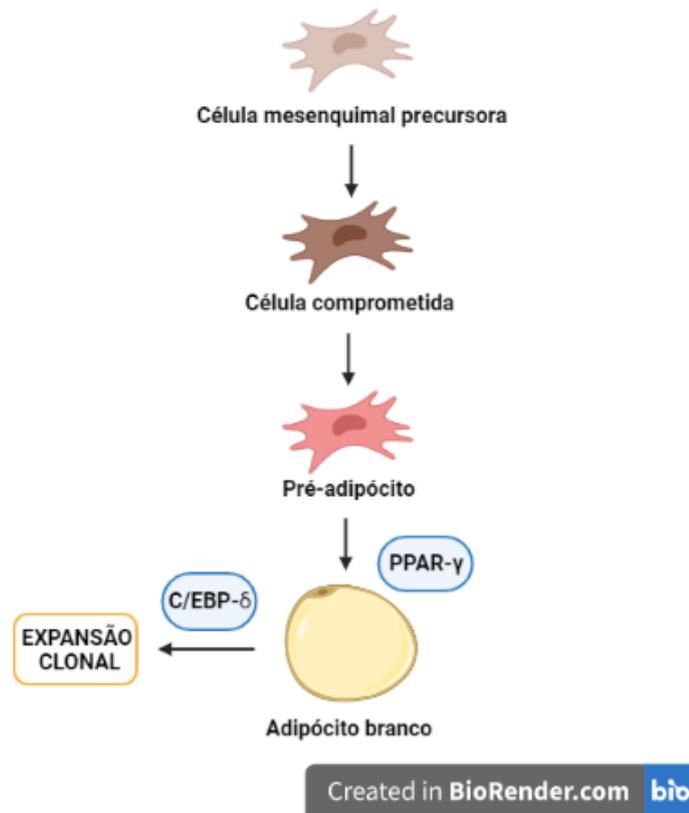


**Figura 1:** Representação morfológica dos tipos de adipócitos. O adipócito branco é constituído por uma larga gota lipídica que ocupa o citoplasma celular comprimindo o núcleo entre citoplasma e membrana plasmática, apresenta forma esférica e contém poucas mitocôndrias. O adipócito marrom tem forma elipsóide e apresenta várias gotículas de lipídios dispersas pelo citoplasma celular e muitas mitocôndrias. O adipócito bege tem morfologia similar à dos adipócitos marrom, porém com menor quantidade de mitocôndrias dispersas. **Legenda:** em amarelo – gotículas de lipídios armazenadas nos adipócitos; em marrom – núcleo celular; e em vermelho – mitocôndrias. **Fonte:** Elaborado pela autora.

### 1.3 Adipogênese

A adipogênese, no tecido branco, consiste no processo de diferenciação celular e maturação do adipócito em que células mesenquimais se diferenciam a pré-adipócito que, posteriormente, originam os adipócitos preenchidos por lipídio (ALI *et al.*, 2013). A adipogênese ocorre em um processo de seis estágios definidos: precursores mesenquimais, pré-adipócitos comprometidos, pré-adipócitos com parada de crescimento, expansão clonal mitótica, diferenciação terminal e maturação de adipócitos, que são regulados por fatores estimulantes, como o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR- $\gamma$ ) e as proteínas de ligação ao intensificador CCAAT (C/EBPs) (**Figura 2**) (ALI *et al.*, 2013).

As células troncos mesenquimais precursoras se proliferam e são submetidas ao processo de determinação que resulta na especificidade do tipo celular (LEFTEROVA; LAZAR, 2009). Essas células comprometidas dão origem aos fibroblastos semelhantes a pré-adipócitos, determinados à diferenciação em linhagens de adipócitos, que se proliferam (LEFTEROVA; LAZAR, 2009). Posteriormente, as células param de crescer e expandem por mitose clonal induzida por hormônios estimulantes (LEFTEROVA; LAZAR, 2009). Por fim, a diferenciação terminal, mediada pela expressão dos fatores transcricionais PPAR- $\gamma$  e C/EBPs, ativa a cascata transcricional dos genes envolvidos na adipogênese induzindo a maturação dos adipócitos que acumularão gotas de lipídios em seu interior (**Figura 2**) (LEFTEROVA; LAZAR, 2009).



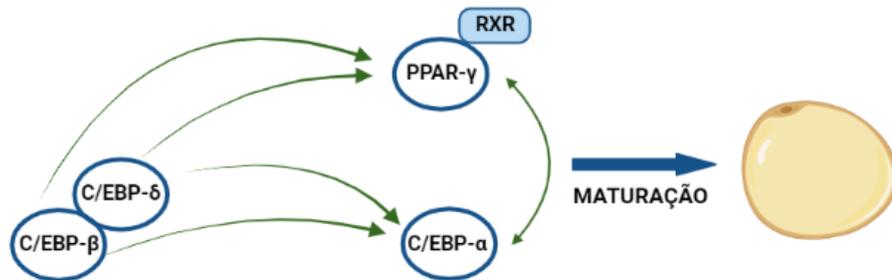
**Figura 2:** Representação simplificada da adipogênese. **Legenda:** C/EBP- $\delta$ : proteína de ligação ao intensificador CCAAT delta, PPAR- $\gamma$ : receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma. **Fonte:** Elaborado pela autora.

#### 1.4 Fatores transcricionais da adipogênese

Durante a diferenciação de adipócitos, ocorrem interações entre C/EBPs e PPAR- $\gamma$  (LEFTEROVA; LAZAR, 2009). Estudos apontam que a indução de PPAR- $\gamma$  é necessária e suficiente para a diferenciação dos adipócitos do TAB (FARMER, 2006). Ademais, evidências apontam que as C/EBPs regulam diretamente a diferenciação dos adipócitos em cooperação ativa com o PPAR- $\gamma$  (ALI *et al.*, 2013). Enquanto o PPAR- $\gamma$  controla a diferenciação terminal dos adipócitos, a C/EBP- $\alpha$  atua em conjunto a fim de estabilizar os fenótipos de adipócitos maduro (LEE *et al.*, 2019).

A adipogênese é controlada por uma cascata transcricional iniciada a partir da abertura da cromatina induzida pela C/EBP- $\beta$ , a qual é expressa no estágio inicial da cultura adipogênica e junto a C/EBP- $\delta$  induz a expressão dos fatores C/EBP- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  (LEE *et al.*, 2019). O PPAR- $\gamma$  se heterodimeriza com o ácido retinóico (RXR) e regula a adipogênese ao interagir com os genes envolvidos no processo (ALI *et al.*, 2013; LEE; GE, 2014). Estes fatores estimulam um

ao outro induzindo a maturação do adipócito branco e o acúmulo de lipídios no seu vacúolo unilocular (**Figura 3**) (LEE; GE, 2014).



Created in BioRender.com 

**Figura 3:** Esquema simplificado da cascata transcricional da adipogênese, evidenciando os fatores transcricionais de maior relevância. **Legenda:** C/EBP- $\alpha$ : proteína de ligação ao intensificador CCAAT alfa, C/EBP- $\beta$ : proteína de ligação ao intensificador CCAAT beta, C/EBP- $\delta$ : proteína de ligação ao intensificador CCAAT delta; PPAR- $\gamma$ : receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma, RXR: ácido retinóico. **Fonte:** Elaborado pela autora.

### 1.5 3T3-L1: linhagem de pré-adipócitos murina

Experimentos com a linhagem celular murina 3T3-L1 são comumente utilizados (FORBES-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; JANSON *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2021; QI *et al.*, 2015; REBOLLO-HERNANZ *et al.*, 2019). Esta linhagem é derivada de células fibroblásticas 3T3 estabelecida a partir de células embrionárias de camundongos suíços em 1963 por Torado e Green (TODARO; GREEN, 1963). Em 1974, Green e Meuth determinaram que a linhagem 3T3-L1 correspondia a uma linhagem celular pré-adipocitária com capacidade de se diferenciar a adipócitos por meio da exposição à bromodeoxiuridina (GREEN; MEUTH, 1974a).

A diferenciação de fibroblastos murinos 3T3-L1 multipotenciais em pré-adipócitos preenchidos com lipídios é um dos modelos *in vitro* mais usados no estudo biológico dos adipócitos humanos (GREEN; MEUTH, 1974b; MORRISON; MCGEE, 2015) devido às semelhanças na via adipogênica entre os dois tipos celulares (POULOS; DODSON; HAUSMAN, 2010). Dessa forma, essa linhagem embrionária fornece um excelente veículo

para testes piloto de agentes que podem modificar o acúmulo intracelular de lipídios ou para avaliar os mecanismos subcelulares envolvidos no controle da adipogênese (ALI *et al.*, 2006).

Os pré adipócitos 3T3-L1 confluentes podem se diferenciar sincronizadamente a adipócitos maduros com o uso de um coquetel adipogênico. A diferenciação máxima é alcançada quando há a combinação de insulina, um glicocorticoide, um agente que aumente os níveis de adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPC) intracelular e soro fetal bovino. (NTAMBI; YOUNG-CHEUL, 2000). Desde os estudos de Green e Meuth (1974) o processo de diferenciação tem sido aprimorado (RUBIN *et al.*, 1978; RUSSELL; HO, 1976). O coquetel de indução de adipogênese usualmente é composto pela combinação de dexametasona (DEX), 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX), insulina (GREEN; MEUTH, 1974b; RUBIN *et al.*, 1978; RUSSELL; HO, 1976) e indometacina (STYNER *et al.*, 2010).

A DEX é um agonista glicocorticoide sintético que induz a expressão da C/EBP- $\delta$  e estimula a via do receptor de glicocorticoide (CAO; UMEK; MCKNIGHT, 1991; NTAMBI; YOUNG-CHEUL, 2000). O IBMX, um inibidor de fosfodiesterase, estimula a via da proteína quinase dependente de AMPc (NTAMBI; YOUNG-CHEUL, 2000) e induz atividade da C/EBP- $\beta$  (CAO; UMEK; MCKNIGHT, 1991). As isoformas  $\delta$  e  $\beta$  de C/EBP se heterodimerizam, resultando na ativação de C/EBP- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$ , iniciando a adipogênese (**Figura 3**) (SUN *et al.*, 2003).

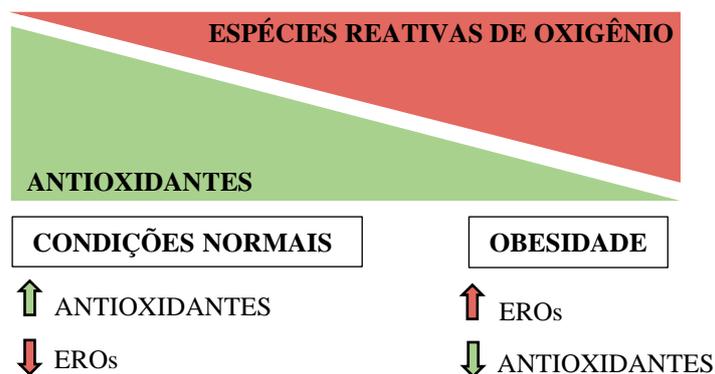
A insulina é considerada o principal hormônio regulador da adipogênese (GREEN; KEHINDE, 1975). Estudos de Green e Kehinde (1975) comprovam que células 3T3-L1 cultivadas com concentrações de 1  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram maior conteúdo lipídico intracelular quando comparada às células cultivadas sem insulina. Esse resultado advém da capacidade de a insulina aumentar a captação de glicose do meio de cultivo das células (GREEN; KEHINDE, 1975). O estudo também afirma que a insulina apresenta atividade mitogênica, sendo um fator chave para a adipogênese (GREEN; KEHINDE, 1975). Além desses indutores, utiliza-se a indometacina, um anti-inflamatório não esteróide (NALAMACHU; WORTMANN, 2014), a qual promove a adipogênese ao aumentar a atividade da C/EBP- $\beta$  (OVERBY *et al.*, 2020; STYNER *et al.*, 2010).

## 1.5 EROs e estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são bioprodutos de processos metabólicos produzidas principalmente pela cadeia transportadora de elétrons que ocorre nas mitocôndrias e pela ação das enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases (NOX) (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA *et al.*, 2019). Essas moléculas podem ser definidas como radicais livres altamente reativos que podem provocar danos a componentes celulares (HALLIWELL, 2006; PÉREZ-TORRES *et al.*, 2021). As EROs são divididas em radicais reativos de oxigênio, como o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) e peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ), e não radicais como ácido hipocloroso (HClO), ozônio ( $O_3$ ) e peróxido de oxigênio ( $H_2O_2$ ) (CHO; SEO; KIM, 2011).

A fim de compensar a geração de espécies reativas de oxigênio, o organismo humano sintetiza componentes antioxidantes dos quais se destacam a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) (PÉREZ-TORRES *et al.*, 2021). Essas moléculas são capazes de neutralizar a ação das EROs por meio da catálise de diversas reações redox (WANG e HAI, 2015). O  $H_2O_2$  é um produto de diversas reações biológicas gerado pela dismutação do radical ânion superóxido por meio da atividade catalítica da enzima SOD (QUINLAN *et al.*, 2012). A enzima CAT promove a conversão de  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular (VALKO *et al.*, 2006), assim como a isoforma GSH-Px1, que pertence à família de enzimas GSH-Px, prevenindo o dano celular que pode ser ocasionado pelo acúmulo da ERO (FISHER, 2011). A GSH-Px1 também pode reduzir os peróxidos de hidrogênio lipídicos e reduzir a peroxidação lipídica (FISHER, 2011), podendo ser encontrada no citoplasma celular e nas mitocôndrias de mamíferos (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011).

Embora as EROs apresentem papel fundamental em processos celulares fisiológicos, nos quais se incluem defesa imunomediada contra microrganismos patogênicos e sinalização intracelular, o desbalanço de EROs e a sua produção excessiva convergem ao estresse oxidativo (SAREILA *et al.*, 2011). Assim, níveis elevados de EROs podem danificar DNA, lipídios e proteínas, causando injúria tecidual e morte celular (SAVINI *et al.*, 2013; ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA *et al.*, 2019). O estresse oxidativo consiste no distúrbio do equilíbrio de produção de EROs e interfere na síntese de defesas antioxidantes natural do organismo (MASSCHELIN *et al.*, 2020; SAVINI *et al.*, 2013). Neste sentido, a redução da defesa antioxidante no organismo induz ao aumento de espécies reativas de oxigênio, visto que estas não serão metabolizadas, caracterizando-se o estresse oxidativo (**Figura 4**).



**Figura 4:** Balanço Redox – Em condições normais, os níveis de antioxidantes endógenos são capazes de inibir as espécies reativas de oxigênio originadas dos processos biológicos, impedindo o acúmulo de EROs. Na obesidade, o desbalanço redox advém da redução da atividade dos antioxidantes e aumento da quantidade de EROs. **Legenda:** EROs: espécies reativas de oxigênio; em verde, são representados os antioxidantes; em vermelho, são representados as EROs. **Fonte:** Elaborado pela autora.

A relação do estresse oxidativo e da obesidade consiste no desbalanço redox causado pela hipertrofia do tecido adiposo que induz a disfunção mitocondrial, a redução da produção de substâncias endógenas antioxidantes e o aumento da geração de citocinas pro-inflamatórias (BRYAN *et al.*, 2013; MASSCHELIN *et al.*, 2020; MIR *et al.*, 2019; TORMOS *et al.*, 2011). Essas condições favorecem o aumento de EROs e o estresse oxidativo, devido à oxidação de ácidos graxos na mitocôndria e nos peroxissomos (BRYAN *et al.*, 2013; MASSCHELIN *et al.*, 2020; MIR *et al.*, 2019; TORMOS *et al.*, 2011).

A produção de EROs nas mitocôndrias humanas de células tronco mesenquimais, por exemplo, é um fator promotor da diferenciação dos pré-adipócitos a adipócitos (ALFADDA; SALLAM, 2012; CARRIÈRE *et al.*, 2003; DE MELLO *et al.*, 2018; FERNANDO *et al.*, 2020). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* apontam a relação do estresse oxidativo na patogênese da obesidade, indicando um aumento na proliferação e diferenciação de pré-adipócitos (adipogênese) e no tamanho dos adipócitos maduros (LEE *et al.*, 2009; SAVINI *et al.*, 2013). Essa regulação na adipogênese ocorre devido ao envolvimento das EROs nas regulações positivas dos fatores de transcrição adipogênicos (LEE *et al.*, 2009).

## 1.6 Propriedades antioxidante e antiobesogênico de compostos bioativos

As estratégias terapêuticas para a obesidade se baseiam na restrição de ingestão de alimentos gordurosos e açucarados aliado a exercícios físicos (NABAVI *et al.*, 2015). Porém, devido ao caráter multifatorial da obesidade, há interesse em explorar compostos bioativos de plantas, esperando-se desenvolver uma nova abordagem protetora e terapêutica para o manejo da obesidade (NABAVI *et al.*, 2015). Os produtos naturais são utilizados como importantes ferramentas nos procedimentos de terapias naturais, objetivando a busca por alívio e cura de doenças comumente por meio do uso de ervas (MUKHERJEE *et al.*, 2010; MACHADO; JÚNIOR, 2011). Neste contexto, a ascensão da aplicação de produtos naturais em diversas áreas como na indústria alimentícia ou no tratamento de doenças direcionou atenção para os possíveis benefícios do uso de componentes bioativos na área da saúde (MACHADO; JÚNIOR, 2011).

Os compostos bioativos de plantas podem ser produtos naturais biologicamente ativos que exercem efeitos benéficos para a saúde (BIESALSKI *et al.*, 2009). Diversos estudos exploram a aplicação de produtos naturais com ações antioxidantes no tratamento de patologias associadas ao estresse oxidativo, incluindo a obesidade, devido à sua capacidade de neutralizar os efeitos deletérios do excesso de radicais livres (MOZAFFARIAN, 2016). Dessa forma, compostos bioativos como os polifenóis, subgrupo pertencente aos grupo de compostos fenólicos, são considerados agentes protetores que podem reduzir o estado inflamatório oxidativo associado ao ganho de peso (MIR *et al.*, 2019).

Os polifenóis possuem propriedades antioxidantes e efeitos antiobesogênicos relacionados à captação de radicais livres (HAN; SHEN; LOU, 2007; TUNGMUNNITHUM *et al.*, 2018), incluindo a neutralização de EROs (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA *et al.*, 2019). Além disso, ao sequestrar os radicais livres, os polifenóis aumentam a atividade e a expressão de enzimas neutralizadoras de EROs, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, e inibem as enzimas produtoras de EROs, como as NOX (HAN; SHEN; LOU, 2007; SAVINI *et al.*, 2013).

Ademais, esses compostos bioativos controlam a diferenciação de adipócitos e o metabolismo de lipídios, reduzindo a atividade de lipases pancreáticas e a permeabilidade intestinal, reduzem a disfunção mitocondrial e estimulam a biogênese de mitocôndrias ao induzir a via de ativação do coativador 1 alfa do receptor gama ativado por peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ) mediada por desacetilação (BARET *et al.*, 2013; BOLCA; VAN DE WIELE; POSSEMIERS, 2013; DE LA GARZA *et al.*, 2011).

### 1.7 *Annona crassiflora* Mart. (Araticum ou marolo)

A partir do estudo e do conhecimento dos potenciais dos compostos ativos naturais presentes nas plantas, diversas pesquisas têm sido realizadas a fim de encontrar vias alternativas para o tratamento de distúrbios metabólicos, incluindo para a obesidade (PÉREZ-TORRES *et al.*, 2021; TUNGMUNNITHUM *et al.*, 2018). O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, ocupando aproximadamente 25% do território nacional (EMBRAPA CERRADOS, 2005). Esse bioma é considerado um *hotspot* de biodiversidade devido à sua variedade de espécies endêmicas, muitas ainda inexploradas (MYERS *et al.*, 2000). Neste sentido, estudos envolvendo plantas do Cerrado são importantes e necessários a fim de valorizar as riquezas desse bioma, bem como estimular a sua preservação (PRADO *et al.*, 2020).

Muitas espécies nativas do Cerrado brasileiro pertencem à família Annonaceae e são largamente utilizadas pela medicina popular para o tratamento de doenças (ROESLER *et al.*, 2007). A espécie *Annona crassiflora* Mart. (**Figura 5**), pertencente à família Annonaceae, é uma fruta conhecida popularmente como araticum ou marolo (FORMAGIO *et al.*, 2015; LEBOEUF *et al.*, 1980). Na medicina tradicional popular, as diferentes partes botânicas do fruto são utilizadas para tratamento de reumatismo, diarreia, sífilis, ferimentos e picada de cobras (VILAR *et al.*, 2008).



**Figura 5:** Araticum (*Annona crassiflora* Mart.). **Fonte:** MELO, C. B. Portal Embrapa, 2017.

Estudos recentes ressaltam as atividades antibacterianas (TAKAHASHI *et al.*, 2006), nematocida (MACHADO *et al.*, 2015), moluscicida (DOS SANTOS; SANT'ANA, 2001) e larvicida (DE OMENA *et al.*, 2007); a capacidade de inibir a  $\alpha$ -amilase de insetos (DE SOUZA

*et al.*, 2012a) e a atividade da lipase pancreática (PEREIRA *et al.*, 2017); o potencial antitumoral (DE MESQUITA *et al.*, 2009; FORMAGIO *et al.*, 2015) e as propriedades antimalárica (PIMENTA *et al.*, 2014), antimutagênica (VILAR *et al.*, 2008), anti-inflamatória (PRATA *et al.*, 2020), antioxidantes (DE SOUZA *et al.*, 2012b; JUSTINO *et al.*, 2016; LUZIA; JORGE, 2013; PEREIRA *et al.*, 2017; ROESLER *et al.*, 2007) e hepaprotetora (JUSTINO *et al.*, 2017; ROESLER, 2011) do araticum. Destacam-se a atividade inibitória sob a lipase pancreática (PEREIRA *et al.*, 2017), enzima envolvida na digestão de triglicerídeos, que exerce efeito antiobesidade ao reduzir a absorção de gordura (DE LA GARZA *et al.*, 2011) e a capacidade de neutralizar a ação de EROs (JUSTINO *et al.*, 2019).

Esta atividade antioxidante da espécie *Annona crassiflora* Mart. está associada a presença de compostos fenólicos presentes na casca, na polpa e na semente do fruto (JUSTINO *et al.*, 2016; ROESLER *et al.*, 2007). Estudos prévios com extrato etanólico de casca de araticum comprovam a presença de compostos fenólicos na fração acetato de etila (JUSTINO *et al.*, 2016). Justino *et al.* (2019) destaca a atividade antioxidante das proantocianidinas do araticum a qual se relaciona à capacidade de inibir a peroxidação lipídica. Além disso, estudo recente mostra sua capacidade de redução dos níveis lipídios e o dano oxidativo em camundongos hiperlipidêmicos (RAMOS *et al.*, 2021). Apesar de a atividade antioxidante das frações de acetato de etila e proantocianidinas estar consolidada na literatura (JUSTINO *et al.*, 2019; RAMOS *et al.*, 2021; ROESLER *et al.*, 2007), ainda se desconhece se os compostos bioativos do araticum são capazes de modular a diferenciação de adipócitos.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da fração acetato de etila e proantocianidinas da casca de *Annona crassiflora* Mart. no estresse oxidativo e na adipogênese da linhagem celular 3T3-L1.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Avaliar a citotoxicidade das frações acetato de etila e proantocianidinas da casca de *Annona crassiflora* Mart. na linhagem celular 3T3-L1;
- Avaliar o efeito das frações acetato de etila e proantocianidinas da casca de *Annona crassiflora* Mart. na adipogênese da linhagem celular 3T3-L1;
- Analisar o estresse oxidativo dos tratamentos na linhagem 3T3-L1.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Obtenção da fração acetato de etila e proantocianidinas da casca de *Annona crassiflora* Mart.**

As frações acetato de etila e proantocianidinas foram cedidas pelo pesquisador Dr. Alisson Benatti Justino do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Para o preparo das amostras, 10 mg de cada fração foram pesados em balança analítica, em sequência, diluídos em 1 mL de álcool etílico puro, resultando em um estoque de concentração equivalente a 10 mg/mL. Os estoques foram armazenados a -20 °C.

#### **3.2 Obtenção e manutenção das células 3T3-L1**

A linhagem 3T3-L1 de pré-adipócitos de camundongos foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro (código BCRJ0019 – BCRJ/UFRJ) em 2018. Para o presente trabalho as células anteriormente cultivadas no Laboratório de Nanotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia foram descongeladas. Para o descongelamento, as células armazenadas (passagem n°5) em -80°C foram transferidas e cultivadas em garrafas médias (75 cm<sup>2</sup>) com meio de cultivo composto por Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com baixa concentração de glicose, 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% da solução antibiótica-antimicótica e mantidas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> (JANSON *et al.*, 2021). Após atingirem a confluência, as células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 96 e 24 poços para realização dos testes com os extratos. Além disso, periodicamente as células foram monitoradas quanto à presença de micoplasma.

#### **3.3 Ensaio de citotoxicidade do extrato acetato de etila e fração de protoantocianidinas do araticum em adipócitos 3T3-L1**

Para o ensaio de viabilidade celular, as células foram plaqueadas em placa de 96 poços (1 × 10<sup>4</sup> células/poço) e após 24 h foram incubadas com o veículo (etanol), utilizado para dissolver os extratos, as frações acetato de etila (FAE) e proantocianidinas (FP) e os polifenóis quercetina e catequina (presentes nas frações testadas) por 48h a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Os estoques dos tratamentos (10 mg/mL) foram diluídos a 2 mg/mL e dessa concentração se obteve a diluição seriada, correspondendo às concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e

1,5625 µg/mL. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata e foram realizados 3 experimentos. Após o tempo de incubação, retirou-se o meio de cultura e foram adicionados 100 µL de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) 0,5 mg/mL aos poços (ANDRÉ, 2019). A placa de cultura foi incubada por 4 horas a temperatura ambiente sob proteção de luz. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o precipitado formado dissolvido em 100 µL de solução de 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) em dimetilformamida/água (ANDRÉ, 2019). A absorbância da placa foi medida em leitor de placas a 570 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada para todos os tratamentos em relação ao controle (células não tratadas), que correspondeu a 100% de viabilidade.

### **3.4 Avaliação do extrato acetato de etila e da fração de proantocianidinas do araticum na diferenciação adipogênica de adipócitos 3T3-L1**

Após atingirem confluência nas garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, as células cultivadas em meio de cultivo foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 96 e 24 poços. Após 24 horas, o meio de cultivo foi substituído pelo meio de indução (MDI) de adipogênese composto por DMEM baixa glicose, 10% soro fetal bovino, 1% antibiótico-antimicótico, 1 µM de dexametasona (DEX), 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX), 200 mM de indometacina e 10 µg/mL de insulina (ANDRÉ, 2019; JANSON, 2021).

Foram realizados experimentos em placas de 96 e 24 poços (1 × 10<sup>4</sup> células/poço e 3 × 10<sup>4</sup> células/poço, respectivamente) (ANDRÉ, 2019). As células foram tratadas no dia em que o MDI foi adicionado (dia 1) com diferentes concentrações da fração acetato de etila e proantocianidinas (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 µg/mL), bem como com quercetina e catequina utilizadas a fim de comparação. No terceiro dia de indução, o meio de diferenciação foi substituído pelo meio de manutenção composto por meio de cultivo suplementado com 1 µg/mL de insulina (JANSON, 2021). Esse meio foi trocado a cada 2-3 dias, juntamente com a adição dos tratamentos. As células foram monitoradas em microscópio para avaliação da adipogênese e da morfologia. Entre os 8<sup>o</sup> ou 15<sup>o</sup> dias, tempo variável dependendo da confluência das células, as placas foram utilizadas para a coloração de *Oil Red O* e Vermelho Nilo.

### **3.5 Verificação da diferenciação adipogênica:**

#### **3.5.1 Ensaio de quantificação lipídica com *Oil Red O***

Após os oito ou quinze dias de indução adipogênica, a coloração com *Oil Red O* (ORO) foi realizada. Para isso, previamente foram pesados 50 mg de ORO os quais foram dissolvidos em 10 mL de isopropanol, resultando em uma solução estoque de 5 mg/mL que foi armazenada a temperatura ambiente e protegida da incidência luminosa. Da solução estoque foi preparada a solução de trabalho (ORO 0,2%) adicionando 3 volumes do estoque em 2 volumes de água e, em seguida, o corante foi filtrado. Também foram preparadas as soluções de fixação de células e do corante: formalina (10% formol em PBS 1X) e isopropanol 60%. Para a coloração, o meio das placas contendo células foi retirado, os poços foram lavados com PBS 1X, o qual em seguida foi descartado e as células foram fixadas com solução de formalina por 30 minutos. Posteriormente, retirou-se a formalina, os poços foram novamente lavados com PBS 1X, o isopropanol 60% foi adicionado e a placa incubada por 5 minutos. O isopropanol foi retirado, a solução corante (100 µL) foi adicionada aos poços e a placa foi incubada por 1h. Após esse período, o excesso de corante foi retirado com PBS 1X por 5 vezes (ANDRÉ, 2019). Em seguida, as células foram observadas utilizando o microscópio digital invertido em aumento de 10x e 20x (EVOS® XL, Advanced Microscopy Group).

#### **3.5.2 Ensaio de quantificação lipídica com Vermelho Nilo**

O Vermelho Nilo (VN) é um corante utilizado para detectar lipídios, uma vez que exibe alta especificidade, afinidade e sensibilidade em relação ao grau de hidrofobicidade dos lipídios (DIAZ *et al.*, 2008). Os experimentos foram conduzidos baseado em Yang *et al.* (2008). Previamente, a solução estoque de VN foi preparada diluindo 2 mg em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em uma solução de 1 mg/mL. A solução de trabalho foi preparada em PBS 1X (1:1000 v/v) a partir do estoque. O meio das placas de 24 poços foi retirado e os poços lavados com PBS 1X. Para fixação das células, a solução de formalina (10% formol em PBS 1X) foi adicionada aos poços e a placa incubada por 10 minutos. Em seguida, os poços foram novamente lavados e a solução corante adicionada (250 µL). A placa foi incubada por 1h, após esse tempo, os poços foram lavados com PBS 1X e as células observadas em microscópio invertido EVOS® em um aumento de 10x e 20x para verificar a diferenciação adipocitária. Essa coloração foi utilizada apenas para fins qualitativos. A intensidade da coloração e uma maior presença de gotículas lipídicas indicam que houve maior diferenciação dos adipócitos.

### **3.6. Medida das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) intracelulares**

Para avaliar o estresse oxidativo, o nível de espécies reativas a oxigênio (EROs) intracelular foi mensurado utilizando o corante fluorescente dicloro-dihidro-fluoresceinadiacetato (DCFH-DA). Essa molécula emite uma fluorescência ao sofrer alterações moleculares mediadas pelas EROs e esterases presentes no interior celular. De acordo com a intensidade de fluorescência a quantidade de EROs foi medida de forma proporcional: quanto maior a fluorescência emitida, maior produção de EROs intracelulares ou menor inativação delas. O método foi realizado baseado em Han *et al.* (2008) e Lee e Jang. (2021).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço) com meio de cultivo e, após 24 horas, o meio foi substituído pelo meio adipogênico com adição dos tratamentos. Após 72 horas do tratamento, as células foram lavadas com PBS 1X, em seguida, o PBS foi retirado e adicionada uma solução de DCFH-DA  $10 \mu\text{M}$  diluída em PBS 1X por 1 hora (LEE; JANG, 2021). Durante esse tempo, as placas ficaram mantidas na estufa envoltas com papel alumínio sob proteção luminosa. Em seguida, a intensidade de fluorescência (excitação/emissão; 485/528 nm) foi medida utilizando um fluorímetro. Os valores foram calculados pela intensidade de fluorescência em relação ao controle positivo (somente com o meio de diferenciação).

### **3.7 Análise estatística**

Para as análises estatísticas foi utilizado o método de análise de variância (ANOVA) e para as análises de múltiplas comparações o teste de Tukey's. As análises estatísticas e a elaboração dos gráficos foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 8 (Dotmatics, California). Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos se o valor  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 Viabilidade celular**

O experimento de viabilidade celular com brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), um sal de tetrazólio, é um ensaio colorimétrico comumente utilizado para determinar a proliferação e sobrevivência de células de mamíferos (MOSMANN, 1983). O MTT é um substrato de coloração amarela e ao entrar em contato com células vivas produz um produto formazan insolúvel de cor violeta pela ação da redutase mitocondrial (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). Para solubilização, uma mistura de 10 % dodecil sulfato de

sódio (SDS) e dimetilformamida/água foi utilizada a fim de solubilizar os cristais de formazan e determinar a concentração celular pela densidade óptica em comprimento de onda de 570 nm (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018).

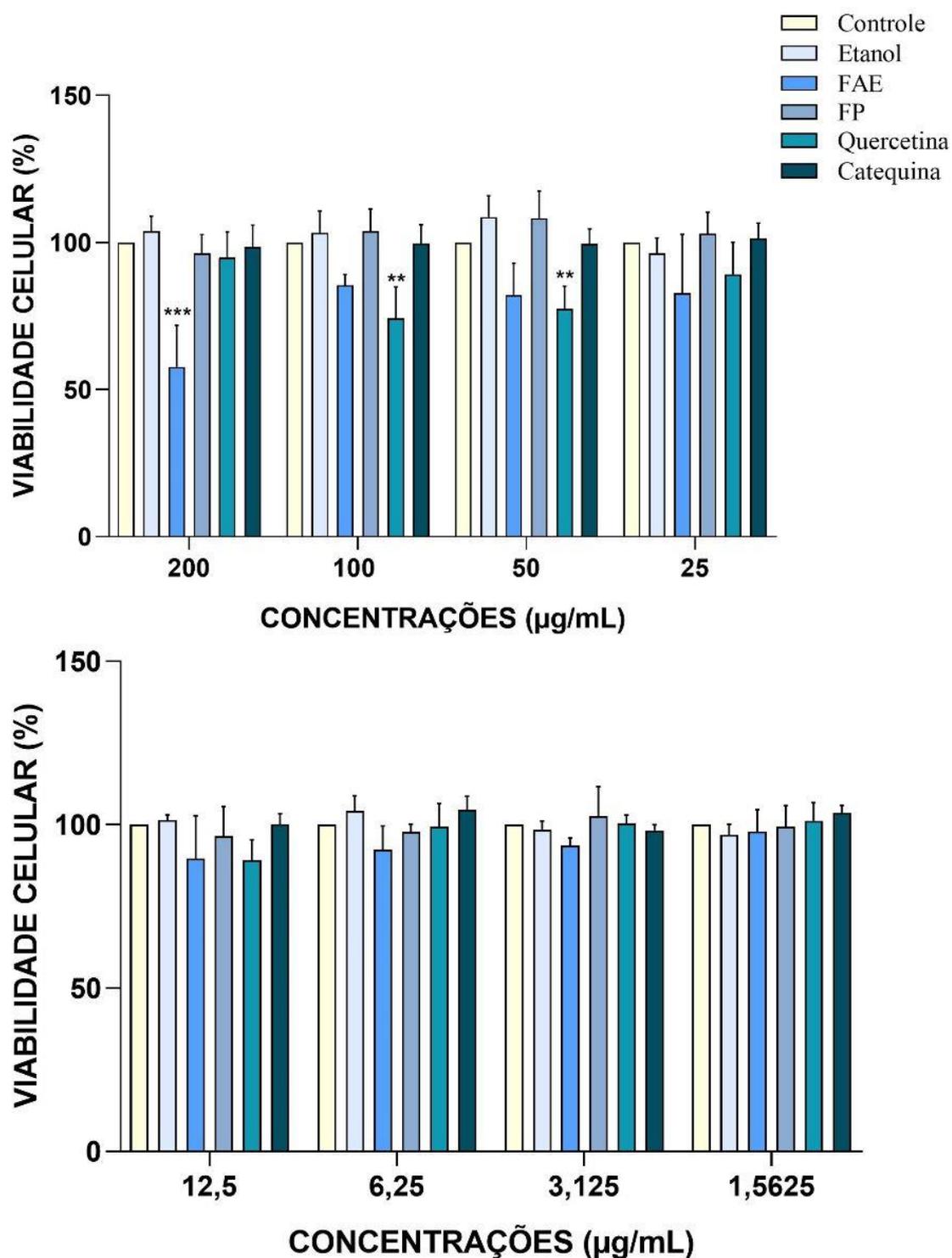
A **Tabela 1** mostra os resultados referentes à viabilidade celular dos adipócitos 3T3-L1 tratados por 48 h com diferentes concentrações da fração de acetato de etila (FAE) e de proantocianidinas (FP) ambas obtidas da casca de *Annona crassiflora* Mart., do etanol (veículo), da quercetina e da catequina. Os valores foram expressos em porcentagem em relação ao grupo controle, células sem tratamento, o qual foi considerado 100%. Ao total, 3 ensaios de viabilidade celular foram realizados.

**Tabela 1:** Valores expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (células sem tratamento).

VIABILIDADE CELULAR (%)					
Concentração (µg/mL)	Etanol	FAE	FP	Quercetina	Catequina
200	103,811 ±	57,686 ±	96,324 ±	94,903 ±	98,446 ±
	4,228	11,560*	4,516	6,177	6,090
100	103,299 ±	85,524 ±	103,850 ±	74,229 ±	99,775 ±
	6,005	2,553	6,190	8,714*	5,105
50	108,669 ±	82,063 ±	108,250 ±	77,560 ±	99,504 ±
	5,936	7,694	7,584	6,159*	4,143
25	96,326 ±	82,785 ±	102,949 ±	89,147 ±	101,394 ±
	4,285	16,319	6,007	8,925	4,225
12,5	101,463 ±	89,623 ±	96,514 ±	89,121 ±	100,241 ±
	1,307	10,759	7,341	5,185	2,627
6,25	104,282 ±	92,372 ±	97,785 ±	99,383 ±	104,620 ±
	3,788	5,957	2,004	5,785	3,285
3,125	98,617 ±	93,660 ±	102,571 ±	100,287 ±	98,267 ±
	2,041	1,948	7,433	2,180	1,205
1,5625	97,012 ±	97,921 ±	99,324 ±	101,295 ±	130,694 ±
	2,523	5,412	4,622	4,502	1,842

Valores expressos como média ± erro padrão. **Legenda:** FAE – fração de acetato de etila.; FP – fração de proantocianidinas, ambas obtidas da casca de *Annona crassiflora* Mart. (\*) indica diferença significativa. **Fonte:** elaborada pela autora.

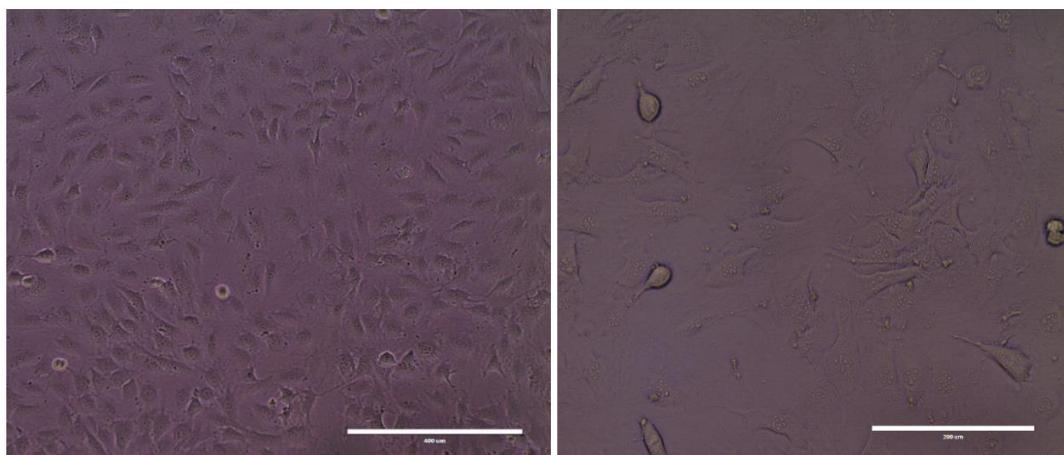
Considerando os dados da **Tabela 1**, nota-se que o tratamento com a fração de acetato de etila evidenciou citotoxicidade considerável na maior concentração (200 µg/mL). Já para os demais tratamentos não houve citotoxicidade significativa (**Figura 6**). Também foi possível observar que nas concentrações de 100 e 50 µg/mL a quercetina foi citotóxica, uma vez que a viabilidade celular foi menor que 80%. Já nas concentrações menores (12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 µg/mL) nenhum dos tratamentos apresentaram citotoxicidade às células (**Figura 7**).



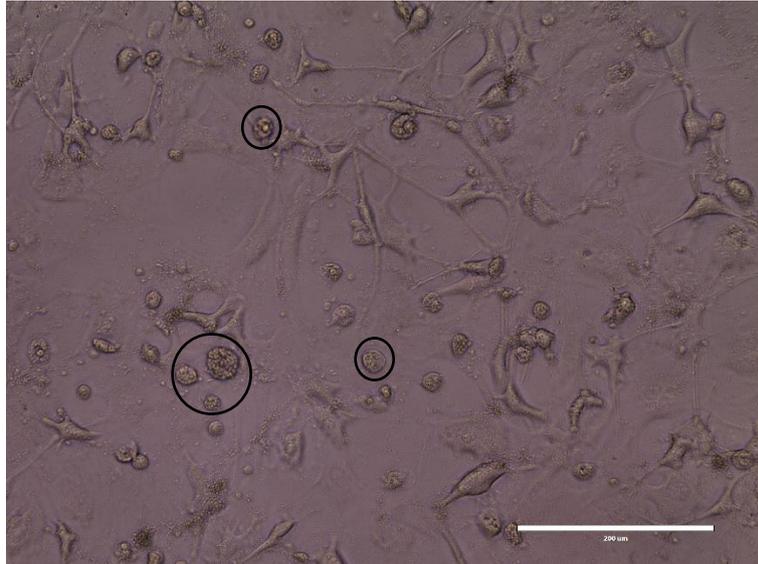
**Figura 6:** Efeito dos tratamentos na viabilidade celular dos pré-adipócitos 3T3-L1 nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 µg/mL por 48h. Os valores estão expressos em porcentagem de células viáveis em relação às células sem tratamento (controle). Valores expressos como média ± erro padrão. **Legenda:** FAE – fração de acetato de etila, FP – fração de proantocianidinas, (\*\*\*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ), (\*\*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p > 0,001$ ). **Fonte:** Elaborado pela autora.

## 4.2 Capacidade de diferenciação dos adipócitos

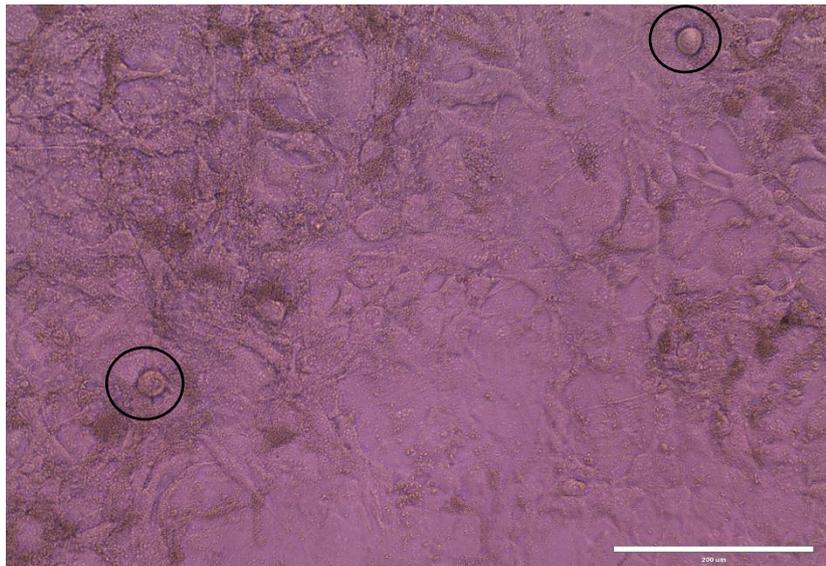
Para a realização dos experimentos, a passagem n° 5 das células 3T3-L1 foram descongeladas, as quais cresceram de modo satisfatório no meio de cultivo composto por DMEM com baixa concentração de glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico-antimicótico. Após 24h do plaqueamento nas placas de 96 ( $1 \times 10^4$  células/poço) e 24 poços ( $3 \times 10^4$  células/poço), o meio foi substituído pelo meio de indução (MDI) composto por meio de cultivo e indutores: 1  $\mu$ M de dexametasona (DEX), 0,5 mM de 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX,) 200  $\mu$ M de indometacina e 10  $\mu$ g/mL de insulina. O MDI demonstrou sua capacidade de induzir a adipogênese verificada, de modo qualitativo, pela maior quantidade de células mais arredondadas (**Figura 8**) em comparação às células não induzidas (**Figura 7**). Entretanto a indução pelo coquetel não foi satisfatória, uma vez que ainda se observa a presença de células fusiformes. Além disso, o kit de diferenciação adipogênica StemPro® Gibco (Thermo Fisher Scientific) que inclui o meio basal e o suplemento de diferenciação adipogênica foi utilizado para o cultivo de células 3T3-L1 em placa de 24 poços a fim de verificar se haveria diferença na adipogênese das células cultivadas com o meio de indução elaborado (**Figura 7**) e cultivadas com o meio comercial (**Figura 9**).



**Figura 7:** Células pré-adipócitos 3T3-L1 não induzidas cultivadas em meio de cultivo: (A) lente de aumento de 10x e (B) lente de aumento de 20x. **Fonte:** Elaborado pela autora.



**Figura 8:** Células 3T3-L1 induzidas com meio de indução (MDI). Imagem fotografada em lente de aumento de 20x. **Legenda:** os círculos em preto demonstram os adipócitos maturados. **Fonte:** Elaborado pela autora.



**Figura 9:** Células 3T3-L1 induzidas com o kit para diferenciação adipogênica StemPro® (Thermo Fischer). Imagens fotografadas em lente de aumento de 20x. **Legenda:** os círculos em preto indicam adipócitos maturados. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Estudos consolidam a eficácia da composição do meio de crescimento composto por DMEM baixa glicose, 10% de SFB e 1% de antibiótico-antimicótico, para o cultivo das células 3T3-L1 (JANSON *et al.*, 2021; REBOLLO-HERNANZ *et al.*, 2019; ZEBISCH *et al.*, 2012). Entretanto, quanto ao meio de indução há controvérsias em relação à sua capacidade de indução da adipogênese apontada pelo estudo de Zhao e colaboradores (2019), principalmente em

células que já passaram pelo processo de congelamento e descongelamento. No estudo, os pesquisadores comprovaram que o coquetel de maior eficácia foi o meio composto por 1  $\mu\text{M}$  de dexametasona, 0,5 mM de IBMX e 10  $\mu\text{g/mL}$  de insulina (ZHAO *et al.*, 2019). Vale ressaltar que muitos fatores afetam a diferenciação como a origem da linhagem celular e o número da passagem celular (ZHAO *et al.*, 2019). A eficiência da adipogênese reduz com o aumento de número de passagens após o descongelamento (ZEBISCH *et al.*, 2012). Além disso, Mehra e colaboradores (2012) demonstraram que a diferenciação das células 3T3-L1 depende fortemente do fornecedor (JEONG *et al.*, 2012).

A diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 pode ser avaliada por meio da observação da morfologia celular (LI *et al.*, 2020). Inicialmente, os pré-adipócitos não induzidos apresentam a morfologia fusiforme (LI *et al.*, 2020) (**Figura 7**), sendo possível observar células mais alongadas. Após a indução da cultura, as células começam a apresentar um formato arredondado e pequenas gotículas de lipídios em seu interior (LI *et al.*, 2020) (**Figura 8 e 9**). Por fim, após a maturação celular, é possível visualizar gotas lipídicas maiores no interior das células diferenciadas (LI *et al.*, 2020).

Ao observar as **Figura 7 e 8**, nota-se que as células induzidas ainda apresentam a morfologia próxima às células não induzidas, além de não apresentarem gotículas lipídicas evidentes. Também é possível notar que não houve diferença entre as células cultivadas com o meio de indução e meio comercial (**Figuras 8 e 9**). Dessa forma, concluímos que o meio de indução utilizado nos experimentos não foi eficiente para a estimulação da adipogênese dos pré-adipócitos 3T3-L1. A indução insatisfatória pode estar relacionada com o número da passagem celular utilizada para a realização dos experimentos, bem como com o descongelamento das células (ZHAO *et al.*, 2019). O estudo conduzido por Zhao e colaboradores (2019) apontam que a eficiência de diferenciação de células com números de passagem igual e superior a 7 reduziu para aproximadamente 65%. Já com passagens superiores a 14 há uma diminuição de 30% de eficiência (ZHAO *et al.*, 2019).

As células utilizadas para os ensaios de adipogênese apresentavam passagens 9 e 10 quando plaqueadas em placas de 96 poços e 13, 16 e 18 em placas de 24 poços. Considerando que a perda de eficiência da indução adipogênica ocorre a partir da passagem 7, é possível relacionar a não indução das células com o número de passagem. Entretanto, para confirmar se esse fator possa ter interferido na diferenciação celular são necessárias maiores investigações. Uma proposta para avaliar se a passagem é o fator envolvido na diferenciação é realizar o tratamento

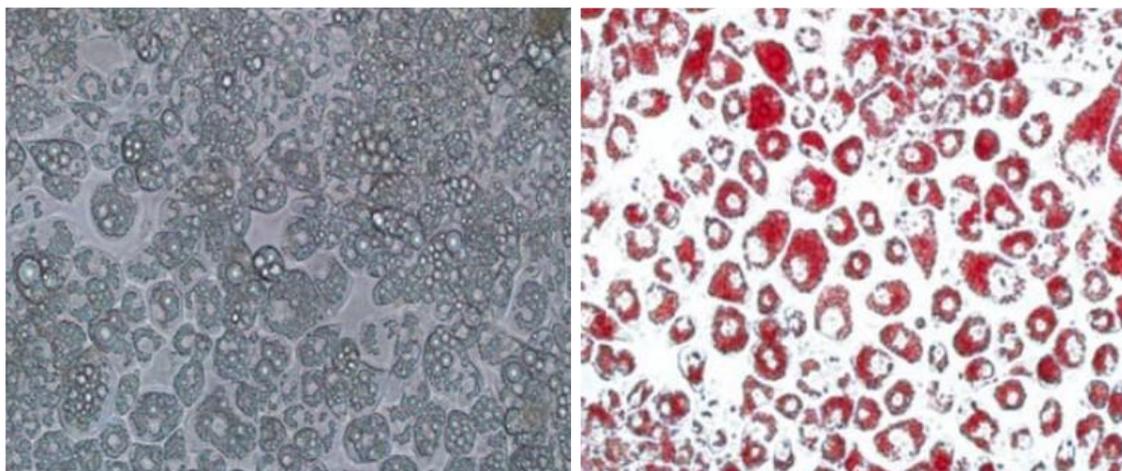
prolongado com IBMX (0,5 mM) adicionando-o ao meio de manutenção (HUA *et al.*, 2016; ZEBISCH *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2019) ou adicionar ao meio de indução a rosiglitazona (2  $\mu$ M) (ZHAO *et al.*, 2019), um medicamento tiazolidinediona utilizado para o tratamento de *diabetes*, uma vez que ativa o PPAR- $\gamma$  agindo como um potente sensibilizador de insulina (CARIOU; CHARBONNEL; STAELS, 2012).

#### **4.3 Efeito antiadipogênico: Coloração de *Oil Red O* e Vermelho Nilo**

O *Oil Red O* (ORO) é um corante fluorescente solúvel em gordura utilizado para corar lipídios neutros, ésteres de colesterol e lipoproteínas capaz de permeabilizar às células (KOOPMAN; SCHAART; HESSELINK, 2001). Dessa forma, a coloração com ORO é um método qualitativo simples para a análise de quantidade de triglicerídeos (TGs) armazenados nas gotículas lipídicas e o impacto da modulação de nutrientes (DEUTSCH *et al.*, 2014; MCVEAN; PATRICK; WITCETT, 1965). Quando corados com ORO, os lipídios apresentam coloração avermelhada (KOOPMAN; SCHAART; HESSELINK, 2001). A coloração com Vermelho Nilo (VN) é baseada na técnica de microscopia fluorescente a qual identifica lipídios em células vivas quando coradas com a sonda fluorescente VN (GREENSPAN; MAYER; FOWLER, 1985).

As colorações com ORO e VN são comumente utilizadas para marcar as gotas lipídicas dos adipócitos por serem métodos simples e menos onerosos (DIAZ *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2022). Após os 15 e 10 dias de indução adipocitária das placas de 96 poços e 24 poços, respectivamente, as gotículas coradas com ORO e VN deveriam apresentar coloração vermelho-alaranjada. Além disso, a intensidade da coloração é proporcional à quantidade de TGs (GREENSPAN; FOWLER, 1985; MCVEAN; PATRICK; WITCETT, 1965; ZHANG *et al.*, 2022), assim, colorações mais intensas indicam maiores quantidades de lipídios.

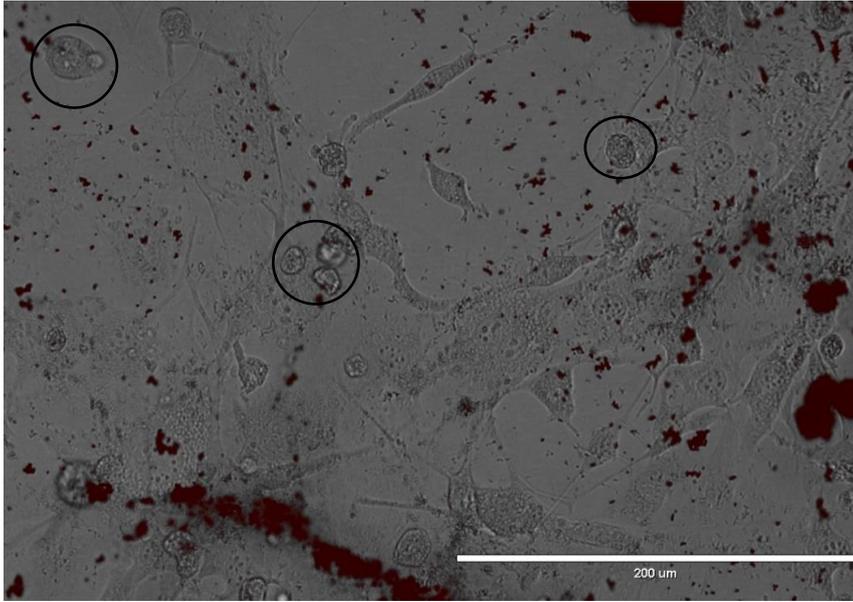
A estimulação adipocitária além de induzir a diferenciação de pré-adipócitos a adipócitos, inibe a expansão clonal das células 3T3-L1 (GREEN; KEHINDE, 1975) e induz o acúmulo lipídico no interior celular (ALI *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2019; LEFTEROVA; LAZAR, 2009). Dessa forma, ao serem estimuladas com o meio de indução, as células 3T3-L1 diferenciadas deveriam ter sua atividade mitótica inibida, aumentado de tamanho e acumulado gotas de lipídios em seu interior, as quais poderiam ser visualizadas por microscópio invertido como ilustrado na **Figura 10**.



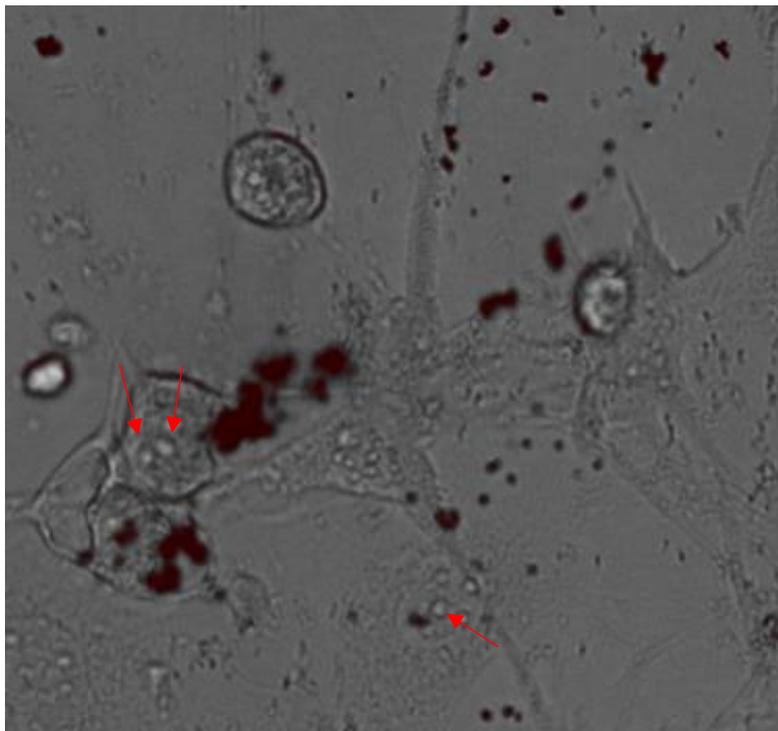
**Figura 10:** Morfologia de células 3T3-L1 no oitavo dia de adipogênese. (A) Células 3T3-L1 maturadas contendo gotas lipídicas circulares. (B) Células coradas com Oil Red O. **Fonte:** Li *et al.*, 2020.

As colorações de ORO e VN foram realizadas respectivamente nas placas de 96 poços e 24. Para a investigação dos efeitos antiadipogênicos das frações acetato de etila e proantocianidinas, os pré-adipócitos 3T3-L1 foram induzidos à diferenciação com o meio de indução na presença ou ausência dos tratamentos. A concentração avaliada foi de 25 µg/mL, uma vez que apresentou não ser citotóxica às células após resultados iniciais obtidos pelo ensaio de MTT.

Após o 15<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> de indução adipocitária, as placas foram coradas e as imagens foram tiradas em aumento de 20x em microscópio digital invertido de fluorescência (EVOS® *fluorescence*, Advanced Microscopy Group). Ao avaliar as **Figuras 11 e 12**, notamos que não houve coloração das gotículas lipídicas. Na **figura 12**, as setas indicadas evidenciam os lipídios intracelulares. Em caso de coloração, tais regiões deveriam se apresentar em coloração avermelhada para os dois métodos. Como as gotículas lipídicas não foram coradas as imagens dos tratamentos e controle negativo não foram apresentadas para nenhuma das colorações. Comparando com o estudo de Li *et al.* (2020) (**Figura 10**), observamos que a indução não foi eficiente, uma vez que há pouca quantidade de células com morfologia circular e as gotas lipídicas são menos evidentes. Portanto, não foi possível avaliar o efeito antiadipogênico dos tratamentos com as frações de araticum, visto que não houve diferenciação satisfatória, impossibilitando a análise qualitativa e quantitativa da inibição de formação de gotas lipídicas (imagens não apresentadas).

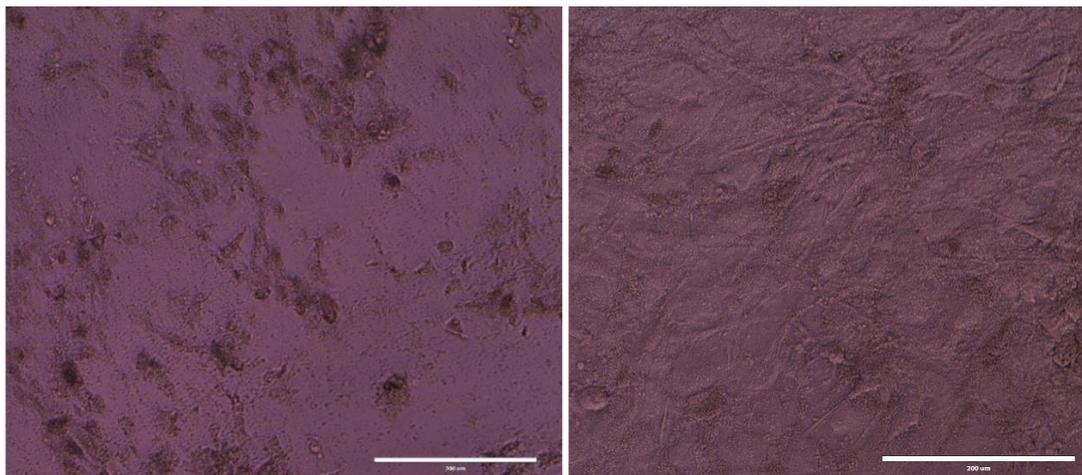


**Figura 11:** Coloração das células 3T3-L1 no décimo dia de adipogênese. Imagem fotografada em lente de aumento de 20x. **Legenda:** os círculos em preto apontam as células diferenciadas. **Fonte:** Elaborado pela autora.



**Figura 12:** Coloração das células 3T3-L1 no décimo dia de adipogênese. Imagem fotografada em lente de aumento de 20x. **Legenda:** as setas indicam as gotículas de lipídios. **Fonte:** Elaborado pela autora.

Além disso, foi possível observar que o tratamento com a fração de acetato de etila interferiu na morfologia das células 3T3-L1 (**Figura 13A**). Ao comparar a imagem das células induzidas tratadas com FAE com o controle negativo (células não induzidas e sem tratamento) (**Figura 13B**), notamos que a morfologia celular é distinta. É possível que a exposição prolongada ao tratamento com FAE seja prejudicial ao desenvolvimento da célula, entretanto, maiores investigações são necessárias para confirmar a citotoxicidade prolongada. Em relação aos demais tratamentos alterações morfológicas não foram observadas (imagens não apresentadas).



**Figura 13:** Células 3T3-L1. (A) Células tratadas com a fração acetato de etila de *Annona crassiflora* Mart. (B) Pré-adipócitos 3T3-L1 não induzidos à adipogênese e sem tratamento. Imagens fotografadas em lente de aumento de 20x. **Fonte:** Elaborado pela autora.

#### 4.4 Avaliação das frações acetato de etila e proantocianidinas da casca do araticum nas espécies reativas de oxigênio

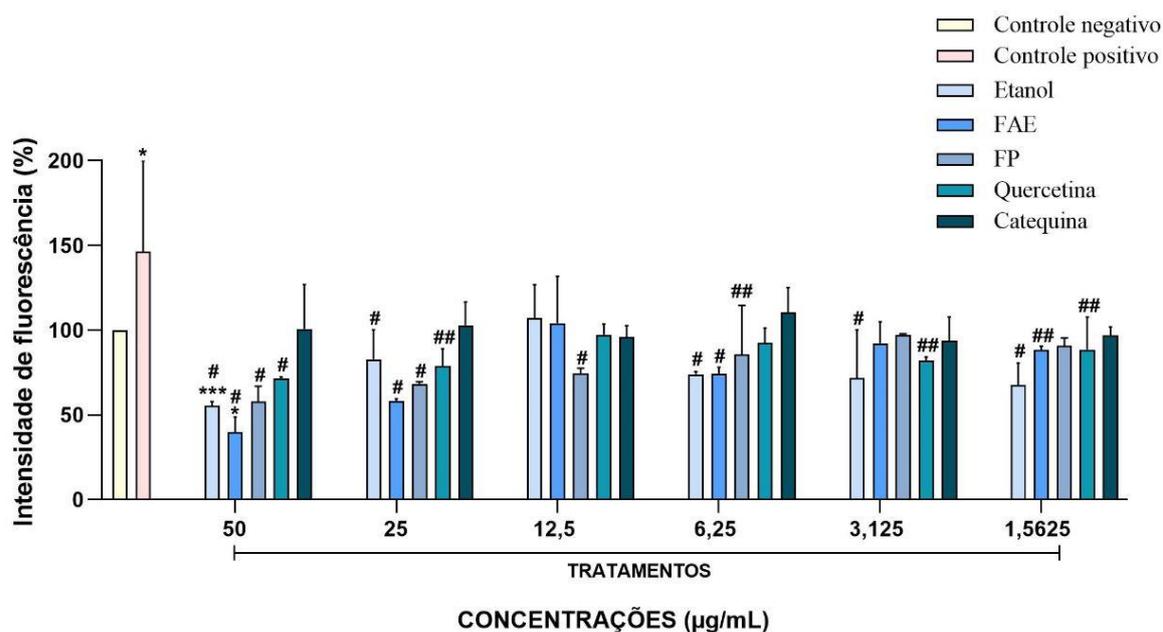
A partir de estudo *in vitro*, Furukawa e colaboradores (2004) avaliaram a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 a adipócitos. Os resultados sugerem que o acúmulo de ácido graxos nos adipócitos estimulou a produção de EROs mediada pela atividade das enzimas adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases (FURUKAWA *et al.*, 2004). Já em experimentos *in vivo*, o grupo observou que a produção de EROs no tecido adiposo branco reduziu ao administrar um inibidor de NADPH oxidase (FURUKAWA *et al.*, 2004). Além disso, Mouche *et al.* (2007) conduziram um estudo que comprova que há aumento da produção de EROs em adipócitos brancos completamente diferenciados.

Higuchi e colaboradores (2013), a fim de mimetizar os efeitos de EROs na adipogênese, isolaram células tronco derivadas de tecido adiposo e induziram a diferenciação a adipócitos.

Ao estimularem a expressão de uma NADPH oxidase, o grupo observou o aumento dos níveis de EROs os quais induziram a adipogênese e o acúmulo lipídico nos adipócitos (HIGUCHI *et al.*, 2013). As EROs e o estresse oxidativo estão envolvidos em sinalizações de transdução e regulação da diferenciação adipocitária, entretanto, ainda não se conhece exatamente suas funções nessa relação (PÉREZ-TORRES *et al.*, 2021).

Sabendo da relação entre estresse oxidativo e obesidade e que alguns compostos bioativos de origem vegetal apresentam atividade antioxidante, sendo capazes de neutralizar a ação de EROs (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA *et al.*, 2019), a avaliação das frações acetato de etila e proantocianidinas obtidas da casca do araticum foi conduzida por meio do ensaio de medida de EROs intracelulares utilizando o corante fluorescente dicloro-dihidro-fluoresceinadiacetato (DCFH-DA). Essa molécula é permeável às células e quando internalizada é clivada por esterases intracelular para a forma não fluorescente 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) que ao ser oxidada por EROs se converte a 2,7-diclorofluoresceína (DCF) (FURGER, 2021; WOLFE; LIU, 2007). Esse ensaio é ideal para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais em células vivas (FURGER, 2021; WOLFE; LIU, 2007).

Os resultados obtidos mostram que houve aumento da produção de EROs nas células induzidas e sem tratamento (controle positivo) quando comparado às células sem indução (controle negativo), corroborando com os dados evidenciados na literatura (FURUKAWA *et al.*, 2004; HIGUCHI *et al.*, 2013; MOUCHE *et al.*, 2007; PÉREZ-TORRES *et al.*, 2021) em que se espera o aumento de produção de EROs mediada pela adipogênese.



**Figura 14:** Avaliação da produção de EROs intracelulares utilizando a sonda DCFH-DA. Os valores estão expressos em porcentagem de intensidade de fluorescência em relação ao controle negativo. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. **Legenda:** controle negativo – células não induzidas, controle positivo – células induzidas e não tratadas, FAE – fração de acetato de etila, FP – fração de proantocianidinas. (\*): indica diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p > 0,001$ ), (#): indica diferença significativa em relação ao controle positivo ( $p < 0,001$ ), (##) indica diferença significativa em relação ao controle positivo ( $p > 0,001$ ). **Fonte:** Elaborado pela autora.

Em relação ao controle positivo, nota-se que houve redução da produção de EROs com fração de acetato de etila, de proantocianidinas e com quercetina nas concentrações de 50 e 25  $\mu\text{g/mL}$ . Nas demais concentrações, destaca-se a ação inibitória da fração de proantocianidinas que apresentou resultados positivos nas concentrações 12,5 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$ . A fração acetato de etila apresentou atividade inibitória nas concentrações 6,25 e 1,5625  $\mu\text{g/mL}$ , porém, como apontado no tópico 4.3 (páginas 21-22), essa atividade pode estar atrelada à alteração morfológica das células ou morte celular. Ademais, é importante ressaltar que a indução insatisfatória da diferenciação adipogênica pode invalidar os resultados obtidos, uma vez que não é possível afirmar se as frações do araticum apresentam efeito antiobesogênicos ao interferir na EROs. Porém, o ensaio sugere que tais tratamentos, com exceção da FAE, possuem capacidade antioxidante (JUSTINO *et al.*, 2016), uma vez que se observa a redução de EROs.

## 5. CONCLUSÃO

Concluimos que não se pode afirmar se as frações acetato de etila (FAE) e proantocianidinas (FP) do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) apresentam atividades antiadipogênicas e antiobesogênicas. Entretanto, com o ensaio de medida de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi possível observar que os tratamentos reduziram a produção, sugerindo que a fração de proantocianidinas obtida da casca do araticum, bem como os compostos quercetina e catequina, apresentam atividade antioxidante, uma vez que houve redução dos níveis de EROs. Além disso, torna-se evidente que a fração acetato de etila em concentrações superiores a 50 µg/mL é tóxica à célula. Com o presente estudo, torna-se viável realizar investigações de citotoxicidade prolongada na concentração de 25 µg/mL da FAE. Por fim, a indução insatisfatória das células 3T3-L1 confere possibilidade de que experimentos posteriores investiguem se a eficiência da estimulação adipocitária dessa linhagem celular está relacionada com o seu número de passagem, uma vez que já foi observada a redução da eficiência adipogênica em passagens acima de 7.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

ALI, A. T. *et al.* The effect of alkaline phosphatase inhibitors on intracellular lipid accumulation in preadipocytes isolated from human mammary tissue. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**, v. 43, n. 3, p. 207–213, 1 maio 2006.

ALI, A. T. *et al.* Adipocyte and adipogenesis. **European Journal of Cell Biology**, v. 92, n. 6–7, p. 229–236, jun. 2013.

ANDRÉ, P. H. G. **Avaliação do potencial antioxidante e efeito antiadipogênico das frações n-butanol das folhas de *Bauhinia forficata* Link e das cascas do fruto de *Annona crassiflora* Mart em adipócitos 3T3-L1.** Trabalho de Conclusão de Curso -Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p. 39. 2019.

BARET, P. *et al.* Dietary polyphenols preconditioning protects 3T3-L1 preadipocytes from mitochondrial alterations induced by oxidative stress. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 1, p. 167–174, jan. 2013.

BARGUT, T. C. L. *et al.* Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 31, n. 1, 26 jul. 2017.

BIESALSKI, H.-K. *et al.* Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, n. 11–12, p. 1202–1205, nov. 2009.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288–298, 2019.

BOLCA, S.; VAN DE WIELE, T.; POSSEMIERS, S. Gut metabotypes govern health effects of dietary polyphenols. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 220–225, abr. 2013.

BRYAN, S. *et al.* Redox-inflammatory synergy in the metabolic syndrome. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 91, n. 1, p. 22–30, jan. 2013.

CAO, Z.; UMEK, R. M.; MCKNIGHT, S. L. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. **Genes & Development**, v. 5, n. 9, p. 1538–1552, set. 1991.

CARIOU, B.; CHARBONNEL, B.; STAELS, B. Thiazolidinediones and PPAR $\gamma$  agonists: time for a reassessment. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 205–215, maio 2012.

CARRIÈRE, A. *et al.* Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species. **FEBS Letters**, v. 550, n. 1–3, p. 163–167, 28 ago. 2003.

CHENG, L. *et al.* Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. **Adipocyte**, v. 10, n. 1, p. 48–65, 1 jan. 2021.

CHO, K.-J.; SEO, J.-M.; KIM, J.-H. Bioactive lipxygenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species. **Molecules and Cells**, v. 32, n. 1, p. 1–5, jul. 2011.

CHOOI, Y. C.; DING, C.; MAGKOS, F. The epidemiology of obesity. **Metabolism**, v. 92, p. 6–10, mar. 2019.

DE LA GARZA, A. *et al.* Natural Inhibitors of Pancreatic Lipase as New Players in Obesity Treatment. **Planta Medica**, v. 77, n. 08, p. 773–785, maio 2011.

DE MELLO, A. H. *et al.* Mitochondrial dysfunction in obesity. **Life Sciences**, v. 192, p. 26–32, jan. 2018.

DE MESQUITA, M. L. *et al.* Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439–445, jun. 2009.

SOUZA, Elton Bicalho de. Transição nutricional no Brasil: análise dos principais fatores. **Cadernos UniFOA**, v. 5, n. 13, p. 49–53, 2017.

DE SOUZA, P. *et al.* Inhibitory Activity of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase by Plant Extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Medica**, v. 78, n. 04, p. 393–399, mar. 2012a.

DE SOUZA, V. R. *et al.* Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381–386, set. 2012b.

DEOMENA, M. *et al.* Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2549–2556, set. 2007.

DEUTSCH, M. J. *et al.* Digital image analysis approach for lipid droplet size quantitation of Oil Red O-stained cultured cells. **Analytical Biochemistry**, v. 445, p. 87–89, jan. 2014.

DIAS, P. C. *et al.* Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 7, 2017.

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

DOS SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 115–120, jan. 2001.

**Embrapa Cerrados: Conhecimento, Tecnologia e Compromisso Ambiental.** 2017.

FERNANDO, R. *et al.* Low steady-state oxidative stress inhibits adipogenesis by altering mitochondrial dynamics and decreasing cellular respiration. **Redox Biology**, v. 32, p. 101507, maio 2020.

FISHER, A. B. Peroxiredoxin 6: A Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A<sub>2</sub> Activities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 3, p. 831–844, ago. 2011.

FORBES-HERNÁNDEZ, T. Y. *et al.* Strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Romina) methanolic extract promotes browning in 3T3-L1 cells. **Food & Function**, v. 11, n. 1, p. 297–304, 2020.

FORMAGIO, A. S. N. *et al.* *In vitro* biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 308–315, abr. 2015.

FRIGOLET, M. E.; GUTIÉRREZ-AGUILAR, R. The colors of adipose tissue. **Gaceta de México**, v. 156, n. 2, p. 3932, 7 mai. 2020.

FURGER, C. Live Cell Assays for the Assessment of Antioxidant Activities of Plant Extracts. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 944, 11 jun. 2021.

FURUKAWA, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 15 dez. 2004.

GREEN, H.; KEHINDE, O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. **Cell**, v. 5, n. 1, p. 19–27, maio 1975.

GREEN, H.; MEUTH, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. **Cell**, v. 3, n. 2, p. 127–133, out. 1974a.

GREEN, H.; MEUTH, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. **Cell**, v. 3, n. 2, p. 127–133, out. 1974b.

GREENSPAN, P.; FOWLER, S. D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. **Journal of Lipid Research**, v. 26, n. 7, p. 781–789, jul. 1985.

GREENSPAN, P.; MAYER, E. P.; FOWLER, S. D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **The Journal of Cell Biology**, v. 100, n. 3, p. 965–973, 1 mar. 1985.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 1 jun. 2006.

HAN, X.; SHEN, T.; LOU, H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, n. 9, p. 950–988, 12 set. 2007.

HAN, Y. H. *et al.* Caspase inhibitor decreases apoptosis in pyrogallol-treated lung cancer Calu-6 cells via the prevention of GSH depletion. **International Journal of Oncology**, v. 33, n. 5, p. 1099–1105, nov. 2008.

HIGUCHI, M. *et al.* Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into Fat Involves Reactive Oxygen Species and Forkhead Box O1 Mediated Upregulation of Antioxidant Enzymes. p. 11, 2013.

HUA, Y. *et al.* Prolonged treatment with 3-isobutyl-1-methylxanthine improves the efficiency of differentiating 3T3-L1 cells into adipocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 507, p. 18–20, ago. 2016.

JANSON, B. *et al.* *Hibiscus sabdariffa* L. calyx extract prevents the adipogenesis of 3T3-L1 adipocytes, and obesity-related insulin resistance in high-fat diet-induced obese rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, p. 111438, jun. 2021.

JEONG, Y. S. *et al.* Grape skin extract reduces adipogenesis- and lipogenesis-related gene expression in 3T3-L1 adipocytes through the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  signaling pathway. **Nutrition Research**, v. 32, n. 7, p. 514–521, jul. 2012.

JUSTINO, A. B. *et al.* Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 167–182, dez. 2016.

JUSTINO, A. B. *et al.* Hepatoprotective Properties of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* Mart. Fruit Peel against Diabetes-Induced Oxidative and Nitrosative Stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 22, p. 4428–4438, 7 jun. 2017.

JUSTINO, A. B. *et al.* B procyanidins of *Annona crassiflora* fruit peel inhibited glycation, lipid peroxidation and protein-bound carbonyls, with protective effects on glycated catalase. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19183, 16 dez. 2019.

KAISANLAHTI, A.; GLUMOFF, T. Browning of white fat: agents and implications for beige adipose tissue to type 2 diabetes. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 1–10, fev. 2019.

KIM, G.-T. *et al.* *Annona muricata* leaf extract attenuates hepatic lipogenesis and adipogenesis. **Food & Function**, v. 12, n. 10, p. 4621–4629, 2021.

KOOPMAN, R.; SCHAART, G.; HESSELINK, M. K. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 116, n. 1, p. 63–68, jul. 2001.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, jun. 2018.

KURYŁOWICZ, A.; PUZIANOWSKA-KUŹNICKA, M. Induction of Adipose Tissue Browning as a Strategy to Combat Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6241, 28 ago. 2020.

LEAL, V. DE O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 419, p. 87–94, abr. 2013.

LEBOEUF, M. *et al.* The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, jan. 1980.

LEE, D.-K.; JANG, H.-D. Carnosic Acid Attenuates an Early Increase in ROS Levels during Adipocyte Differentiation by Suppressing Translation of Nox4 and Inducing Translation of Antioxidant Enzymes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 6096, jan. 2021.

LEE, D. *et al.* Phytochemicals from the flowers of *Prunus persica* (L.) Batsch: Anti-adipogenic effect of mandelamide on 3T3-L1 preadipocytes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 49, p. 128326, out. 2021.

LEE, H. *et al.* Reactive Oxygen Species Facilitate Adipocyte Differentiation by Accelerating Mitotic Clonal Expansion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 16, p. 10601–10609, abr. 2009.

LEE, J.-E. *et al.* Transcriptional and Epigenomic Regulation of Adipogenesis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 39, n. 11, p. e00601-18, jun. 2019.

LEE, J.-E.; GE, K. Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR $\gamma$  expression during adipogenesis. **Cell & Bioscience**, v. 4, n. 1, p. 29, 2014.

LEFTEROVA, M. I.; LAZAR, M. A. New developments in adipogenesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 107–114, abr. 2009.

LI, Y. *et al.* Interleukin-38 inhibits adipogenesis and inflammatory cytokine production in 3T3-L1 preadipocytes. **Cell Biology International**, v. 44, n. 11, p. 2357–2362, nov. 2020.

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 7, p. 1957–1997, out. 2011.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 231–235, mar. 2013.

MACHADO, A. *et al.* Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 113, 2015.

MASSCHELIN, P. M. *et al.* The Impact of Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1638, 22 jan. 2020.

MCVEAN, D. E.; PATRICK, R. L.; WITCHETT, C. E. An aqueous oil red o fixative stain for histological preparations. **Technical Bulletin of the Registry of Medical Technologists. American Society of Clinical Pathologists. Registry of Medical Technologists**, v. 35, p. 33–35, fev. 1965.

MECHANICK, J. I. *et al.* American Association Of Clinical Endocrinologists: Position statement on obesity and obesity medicine. **Endocrine Practice**. v. 18, n. 5, p. 7, 2012.

MIR, S. A. *et al.* Understanding the role of active components from plant sources in obesity management. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 18, n. 2, p. 168–176, abr. 2019.

MORRISON, S.; MCGEE, S. L. 3T3-L1 adipocytes display phenotypic characteristics of multiple adipocyte lineages. **Adipocyte**, v. 4, n. 4, p. 295–302, 2 out. 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MOUCHE, S. *et al.* Reduced expression of the NADPH oxidase NOX4 is a hallmark of adipocyte differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 7, p. 1015–1027, jul. 2007.

MOZAFFARIAN, D. Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity: A Comprehensive Review. **Circulation**, v. 133, n. 2, p. 187–225, 12 jan. 2016.

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, fev. 2000.

NABAVI, S. F. *et al.* Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: You are what you eat! **Food Chemistry**, v. 179, p. 305–310, jul. 2015.

NALAMACHU, S.; WORTMANN, R. Role of Indomethacin in Acute Pain and Inflammation Management: A Review of the Literature. **Postgraduate Medicine**, v. 126, n. 4, p. 92–97, jul. 2014.

NTAMBI, J. M.; YOUNG-CHEUL, K. Adipocyte Differentiation and Gene Expression. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 12, p. 3122S-3126S, 1 dez. 2000.

**ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE.** Obesidade e sobrepeso. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 14 set. 2022

OVERBY, H. *et al.* Indomethacin promotes browning and brown adipogenesis in both murine and human fat cells. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 8, n. 3, jun. 2020.

PARK, A. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 1, p. 33, 2014.

PEREIRA, M. N. *et al.* Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 324–329, mar. 2017.

PÉREZ-TORRES, I. *et al.* Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1786, 11 fev. 2021.

PIMENTA, L. P. S. *et al.* *In vivo* antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1254–1259, 18 ago. 2014.

POULOS, S. P.; DODSON, M. V.; HAUSMAN, G. J. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 10, p. 1185–1193, out. 2010.

PRADO, L. G. *et al.* Antioxidant, antiproliferative and healing properties of araticum (*Annona crassiflora* Mart.) peel and seed. **Food Research International**, v. 133, p. 109168, jul. 2020.

PRATA, M. N. L. *et al.* Anti-inflammatory and immune properties of the peltatoside, isolated from the leaves of *Annona crassiflora* Mart., in a new experimental model zebrafish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 101, p. 234–243, jun. 2020.

QASIM, A. *et al.* On the origin of obesity: identifying the biological, environmental and cultural drivers of genetic risk among human populations. **Obesity Reviews**, p. 29, 2017.

QI, S. *et al.* Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) seed water extract as potential antioxidant and anti-obese natural additive in meat products. **Food Control**, v. 50, p. 195–201, abr. 2015.

QUINLAN, C. L. *et al.* Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward and Reverse Reactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 32, p. 27255–27264, ago. 2012.

RAMOS, L. P. A. *et al.* Antioxidant compounds from *Annona crassiflora* fruit peel reduce lipid levels and oxidative damage and maintain the glutathione defense in hepatic tissue of Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 112049, out. 2021.

REBOLLO-HERNANZ, M. *et al.* Phenolic compounds from coffee by-products modulate adipogenesis-related inflammation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance in adipocytes, via insulin/PI3K/AKT signaling pathways. **Food and Chemical Toxicology**, v. 132, p. 110672, out. 2019.

ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1048–1054, jan. 2007.

ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 93–100, mar. 2011.

RUBIN, C. S. *et al.* Development of hormone receptors and hormonal responsiveness *in vitro*: Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 20, p. 7570–7578, out. 1978.

RUSSELL, T. R.; HO, R. Conversion of 3T3 fibroblasts into adipose cells: triggering of differentiation by prostaglandin F<sub>2</sub>α and 1-methyl-3-isobutyl xanthine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 12, p. 4516–4520, dez. 1976.

SAREILA, O. *et al.* NOX2 Complex–Derived ROS as Immune Regulators. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 8, p. 2197–2208, 15 out. 2011.

SARJEANT, K.; STEPHENS, J. M. Adipogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 9, p. a008417–a008417, 1 set. 2012.

SAVINI, I. *et al.* Obesity-Associated Oxidative Stress: Strategies Finalized to Improve Redox State. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10497–10538, 21 maio 2013.

SINGH, A. K. *et al.* Brown adipose tissue derived ANGPTL4 controls glucose and lipid metabolism and regulates thermogenesis. **Molecular Metabolism**, v. 11, p. 59–69, maio 2018.

STYNER, M. *et al.* Indomethacin promotes adipogenesis of mesenchymal stem cells through a cyclooxygenase independent mechanism. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, n. 4, p. 1042–1050, 1 nov. 2010.

SUN, L. *et al.* Adipogenic differentiating agents regulate expression of fatty acid binding protein and CD36 in the J744 macrophage cell line. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 10, p. 1877–1886, out. 2003.

TAKAHASHI, J. A. *et al.* Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. **Natural Product Research**, v. 20, n. 1, p. 21–26, jan. 2006.

TODARO, G. J.; GREEN, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. **Journal of Cell Biology**, v. 17, n. 2, p. 299–313, 1 maio 1963.

TORMOS, K. V. *et al.* Mitochondrial Complex III ROS Regulate Adipocyte Differentiation. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 537–544, out. 2011.

TUNGMUNNITHUM, D. *et al.* Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 93, 25 ago. 2018.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, mar. 2006.

**VIGITEL BRASIL 2020 - VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO — Português (Brasil).** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vigitel/relatorio-vigitel-2020-original.pdf/view>>.

Acesso em: 14 set. 2022.

**VIGITEL BRASIL 2021 - VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO — Português (Brasil).** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vigitel/vigitel-brasil-2021-estimativas-sobre-frequencia-e-distribuicao-sociodemografica-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas/>>. Acesso em: 14 set. 2022.

VILAR, JB. *et al.* Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 141–147, fev. 2008.

VITALI, A. *et al.* The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 4, p. 619–629, abr. 2012.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 185–194, jan. 2010.

WANG, X.; HAI, C. Redox modulation of adipocyte differentiation: hypothesis of “Redox Chain” and novel insights into intervention of adipogenesis and obesity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 99–125, dez. 2015.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8896–8907, 1 out. 2007.

YANG, J.-Y.; DELLA-FERA, M. A.; BAILE, C. A. Guggulsterone Inhibits Adipocyte Differentiation and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Cells. **Obesity**, v. 16, n. 1, p. 16–22, jan. 2008.

ZEBISCH, K. *et al.* Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 425, n. 1, p. 88–90, jun. 2012.

ZHANG, P. *et al.* Cistanche promotes the adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. **PloS One**, v. 17, n. 3, p. e0264772, 2022.

ZHAO, X. *et al.* A comparison of methods for effective differentiation of the frozen-thawed 3T3-L1 cells. **Analytical Biochemistry**, v. 568, p. 57–64, mar. 2019.

ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA, H. *et al.* Plant Extracts and Reactive Oxygen Species as Two Counteracting Agents with Anti- and Pro-Obesity Properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4556, 14 set. 2019.