



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

Avaliação da capacidade antioxidante, antiglicante e de inibição enzimática *in vitro*
e *ex vivo* do extrato etanólico de *Centella asiatica* e suas frações orgânicas

Aluno: Ana Luiza Silva Borges

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

Avaliação da capacidade antioxidante, antiglicante e de inibição enzimática *in vitro* e *ex vivo* do extrato etanólico de *Centella asiatica* e suas frações orgânicas

Aluno: Ana Luiza Silva Borges

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.

B732a
2022

Borges, Ana Luiza Silva, 1997-

Avaliação da capacidade antioxidante, antiglicante e de inibição enzimática in vitro e ex vivo do extrato etanólico de *Centella asiatica* e suas frações orgânicas [recurso eletrônico] / Ana Luiza Silva Borges. - 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.2023.8022>

Inclui bibliografia.

1. 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



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

Avaliação da capacidade antioxidante, antiglicante e de inibição enzimática *in vitro* e *ex vivo* do extrato etanólico de *Centella asiatica* e suas frações orgânicas

ALUNO: Ana Luiza Silva Borges

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Foued Salmen Espíndola (Orientador)

Examinadores: Lígia Nunes de Moraes Ribeiro
Eduardo Carvalho Lira

Data da Defesa: 09/12/2022

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 à minha tia Adriana,
que não está mais entre nós, mas marcou
toda a sua vida durante sua existência,
pela sua fé e positividade, mesmo nos
momentos mais difíceis.

Agradecimentos

Gostaria de começar agradecendo aos meus pais, Zilda e Fernando, que com sua dedicação, valores e carinho me conduziram até aqui. À minha irmã, Fernanda, e ao meu cunhado Andrei, pelos momentos felizes de descontração e paz. Aos meus tios, Osvaldo e Túlio e minhas tias Adriana e Nila, pela presença, amor e suporte durante todos esses anos, sem vocês, nada disso seria possível e aos meus primos, Lucas e Pedro, por serem os anjinhos da minha vida.

Agradeço imensamente ao meu amor, Vinícius Bittar, parceiro da vida e do laboratório, pelos momentos vividos até aqui. Você faz tudo valer a pena.

Aos meus amigos, Nágela, Tarsila, Thiago, Bruno, Vitória, Igor, Isabella, Diogo, Felipe de Castro, Felipe Bittar, Mariana, Scarlet, Hugo e Fábio, que me proporcionaram tantos momentos felizes, palavras de conforto e apoio durante toda essa trajetória e, acima de tudo, por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao meu orientador, prof. Dr. Foued Salmen Espíndola, que com sua paixão pela ciência, me orientou e me incentivou a sempre executar meu projeto com amor e excelência.

Às palavras sábias da prof. Dr^a. Renata Roland, que nos momentos de fraqueza, me fortaleceram e me fizeram olhar ao meu redor de um ângulo diferente, agradeço por toda a nossa troca.

Meus sinceros agradecimentos a toda equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (Labibi), Rener, Sol, Renata, Allisson, Rodrigo e Françoise pelos momentos compartilhados, sejam ele bons ou nem tão bons assim, pelo conhecimento e, sobretudo, pela amizade.

Finalmente agradeço à Deus, pela fé e pela luz colocadas no meu caminho.

Sumário

Capítulo 1

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

Capítulo 2

1 – Introdução	11
2 – Metodologia	13
2.1 – Preparo do extrato etanólico e frações das folhas de <i>C. asiatica</i>	13
2.2 – Prospeção fitoquímica.....	13
2.2.1 – Determinação do conteúdo de fenóis totais	14
2.2.2 – Determinação do conteúdo de flavonoides	14
2.2.3 – Determinação do conteúdo de taninos condensados	14
2.3 – Análise por HPLC-ESI-MS/MS	15
2.4 – Atividade antioxidante	15
2.4.1 – FRAP	16
2.4.2 – ORAC	16
2.4.3 - DPPH	16
2.5 – Análise do potencial de inibição de formação de AGEs	17
2.5.1 – Modelo BSA/FRU	18
2.5.2 – Modelo BSA/MGO	18
2.5.3 – Modelo COL/MGO	18
2.5.4 – Modelo LDL/MGO	19
2.5.5 – Modelo ARG/MGO	19
2.6 – Análise <i>ex-vivo</i> em tecido hepático	19
2.6.1 – Processamento do tecido hepático	19
2.6.2 – Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	20
2.7 – Análises da inibição da oxidação e peroxidação da LDL	20
2.7.1 – Isolamento da LDL	21

2.7.2 – Indução da oxidação e peroxidação da LDL	21
2.8 – Análise da inibição enzimática	21
2.8.1 – inibição da atividade da α -amilase	22
2.8.2 – Inibição da atividade da α -glicosidase	22
2.8.3 – Inibição da acetil e butirilcolinesterase	22
2.9 – Atividade antimicrobiana	23
2.10 – Análise estatística	24
3 – Resultados	24
3.1 – Rendimento das frações	24
3.2 – Conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides e taninos condensados presentes em ee-Ca e suas frações	24
3.3 – Análise das frações fa-Ca e fb-Ca por HPLC-ESI-MS/MS	25
3.4 – Atividade antioxidante de ee-Ca e suas frações	27
3.5 – Potencial antiglicante de ee-Ca e suas frações	28
3.6 – Inibição da atividade enzimática de ee-Ca e suas frações	30
3.6.1 – Inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase	30
3.6.2 – Inibição da AChE e BChE	31
3.7 – Inibição da peroxidação lipídica no tecido hepático	32
3.8 – Inibição da oxidação e peroxidação da LDL	33
3.9 – Concentração inibitória mínima (MIC) frente à bactérias cariogênicas e relacionadas a doenças de pele	34
4 – Discussão	35
5 – Conclusão	41
6 – Referências	41

Apresentação

O presente trabalho apresenta a prospecção fitoquímica e as propriedades antioxidantes, antiglicantes, a capacidade de inibição enzimática, inibição da oxidação e peroxidação lipídica da lipoproteína de baixa densidade (LDL), bem como a proteção do tecido hepático em modelo *ex-vivo* e a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e frações orgânicas das folhas de *Centella asiatica*.

O estresse oxidativo é o desbalanço entre a produção de espécies reativas e a capacidade do sistema antioxidante endógeno de neutralizá-las. Este estado desencadeia diversas patologias e pode ser também consequência das mesmas. As plantas medicinais, além do seu potencial farmacológico, possuem metabólitos com propriedades antioxidante e anti-inflamatórias que podem contribuir para conter as espécies reativas, justificando seu estudo.

No capítulo I, o leitor irá se deparar com o referencial teórico da presente pesquisa, explicando e justificando o motivo da mesma.

No capítulo II, introdução, metodologia, resultados e discussão da pesquisa serão apresentados.

CAPITULO I -

1. Fundamentação Teórica

O estado em que há uma produção exacerbada de espécies oxidantes e o sistema antioxidante já não é mais capaz de neutralizá-las, resultando em degeneração nos sistemas biológicos é conhecido como estresse oxidativo e está relacionada com o desenvolvimento de várias doenças, entre elas o mal de Alzheimer, aterosclerose, diabetes mellitus e câncer (Forman & Zhang, 2021).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) desempenham papel importante no estresse oxidativo, uma vez que são as responsáveis por danificar as macromoléculas, como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, resultando na perda da função e distúrbio do meio celular (Forman & Zhang, 2021; Klaunig, 2019).

O estresse oxidativo pode tanto contribuir para o desenvolvimento quanto para a progressão de uma doença (Forman & Zhang, 2021). A aterosclerose é um exemplo clássico de doença em que seu início advém da oxidação parcial da lipoproteína de baixa densidade (LDL) pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), aderindo e acumulando-se na matriz extracelular das células epiteliais que revestem as artérias. Monócitos são recrutados e migram para a região, onde são diferenciados em macrófagos, e captam o LDL oxidado e seu colesterol, porém, se transformando em células espumosas e sofrendo apoptose. O tecido cicatricial, o material de matriz extracelular e células espumosas remanescentes, com o tempo, formam as placas ateroscleróticas, ocluindo as artérias e podendo resultar em acidente vascular cerebral ou infarto (Yuan et al., 2019).

A doença de Alzheimer (DA) é um transtorno neurodegenerativo progressivo que afeta as funções cognitivas e a memória. O intenso metabolismo do neurônio faz com que esse tipo celular esteja mais suscetível ao dano oxidativo, principalmente devido à alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados que reagem com as EROs resultando em sua peroxidação. A oxidação de macromoléculas desse tipo celular e marcadores de estresse oxidativo no sangue tem sido observado em pacientes com DA (Z. Chen & Zhong, 2014; Tönnies & Trushina, 2017).

O acúmulo de peptídeo beta-amilóide (β A) em agregados extracelulares, entre os neurônios é uma característica da DA, e pode induzir a liberação de EROs. Entretanto, o próprio estresse oxidativo pode estimular a deposição de β A (Z. Chen & Zhong, 2014; Manczak et al., 2010; Zhao & Zhao, 2013).

As EROs também têm papel crucial na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) que, por sua vez, também estimulam a produção de espécies reativas. Os AGEs são formados intensamente principalmente em situações de hiperglicemia, envelhecimento e estresse oxidativo a partir de reações não-enzimáticas entre um açúcar redutor e o grupo amino de uma proteína. Quando se ligam ao seu receptor (RAGE) desencadeiam uma série de eventos biológicos, dentre eles, a ativação da NADPH oxidase, contribuindo ainda mais para a produção de EROs (Moldogazieva et al., 2019; Nowotny et al., 2015). Pacientes portadores de diabetes mellitus possuem níveis elevados de AGEs, e o acúmulo dessas moléculas está relacionada a diversas complicações relacionadas a doença (Peppia & Vlassara, 2005).

Portanto, é de extrema importância o controle da glicemia, especialmente em pacientes diabéticos. Uma alternativa para tal controle, é a inibição das hidrolases glicosídicas, como α -amilase e α -glicosidase, reduzindo o índice glicêmico pós-prandial, já que essas enzimas fazem a digestão de carboidratos em monômeros de glicose (Ríos et al., 2015; Tundis et al., 2010).

As plantas medicinais têm sido utilizadas durante séculos para o tratamento do diabetes mellitus e de outras diferentes comorbidades, por isso, o estudo do seu potencial e a prospecção de novos compostos fitoativos se torna relevante devido a acessibilidade e apresenta efeitos colaterais mais brandos quando comparados aos fármacos convencionais (Governa et al., 2018; Maleš et al., 2019; Salehi et al., 2018).

Além disso, os metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais, como os compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides, possuem atividade antioxidante, neutralizando as EROs e auxiliando o sistema antioxidante endógeno frente ao estresse oxidativo. Assim, as plantas medicinais apresentam potencial de tratamento e controle de diversas doenças através do controle do estresse oxidativo (Governa et al., 2018; Pisoschi et al., 2016; Tundis et al., 2010; Xu et al., 2017).

Conhecida popularmente como Gotu Kola e Pegaga, *Centella asiatica* (L.) urb., é uma pequena planta herbácea pertencente à família Apiaceae, nativa de países do sudeste asiático, como Índia, China, Indonésia, Malásia e Sri Lanka, entretanto, também pode ser encontrada no sul da África, Madagascar e em algumas regiões da América Central e do Sul, abundante também em regiões pantanosas da Índia, Irã e Paquistão (Orhan, 2012; Razali et al., 2019).

É uma planta com amplo potencial terapêutico cujas folhas são muito utilizadas em preparos etnofarmacológicos, principalmente na medicina tradicional chinesa e ayurvédica. Atualmente estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido conduzidos e resultados positivos foram observados frente ao tratamento de doenças neurológicas, melhora de funções cognitivas e memória (Hafiz et al., 2020; Nasir et al., 2012; Rather et al., 2018), tratamento da diabetes mellitus, obesidade e doenças cardiovasculares (Kabir et al., 2014; Supkamonseni et al., 2014), potencial cicatrizante e tratamento de diversas doenças da pele (Arribas-López et al., 2022) e ao seu potencial anti-inflamatório e antioxidante (Buranasudja et al., 2021; Sun et al., 2020a).

C. asiatica sintetiza triterpenos como metabólitos secundários, sendo esse grupo de moléculas o mais presente e expressivo nessa planta, como o ácido asiático e ácido madecássico e seus derivados glicosilados, asiaticosídeo e madecassossídeo. O extenso potencial terapêutico dessa planta está relacionado principalmente com a presença desses triterpenos, contudo a presença de compostos fenólicos e flavonoides nas folhas de *C. asiatica* também contribuem para a sua atividade farmacológica. (Hashim et al., 2011a; Sun et al., 2020b; Wong et al., 2021).

A composição e a concentração de triterpenos encontrados em *C. asiatica* pode mudar de acordo com a região do plantio, altitude, iluminação, método de plantio, colheita e secagem (James & Dubery, 2009). Características genotípicas também afetam a quantidade de triterpenos presentes na planta (Das & Mallick, 1991).

Já foram conduzidos diversos estudos com o extrato etanólico, metanólico e aquoso de *C. asiatica* sendo que o conteúdo mais expressivo de triterpenos foi encontrado no extrato etanólico, entretanto, o particionamento desse extrato não é muito estudado (Wong et al., 2021).

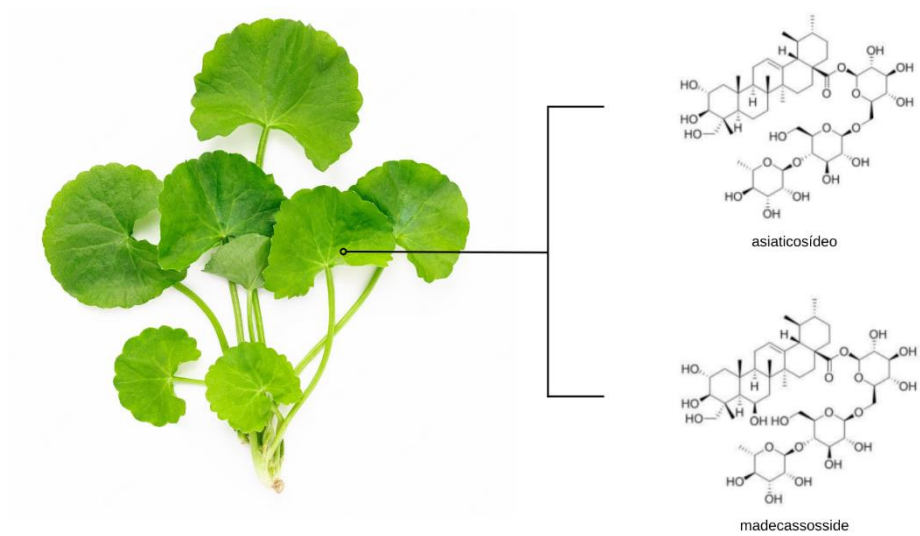


Fig 1: Centella asiática, planta medicinal pertencente à família Apiaceae, é mostrada a esquerda e a estrutura molecular de seus principais triterpenos, asiaticosídeo e madecassossídeo.

CAPÍTULO II

Avaliação da capacidade antioxidante, antiglicante e de inibição enzimática *in vitro* e *ex vivo* do extrato etanólico de *Centella asiatica* e suas frações orgânicas

Resumo

Centella asiatica (L.) urb., conhecida popularmente como Gotu Kola e Pegaga, é uma pequena planta herbácea pertencente à família Apiaceae, encontrada em regiões quentes e pantanosas, como na Índia, Irã e Paquistão, mas é encontrada também em outras regiões da Ásia, Austrália, América Central e do Sul. É uma planta cujas folhas são muito utilizadas em preparos etnofarmacológicos, principalmente na medicina tradicional Indiana (medicina Ayuverdica) e parte de suas propriedades são associadas com a presença dos triterpenos, asiaticosídeo e madecassoside. Considerando seu amplo potencial terapêutico, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* e *ex vivo*, o potencial antiglicante e de inibição enzimática (α -amilase, α -glicosidase, acetilcolinesterase e butirilcolinesterase), a habilidade de inibir a oxidação, glicação e peroxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) e a atividade antimicrobiana. O extrato etanólico (ee-Ca) foi obtido a partir de maceração estática durante 7 dias e as frações orgânicas de hexano (fh-Ca), diclorometano (fd-Ca), acetato de etila (fa-Ca), n-butanol (fb-Ca) e hidrometanólica (fhm-Ca) foram obtidas pelo fracionamento líquido-líquido. Foi realizada a prospecção fitoquímica e elucidação de compostos presentes nas frações fa-Ca e fb-Ca por análises de HPLC-ESI-MS/MS e a capacidade antioxidante do ee-Ca e suas frações orgânicas. A atividade antiglicante foi avaliada a partir da incubação do ee-Ca e frações com proteínas alvos de glicação na presença de indutores de glicação. A inibição da atividade enzimática das enzimas α -amilase, α -glicosidase, acetilcolinesterase e butirilcolinesterase foi determinada por ensaio cinético colorimétrico. Foi analisado o potencial inibitório da oxidação e peroxidação da LDL *in vitro*, dano induzido pela presença de íons Cu^{2+} , através da formação de dienos conjugados e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Ensaios *ex vivo* também foram realizados para investigar as propriedades de inibir a peroxidação lipídica em tecido hepático de rato. A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando cepas cariogênicas e cepas relacionadas a doenças da pele, e dados foram expressos em concentração inibitória mínima (MIC). No ensaio ORAC (capacidade do sequestro do radical peroxil), observou-se que não houve diferença estatística entre a quercetina (controle positivo) e todas as frações, com exceção da fh-Ca e do ee-Ca. Nos

ensaios FRAP (capacidade de redução do íon ferro) e DPPH, fa-Ca ($978,4 \pm 26,05$ $\mu\text{mol Trolox eq/g FRAP}$; $1,601 \pm 0,4841$ DPPH $\mu\text{g/mL}$) e fb-Ca ($753,2 \pm 66,15$ $\mu\text{mol Trolox eq/g FRAP}$; $10,82 \pm 2,592$ $\mu\text{g/mL}$) se destacaram. Essas frações também demonstraram capacidade de inibir acima de 90% a atividade da α -amilase na concentração de 12 $\mu\text{g/mL}$. Não foram observados resultados relevantes frente a inibição da α -glicosidase, entretanto, futuros estudos devem ser realizados para elucidação da inibição das enzimas acetil e butirilcolinesterase. Quanto aos modelos de glicação, o ee-Ca e as fa-Ca e fb-Ca (25.87 ± 5.59 $\mu\text{g/mL}$; $4,146 \pm 2.52$ $\mu\text{g/mL}$ e 6.468 ± 1.10 $\mu\text{g/mL}$) exerceram boa atividade no método BSA/FRU. O ee-Ca e a fa-Ca também expressaram atividade antiglicante nos modelos ARG/MGO e COL/MGO. Na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$, ee-Ca, fd-Ca, fa-Ca e fb-Ca demonstraram inibição da oxidação e peroxidação da LDL *in vitro*, entretanto, não foram capazes de inibir sua glicação. No ensaio de indução de oxidação em tecido hepático *ex vivo*, as dosagens de MDA revelaram que fa-Ca, fb-Ca e fh-Ca ($0,10 \pm 0,001$; $0,10 \pm 0,003$; $0,13 \pm 0,029$ nmol MDA/mg prot) exibiram propriedade de proteção tecidual, inibindo a peroxidação lipídica, quando comparado com os níveis de MDA do tecido hepático oxidado não tratado ($0,36 \pm 0,01$). Em relação aos ensaios antimicrobianos, bactérias cariogênicas (*Streptococcus sobrinus* ATCC 33448; *Streptococcus mitis* ATCC 49456; *Streptococcus mutans* ATCC 25175) foram suscetíveis a fh-Ca e fd-Ca. Portanto, foi possível observar grande potencial antioxidante, antiglicante (BSA/FRU), de inibição da α -amilase, de inibição da oxidação da LDL e peroxidação lipídica exercido pelas fa-Ca e fb-Ca, justificando a continuação do estudo dessas frações em modelos *in vivo*. Em relação às fh-Ca e fd-Ca, foram observados resultados interessantes em relação a inibição do crescimento e bactérias cariogênicas, indicando possível aplicação nessa área.

Palavras-chave: antioxidante, antiglicante, *Centella asiatica*.

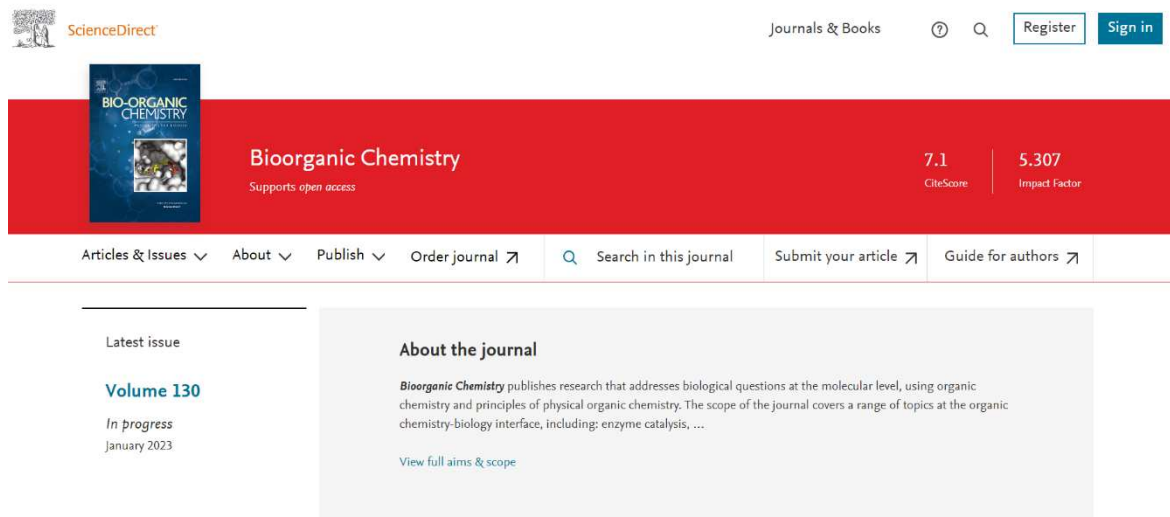
Abstract

Centella asiatica (L.) urb., popularly known as Gotu Kola and Pegaga, is a small herbaceous plant belonging to the Apiaceae family. It is found in hot and swampy regions, such as: India, Iran and Pakistan, also found in other locations of Asia, Australia, Central and South America. It is a plant which leaves are widely used in biomedical applications, mainly in traditional Indian medicine (Ayurvedic medicine). Such properties are associated with the presence of triterpenes, asiaticoside and madecassoside compounds. Considering its broad therapeutic potential, the present study aims to evaluate the *in vitro* and *ex vivo* antioxidant activity, the antiglycant and enzymatic inhibition potential (α -amylase, α -glycosidase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase), ability to inhibit oxidation, glycation and peroxidation of LDL (low density lipoprotein) and its antimicrobial activity. Ethanolic extract (ee-Ca) was obtained from static maceration for 7 days, and organic fractions (fh-Ca; fd-Ca; fa-Ca; fb-Ca; fh-Ca) were obtained by liquid-liquid fractionation. Phytochemical prospecting and elucidation of compounds present in fa-Ca and fb-Ca fractions were performed by HPLC-ESI-MS/MS analyses and the antioxidant capacity of ee-Ca and its organic fractions were also studied. Antiglycant activity was evaluated from ee-Ca incubation and fractions with glycation target proteins in the presence of glycation inducers. Inhibition of α -amylase, α -glycosidase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities was determined by colorimetric kinetic assay. The *in vitro* inhibition of the potential oxidation and peroxidation of LDL in vitro was analyzed through the formation of conjugated dienes and reactive species of thiobarbituric acid (TBARS). *Ex vivo* assays were also conducted to investigate the properties of lipid peroxidation inhibition in liver tissue. Antimicrobial activity was determined using cariogenical bacterial strains and strains related to skin diseases, and data were expressed as the minimum inhibitory concentration (MIC). In the ORAC assay, it was observed that there were no statistical differences among quercetin (positive control) and all fractions, except for fh-Ca and ee-Ca. In the FRAP and DPPH assays, fa-Ca (978.4 ± 26.05 $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ FRAP; 1.601 ± 0.4841 DPPH $\mu\text{g/mL}$) and fb-Ca (753.2 ± 66.15 $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ FRAP; 10.82 ± 2.592 $\mu\text{g/mL}$) stood out. These fractions also

demonstrated the ability to inhibit above 90% the activity of α -amylase at the concentration of 12 $\mu\text{g/mL}$. No relevant results were observed in view of the inhibition of α -glycosidase, however, studies should be conducted to elucidate the inhibition of acetyl and butyrylcholinesterase enzymes. As for the glycation models, the ee-Ca and the fa-Ca and fb-Ca ($25.87 \pm 5.59 \mu\text{g/mL}$; $4,146 \pm 2.52 \mu\text{g/mL}$ and $6,468 \pm 1.10 \mu\text{g/mL}$) had suitable activity in the BSA/FRU experiments. Ee-Ca and fa-Ca also expressed antiglycant activity in the ARG/MGO and COL/MGO models. Moreover, ee-Ca, fd-Ca, fa-Ca and fb-Ca demonstrated *in vitro* inhibition of LDL oxidation and peroxidation at the concentration of 2 $\mu\text{g/mL}$. However, they were not able to inhibit the glycation. In the *ex vivo* liver tissue oxidation induction assay, MDA dosages revealed that fa-Ca, fb-Ca and fh-Ca (0.10 ± 0.001 ; 0.10 ± 0.003 ; $0.13 \pm 0.029 \text{ nmol MDA/mg prot}$, respectively) exhibited tissue protection property, inhibiting lipid peroxidation, when compared with untreated oxidized liver tissue MDA levels (0.36 ± 0.01). In relation to antimicrobial assays, cariogenic bacteria (*Streptococcus sobrinus* ATCC 33448; *Streptococcus mitis* ATCC 49456; *Streptococcus mutans* ATCC 25175) were susceptible to fh-Ca and fd-Ca. Therefore, it was possible to observe great antioxidant potential, antiglycant (BSA/FRU), inhibition of α -amylase, inhibition of LDL oxidation and lipid peroxidation exerted by fa-Ca and fb-Ca, justifying the further studies of these fractions in *in vivo* models. In relation to fh-Ca and fd-Ca, interesting results were observed in relation to growth inhibition and cariogenic bacteria, indicating possible application in the dentistry area.

Key-Words: antioxidant, antiglycant, *Centella asiatica*

Revista escolhida para submissão



The screenshot shows the journal's homepage. At the top, the ScienceDirect logo is on the left, and navigation links for 'Journals & Books', a help icon, a search icon, 'Register', and 'Sign in' are on the right. Below this is a red banner featuring the journal's cover image on the left. To the right of the cover, the journal title 'Bioorganic Chemistry' is displayed, followed by 'Supports open access'. Further right, the journal's metrics are shown: a CiteScore of 7.1 and an Impact Factor of 5.307. Below the banner is a navigation bar with links: 'Articles & Issues', 'About', 'Publish', 'Order journal', 'Search in this journal', 'Submit your article', and 'Guide for authors'. The main content area is divided into two sections. The left section, titled 'Latest issue', highlights 'Volume 130' as 'In progress' for 'January 2023'. The right section, titled 'About the journal', provides a description of the journal's scope, focusing on biological questions at the molecular level, and includes a link to 'View full aims & scope'.

ScienceDirect

Journals & Books ? Q 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](#)

sciencedirect.com/journal/bioorganic-chemistry

Fator de impacto: 5.307

1. Introdução

O estado em que há uma produção exacerbada de espécies oxidantes e o sistema antioxidante já não é mais capaz de neutralizá-las, resultando em degeneração nos sistemas biológicos é conhecido como estresse oxidativo e está relacionada com o desenvolvimento de várias doenças, entre elas o Alzheimer, aterosclerose, diabetes mellitus e câncer (Forman & Zhang, 2021).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) desempenham papel importante no estresse oxidativo, uma vez que são as responsáveis por danificar as macromoléculas, como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, resultando na perda da função e distúrbio do meio celular (Forman & Zhang, 2021; Klaunig, 2019).

As plantas medicinais têm sido utilizadas durante séculos para o tratamento de infinitas comorbidades, por isso, o estudo do seu potencial e a prospecção de novos compostos fitoativos se torna relevante devido a sua acessibilidade e efeitos colaterais mais brandos quando comparados aos fármacos convencionais (Governa et al., 2018; Maleš et al., 2019; Salehi et al., 2018).

Além disso, os metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais, como os compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides, possuem atividade antioxidante, neutralizando as EROs e auxiliando o sistema antioxidante endógeno frente ao estresse oxidativo. Assim, as plantas medicinais apresentam potencial de tratamento e controle de diversas doenças através do controle do estresse oxidativo (Governa et al., 2018; Pisoschi et al., 2016; Tundis et al., 2010; Xu et al., 2017).

Conhecida popularmente como Gotu Kola e Pegaga, *Centella asiatica* (L.) urb., é uma pequena planta herbácea pertencente à família Apiaceae, nativa de países do sudeste asiático, como Índia, China, Indonésia, Malásia e Sri Lanka, entretanto, também pode ser encontrada no sul da África, Madagascar e em algumas regiões da América Central e do Sul, abundante também em regiões pantanosas da Índia, Irã e Paquistão (Orhan, 2012; Razali et al., 2019).

É uma planta com amplo potencial terapêutico cujas folhas são muito utilizadas em preparos farmacológicos, principalmente na medicina tradicional chinesa e ayurvédica. Atualmente estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido conduzidos e resultados positivos foram observados frente ao tratamento de doenças neurológicas, melhora

de funções cognitivas e memória (Hafiz et al., 2020; Nasir et al., 2012; Rather et al., 2018), tratamento da diabetes mellitus, obesidade e doenças cardiovasculares (Kabir et al., 2014; Supkamonseni et al., 2014), potencial cicatrizante e tratamento de diversas doenças da pele (Arribas-López et al., 2022) e ao seu potencial anti-inflamatório e antioxidante (Buranasudja et al., 2021; Sun et al., 2020a).

C. asiatica sintetiza triterpenos como metabólitos secundários, sendo esse grupo de moléculas o mais presente e expressivo nessa planta, como o ácido asiático e ácido madecássico e seus derivados glicosilados, asiaticosídeo e madecassossídeo. O extenso potencial terapêutico dessa planta está relacionado principalmente com a presença desses triterpenos, contudo a presença de compostos fenólicos e flavonoides nas folhas de *C. asiatica* também contribuem para a sua atividade farmacológica. (Hashim et al., 2011a; Sun et al., 2020b; Wong et al., 2021).

A composição e a concentração de triterpenos encontrados em *C. asiatica* pode mudar de acordo com a região do plantio, altitude, iluminação, método de plantio, colheita e secagem (James & Dubery, 2009). Características genotípicas também afetam a quantidade de triterpenos presentes na planta (Das & Mallick, 1991).

Já foram conduzidos diversos estudos com o extrato etanólico, metanólico e aquoso de *C. asiatica* sendo que o conteúdo mais expressivo de triterpenos foi encontrado no extrato etanólico, entretanto, o fracionamento desse extrato não é muito estudado (Wong et al., 2021).

Portanto, o objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial antioxidante do extrato etanólico de *Centella asiatica* e suas frações orgânicas, bem como seu potencial inibitório de formação de AGEs, da inibição da oxidação da LDL, da peroxidação lipídica e da atividade enzimática.

2. Metodologia

2.1 Preparação do extrato e frações das folhas de *C. asiatica*

Para obtenção do extrato etanólico, 500 g de folhas secas e trituradas de *C. asiatica*, adquiridas da empresa Santos Flora Comércio de Ervas Ltda (Mariporã, São Paulo, Brasil), foram submetidas pelo processo de maceração estática em 2 litros de etanol 98% por sete dias à temperatura ambiente na ausência de luz e. Posteriormente, a solução foi filtrada em filtro de papel comum e o restante do solvente removido através da rotaevaporação (Buchi Rotavapor R-215, Suíça) a 40°C sob pressão controlada e reduzida. O extrato etanólico de *Centella asiatica* (ee-Ca) obtido, passou pelo processo de liofilização (L101, Liotop, Brasil) para retirar quaisquer resíduos de água das amostras. Para dar início ao processo de particionamento líquido-líquido a fim da obtenção das frações orgânicas, 4 g de ee-Ca foi diluído em solução hidrometanólica (90%) e foram utilizados 40mL dos seguintes solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: hexano (fh-Ca), diclorometano (fd-Ca), acetato de etila (fa-Ca) e n-butanol (fb-Ca). O resíduo do fracionamento representa a fração hidrometanólica (fhm-Ca) de ee-Ca. Os solventes foram removidos através do processo de secagem e liofilização (L101, Liotop, Brasil) e o ee-Ca e suas frações orgânicas permaneceram em congeladas a -20°C até a data das análises.

2.2 Prospecção fitoquímica

Foi realizada a prospecção fitoquímica do ee-Ca e de suas frações orgânicas (fh-Ca, fd-Ca, fa-Ca, fb-Ca e fhm-Ca) de acordo com os métodos descritos por (Zou et al., 2011), utilizando microplacas de 96 poços. Foi utilizado a concentração de 1 mg/mL das amostras para estes ensaios.

2.2.1 Determinação do conteúdo de fenóis totais

Foi determinado o teor de fenóis totais utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, que é reduzido na presença de compostos fenólicos (Galvão et al., 2018). O ee-Ca e frações foram incubados durante 6 minutos a 25°C com Folin-Ciocalteu 10%. Posteriormente, foi adicionado carbonato de sódio 7% (Na_2CO_3) e as amostras foram incubadas por mais 2 horas a 25 °C na ausência de luz. A absorbância foi mensurada a 760 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). Uma curva analítica de Ácido Gálico foi construída como padrão (serialmente diluída a partir de 2 mg/mL), a fim de quantificar o conteúdo de fenóis totais. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama (mg EAG/g).

2.2.2 Determinação do conteúdo de flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonoides se baseou na reação em que ocorre a formação de um complexo entre o íon de Alumínio (Al^{3+}) com os grupos carbonila e hidroxila presentes em flavonas e flavonois (Popova et al., 2004). O ee-Ca e frações foram incubados com solução de NaNO_2 5% e água destilada durante 6 minutos à 25 °C, na ausência de luz. Posteriormente foi adicionado AlCl_3 10% e o complexo foi incubado por mais 6 minutos à 25 °C. A absorbância foi mensurada a 425 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). Uma curva analítica padrão de Quercetina (serialmente diluída a partir de 2 mg/mL) foi construída para possibilitar o cálculo do conteúdo de flavonoides presentes na amostra. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de quercetina por grama (mg EQ/g).

2.2.3 Determinação do conteúdo de taninos condensados

O conteúdo de taninos condensados (proantocianidinas) foi determinado pela formação de condensados através da reação da vanilina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído) com taninos em HCl (Schofield et al., 2001). O ee-Ca e frações foram incubados com vanilina 4% e HCl durante 15 minutos a 25°C. A absorbância foi mensurada a 500 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). Uma curva analítica padrão foi construída utilizando uma diluição seriada de catequina (a partir de 2 mg/mL). Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de catequina por grama (mg EC/g).

2.3 Análise por HPLC-ESI-MS/MS

As frações fa-Ca e fb-Ca 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 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.

2.4 Atividade Antioxidante

Foram realizados métodos para verificação do potencial antioxidante do ee-Ca e suas frações orgânicas de acordo com Franco et al., (2019). Foram utilizadas concentrações de 285 µg/mL para o ensaio de capacidade do íon Ferro (FRAP); 100 µg/mL para o ensaio de capacidade de sequestro do radical peroxil (ORAC); e para o método DPPH, foi feita uma diluição seriada a partir da concentração de 1 mg/mL para determinar o valor de EC₅₀ de cada amostra nesse ensaio. Os resultados foram expressos em micromol equivalentes de Trolox (µmol ET/g) para FRAP e ORAC e porcentagem de capacidade antioxidante para DPPH.

2.4.1 FRAP

O ensaio FRAP determina o potencial redutor de um composto através da redução do íon Fe^{3+} , que é acompanhada pelo surgimento de coloração azul intensa, devido a reação do Fe^{2+} com o 2,4,6- tris-(2-piridil)-s-triazina (TPTZ). O ee-Ca e suas frações foram incubados com o reagente FRAP (tampão acetato de sódio 300mM (pH 3,6), 2,4,6- tris-(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM e cloreto férrico 20 mM – 10:1:1) em microplaca de 96 poços durante 6 minutos a 37°C. A absorbância foi mensurada a 593 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). Foi realizada uma curva padrão analítica, utilizando Trolox como padrão para quantificar a atividade antioxidante. Quercetina foi utilizado como controle positivo

2.4.2 ORAC

O ensaio ORAC avalia a capacidade do composto de reduzir a taxa de decaimento da fluorescência devido à oxidação da sonda fluorescente causada pela presença de radical peroxil produzido via 2,2'azobis (2-amidinopropano) dicloridrato. As amostras foram incubadas com Fluoresceína 0.085mM e 2,2'azobis (2-amidinopropano) dicloridrato 153mM, ambos diluídos em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4, em microplaca preta de 96 poços e fluorescência (485 nmex/528 nmem) foi mensurada por 90 min a 37°C (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Foi construída uma curva padrão utilizando Trolox para mensurar a capacidade antioxidante no ensaio. Tampão fosfato foi utilizado como controle negativo e Quercetina como controle positivo.

2.4.3 DPPH

Neste ensaio, utiliza-se o radical livre DPPH, cujo elétron desemparelhado confere cor violeta a esse reagente, e, quando estabilizado por composto com capacidade antioxidante, se torna amarelado. O ee-Ca e frações foram incubadas com DPPH 60mM durante 30 minutos a 37°C na ausência de luz e a absorbância foi mensurada a 517 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA). O cálculo da atividade antioxidante é realizado de acordo com a seguinte equação:

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

equação 1

em que A amostra se refere à absorbância do DPPH + amostras, A controle é a absorbância do DPPH e A branco é a absorbância das amostras diluídas em metanol sem DPPH. Metanol foi utilizado como controle negativo e quercetina foi utilizado como controle positivo.

2.5 Análise do potencial de inibição da formação de AGEs

Foram realizados ensaios para analisar o potencial de inibição de formação de produtos de glicação avançada (AGEs). Albumina de soro bovino (BSA), Colágeno (Col), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e arginina (ARG) foram utilizados como alvo de glicação e frutose (FRU) e metilglioxal (MGO) como agentes indutores de glicação. O extrato etanólico, tal como suas frações orgânicas e o controle positivo (quercetina) foram serialmente diluídos a partir da concentração de 10mg/mL para determinação do IC₅₀. O cálculo de porcentagem de inibição de glicação foi realizado de acordo com a seguinte equação:

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

equação 2

onde F amostra se refere ao valor da fluorescência obtida na presença do extrato etanólico, frações e controle positivo; F controle é o valor da fluorescência obtido na ausência de das amostras/tratamento; e F branco é o valor da fluorescência na ausência das amostras/tratamento e do agente indutor de glicação (FRU ou MGO).

2.5.1 Modelo BSA/FRU

No presente modelo, o ee-Ca, suas frações orgânicas e o controle positivo foram incubados com Frutose 1.25 M, BSA 50 mg/mL e tampão fosfato (200 mM, pH 7,4, e azida 0,02%) durante 72 horas a 37°C na ausência de luz. Após este período, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 20% e realizada centrifugação a 10.000xg por 10 minutos, descartando o sobrenadante e o pellet ressuspendido em tampão fosfato. A intensidade da fluorescência foi mensurada a 350nmex/420nmem (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Etanol foi utilizado como controle negativo.

2.5.2 Modelo BSA/MGO

Neste modelo, o ee-Ca, suas frações orgânicas e o controle positivo foram incubados com Metilglioxal (MGO) 53.5 mM, BSA 50 mg/mL e tampão fosfato (200 mM, pH 7,4, e azida 0,02%) durante 72 horas a 37°C na ausência de luz. Posteriormente, foi adicionado TCA 20% seguido da centrifugação a 10.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido com tampão fosfato. A intensidade da fluorescência foi obtida a 340nmex/380nmem (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Etanol foi utilizado como controle negativo.

2.5.3 Modelo COL/MGO

O ee-Ca, suas frações orgânicas e o controle positivo foram incubados com Metilglioxal (MGO) 1 mM, colágeno a 30 µg/mL e tampão fosfato (100 mM, pH 7,4, e azida 0,02%) durante 72 horas a 37°C na ausência de luz. A intensidade de fluorescência foi mensurada a 340nmex/380nmem (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Etanol foi utilizado como controle negativo.

2.5.4 Modelo LDL/MGO

A LDL humana foi isolada e incubada na concentração de 190 ug/mL com Metilglioxal (MGO) 1 mM, tampão fosfato (100 mM, pH 7,4, e azida 0,02%) e o ee-Ca, 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 foi utilizado como controle negativo.

2.5.5 Modelo ARG/MGO

De acordo com esse modelo, o extrato etanólico, suas frações orgânicas e o controle positivo foram incubados com Metilglioxal (MGO) 53.5 mM e Arginina a 106.6 mM e tampão fosfato (200 mM, pH 7,4, e azida 0,02%) durante 72 horas a 37°C na ausência de luz. A intensidade da fluorescência foi mensurada a 340nmex/380nmem (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Etanol foi utilizado como controle negativo.

2.6 Análise ex-vivo em tecido hepático

2.6.1 Processamento do tecido hepático

O método de indução de oxidação tecidual por Fe^{2+} -ascorbato, descrito por Justino et al., (2019), foi utilizado para análise do potencial de inibição de peroxidação lipídica pelo extrato etanólico de *Centella asiatica* e suas frações. Fígados de ratos Wistar saudáveis foram obtidos do biotério central da Universidade Federal de Uberlândia (OFÍCIO Nº 7/2022/CEUA/PROPP/REITO-UFU de 14 de julho de 2022) com 6-8 semanas de vida. Os animais foram eutanasiados e o fígado foi coletado e armazenado a -70 °C até o dia do procedimento. Os fígados foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio com cloreto de potássio (KCl) pH 7,4 (1:10) e centrifugados a 3000xg por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado para a realização das análises de oxidação *ex-vivo* e incubado durante 1 hora a 37 °C com sulfato de ferro (FeSO_4) 0,01 mM, ácido ascórbico 0,01 mM e tampão fosfato (tecido hepático oxidado – THO), também foi adicionado o extrato etanólico, suas frações orgânicas e o controle positivo

(quercetina) na concentração de 1 mg/mL. Etanol foi utilizado como controle negativo do ensaio. Estas amostras foram utilizadas para a realização da dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

2.6.2 Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As amostras foram incubadas com TCA 10% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% durante 2 horas em banho-maria a 100 °C e, em seguida, foi adicionado n-butanol. Foi realizada centrifugação de 3000xg durante 10 minutos e o sobrenadante foi coletado para mensurar a intensidade da fluorescência a 515 nm_{ex}/553 nm_{em} (EnSpire, PerkinElmer, EUA). Os resultados foram expressos em nmol MDA/mg de proteína.

2.7 Análise da inibição da oxidação e peroxidação da LDL

2.7.1 Isolamento da LDL

Amostra de sangue foram coletadas de voluntário saudável e não-fumante (CEP: 5.671.038) 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-Ca e suas frações orgânicas foram avaliados numa concentração de 2 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 no trabalho.

2.8 Análise da inibição enzimática

Ensaio de inibição das enzimas α-amilase, α-glicosidase, acetilcolinesterase e butirilcolinesterase foram realizados para verificar o potencial inibitório de ee-Ca e suas frações orgânicas. Para α-amilase as amostras foram serialmente diluídas a partir de uma concentração de 25 μg/mL. Para α-glicosidase e as colinesterases foi utilizado concentrações de 23 μg/mL e 55 μg/mL, respectivamente. A porcentagem de inibição foi obtida através da seguinte equação:

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

equação 3

Onde A controle se refere a absorbância obtida no cálculo da área sob a curva na ausência de inibidor/amostra, A amostra se refere a absorbância obtida no cálculo da área sob a curva na ausência na presença de ee-Ca, suas frações orgânicas ou a acarbose.

2.8.1 Inibição da atividade da α-amilase

Foi avaliado o potencial de inibição da atividade da enzima α-amilase utilizando uma fração enriquecida de α-amilase (HSA-f), resultante da técnica de cromatografia de troca iônica em resina Q-sefarose (Santos et al., 2012) e o

substrato 2-cloro-4-nitrofenil-4- β -D galactopiranosilmaltosideo (GalG2CNP). Para a realização do ensaio, HSA-f foi diluída em tampão MES (ácido 2-(N-morfolino)- 38 etanossulfônico) 50 mM, contendo 5 mM, tiocianato de potássio 140 mM e cloreto de sódio 300 mM, pH 6,0. O ee-Ca, suas frações orgânicas e o controle positivo (acarbose) foram incubados com HSA-f (1:10) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente foi adicionado o substrato Gal2CNP e a absorbância foi mensurada a 405 nm durante 3 minutos em intervalos de 1 minuto (Versamax, Molecular Devices, EUA). O controle negativo utilizado foi o etanol. O resultado foi expresso em porcentagem de inibição e foi obtido de acordo com a equação 3.

2.8.2 Inibição da atividade da α -glicosidase

O extrato etanólico, suas frações orgânicas e o controle positivo (acarbose) foram incubados durante 20 minutos a 37°C com glutatona reduzida (GSH), diluída em tampão fosfato (50 mM, pH 6,8), e fração enriquecida com α -glicosidase (AG-f) derivada do pó cetônico de intestino de rato. A seguir, foi adicionado o substrato o 4-nitrofenil α -D-glicopiranosideo (p-NPG) e a absorbância foi obtida a 405 nm por 30 minutos (Versamax, Molecular Devices, EUA). Etanol foi utilizado como controle positivo. O resultado foi expresso em porcentagem de inibição e foi obtido de acordo com a equação 3.

2.8.3 Inibição da acetil e butiril colinesterase

A capacidade de inibição das enzimas acetil e butirilcolinesterase (AChE e BChE) foi mensurado de acordo com a metodologia descrita por Rhee et al., (2001), com modificações. O ensaio se baseia na capacidade da enzima de hidrolisar seu substrato, acetiltiocolina ou butiriltiocolina, em tiocolina, que se liga ao 5,5', ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), resultando em 2-nitrobenzoato-5-mercaptopiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato, compostos detectados em 405 nm. Foram utilizados três tampões neste ensaio: tampão A (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8), tampão B (Tris-HCl 50 mmol/L contendo albumina sérica bovina 0,1%) e tampão C (Tris-HCl 50 mmol/L contendo NaCl 0,10 mol/L e MgCl₂6H₂O 0,02 mol/L). O extrato etanólico, frações orgânicas e controles positivos (rivastignina e galantamina) foram diluídas em

tampão A em uma concentração de 5,5 mg/mL, o DTNB foi diluído em tampão B e os substratos foram diluídos em água. A reação foi realizada em microplaca, onde foi adicionado o inibidor em potencial a 5,5 mg/mL, DTNB 3,06mM, tampão B, os substratos (acetiltiocolina ou butiriltiocolina) 3 mM. Em seguida, foi adicionado a enzima (acetil ou butirilcolinesterase) a 0,2 U/mL e a absorbância foi mensurada a 405 nm (Versamax, Molecular Devices, EUA) a cada 30 segundos durante 20 minutos à temperatura de 30°C. O resultado foi expresso em porcentagem de inibição e foi obtido de acordo com a equação 3.

2.9 Atividade antimicrobiana

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, em triplicata utilizando uma placa de 96 poços. O ensaio foi feito seguindo a metodologia de CLSI (2007 e 2012). As amostras, ee-Ca, suas frações orgânicas e a quercetina foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO; Merck, Darmstadt, HE, Germany) 5% e diluídas novamente em (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. Foram testadas doze concentrações (0.195-400 µg/mL). Para bactérias aeróbias, a concentração padronizada no ensaio foi de 5×10^5 colônias por unidade (UFC/mL) e 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 para bactérias anaeróbias, a concentração padronizada no ensaio foi de 1×10^6 UFC/mL e foram incubadas a 37°C em condições aeróbicas padrões. Posteriormente, foi adicionado nos poços 30 µL de solução aquosa 0,02% de resazurina (Sigma). DMSO 5%, utilizado como controle negativo, foi incubado com os microorganismos testados para analisar a toxicidade do meio e foi confirmado que nessa concentração houve crescimento bacteriano.

2.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média, exceto para o cálculo do IC50, em que os resultados foram expressos como média $\pm$ 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 das frações

Para realizar o particionamento líquido-líquido foi utilizado 15 gramas do ee-Ca. Os rendimentos das frações foram: 11,53% fh-Ca; 17,18% fd-Ca; 46,04% fa-Ca; 20,09% fb-Ca e 2,29% fhm-Ca.

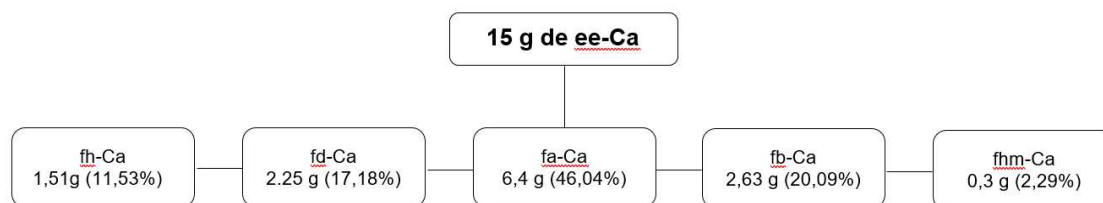


Fig 2: Rendimento do fracionamento do extrato etanólico de *Centella asiatica*. ee-Ca: extrato etanólico de *Centella asiatica*; fh-Ca: fração de hexano; fd-Ca: fração de dicloro-metano; fa-Ca: fração de acetato de etila; fb-Ca: fração de n-butanol; fhm-Ca: fração hidrometanólica. A massa obtida de cada fração é expressa em gramas (g) e seu rendimento é expresso em porcentagem (%).

3.2 Conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides e taninos presentes em ee-Ca e suas frações orgânicas

Tabela 1: Conteúdo de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados presentes no ee-Ca e suas frações.

Amostras	Fenóis Totais (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	Taninos condensados (mg EC/g)
ee-Ca	73,3 ± 0,99 ^{ab}	299,2 ± 18,08 ^a	96,47 ± 7,93 ^a
fh-Ca	8,36 ± 1,19 ^c	123,8 ± 11,5 ^{bc}	10,94 ± 1,98 ^{bd}
fd-Ca	46,65 ± 3,76 ^{ac}	261,5 ± 2,72 ^a	26,36 ± 3,96 ^{bc}
fa-Ca	237,4 ± 26,7 ^d	161,7 ± 8,13 ^b	31,97 ± 3,96 ^c
fb-Ca	111,6 ± 5,95 ^b	103,3 ± 0,72 ^c	82,45 ± 3,96 ^a
fhm-Ca	12,01 ± 3,96 ^c	48,5 ± 4,33 ^d	0 ± 0 ^d

ee-Ca: extrato etanólico de *Centella asiatica*; fh-Ca: fração de hexano; fd-Ca: fração de dicloro-metano; fa-Ca: fração de acetato de etila; fb-Ca: fração de n-butanol; fhm-Ca: fração hidrometanólica. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Foi realizada a quantificação do conteúdo de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados do ee-Ca e suas frações e os resultados são expressos na Tabela 1. Em relação ao teor de compostos fenólicos, a fa-Ca apresenta o maior valor, 237,4 ± 26,7 mg EAG/g, seguido da fb-Ca, 111,6 ± 5,95 mg EAG/g. Todas as amostras, com exceção da fhm-Ca, apresentaram quantidade de flavonoides acima de 100 mg EQ/g, com destaque para o ee-Ca e para fd-Ca (299,2 ± 18,08 e 261,5 ± 2,72 mg EQ/g, respectivamente). Já na quantificação de conteúdo de taninos condensados, o ee-Ca e a fb-Ca apresentaram os maiores valores, acima de 80 mg EC/g.

3.3 Análise das frações fa-Ca e fb-Ca por HPLC-ESI-MS/MS

A frações que mais demonstraram atividade e conteúdo de compostos fenólicos foram as escolhidas para análises de HPLC-ESI-MS/MS para elucidação das moléculas presentes. As frações fa-Ca e fb-Ca foram submetidas a tal análise e grande parte das moléculas foram encontradas em ambas às amostras. Ácido gálico, ácido elágico e rutina são compostos que possuem atividade antioxidante e podem estar relacionadas com essa atividade nas frações.

Tabela 2: compostos identificados nas frações fa-Ca e fb-Ca do ee-Ca por HPLC-ESI-MS/MS

t _R (min)	[M – H] [–]	Massa exata	Erro (ppm)	Ions fragmentos (m/z) EM/EM	Fórmula molecular	Tentativa de identificação	Amostra	Ref.
0,90	133,0133	133,0142	-6,76	5 eV: 115, 87, 89, 71	C ₄ H ₆ O ₅	Ácido málico	fa-Ca, fb- Ca	(Corrêa et al., 2021; Fraternali et al., 2015), MoNA ^a
1,15	355,0310	355,0307	0,84	15 eV: 337 , 293, 249, 205	C ₁₄ H ₁₂ O ₁₁	Ácido quebólico	fa-Ca, fb- Ca	(Li et al., 2021)
1,17	331,0673 [†]	331,0671	0,60	20 eV: 271, 241, 211, 169 , 150, 125	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	Glucogalina (galoil glicosídeo)	fa-Ca, fb- Ca	(Singh et al., 2015)
	169,0139 [†]	169,0142	- 1,77	20 eV: 125 , 107, 79, 69	C ₇ H ₆ O ₅	Ácido gálico	fa-Ca, fb- Ca	(Mena et al., 2012; Singh et al., 2016)
2,27	153,0189	153,0193	- 2,61	20 eV: 109 , 108	C ₇ H ₆ O ₄	Ácido protocatecuico	fa-Ca	(Corrêa et al., 2021; Gómez-Romero et al., 2010), MoNA ^a
2,43	325,0563	325,0565	- 0,61	30 eV: 169 , 125, 111	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	Ácido galoil chiquímico	fa-Ca, fb- Ca	(Abu-Reidah et al., 2015; Singh et al., 2016)
2,45	483,0780	483,0787	1,45	30 eV: 331, 313, 271, 211, 169 , 125	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	Digaloil glicosídeo	fa-Ca	(Mena et al., 2012; Singh et al., 2016)
2,87	633,0742	633,0733	- 1,42	30 eV: 301	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	HHDP galoil glicosídeo isômero I	fa-Ca, fb- Ca	(Mena et al., 2012; Singh et al., 2016)
3,02	183,0298	183,0299	- 0,54	15 eV: 168, 124	C ₈ H ₆ O ₅	Galato de metila	fa-Ca, fb- Ca	(Corrêa et al., 2021; Singh et al., 2016)
3,95	951,0738	951,0745	- 0,74	30 eV: 933 , 907, 301, 169	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₇	Geraniin	fa-Ca, fb- Ca	(Sousa et al., 2017)
4,25	633,0747	633,0733	2,21	30 eV: 463, 419, 301 , 275	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	HHDP galoil glicosídeo isômero II	fa-Ca, fb- Ca	(Mena et al., 2012; Singh et al., 2016)
	291,0146	291,0153	2,41	25 eV: 247 , 219, 191, 175, 145	C ₁₃ H ₈ O ₈	Brevifolin carboxílico ácido	fa-Ca, fb- Ca	(Fraternali et al., 2015; Luo et al., 2020)
5,83	491,0850	491,0831	3,95	25 eV: 476, 328 , 312, 297	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	Di-O- metilelagico ácido glicosídeo	fa-Ca, fb- Ca	MoNA ^b PubChem ^c
5,95	609,1467	609,1461	0,98	30 eV: 463, 300 , 301, 271, 179, 151	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutina	fa-Ca, fb- Ca	(Neves et al., 2018; Quintans-Júnior et al., 2020)
6,18	300,9986	300,9990	- 1,33	30 eV: 284 , 257, 229,	C ₁₄ H ₆ O ₈	Ácido elágico	fa-Ca, fb- Ca	(Fraternali et al., 2015;

				201, 185, 173, 145				Mena et al., 2012)
8,48	327,2185	327,2177	2,44	25 eV: 291, 251, 229, 211, 183, 171, 137, 97, 85	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	Ácido octadecenóico tri hidróxido	fa-Ca	(Sakna et al., 2019)

Nota: fa-Ca: fração de acetato de etila e fb-Ca: fração de n-butanol.

^a<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/MetaboBASE0107>

^b<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00000845290>

^chttps://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_3_-Di-O-Methylellagic-Acid-4_-Glucoside

3.4 Atividade antioxidante de ee-Ca e suas frações orgânicas

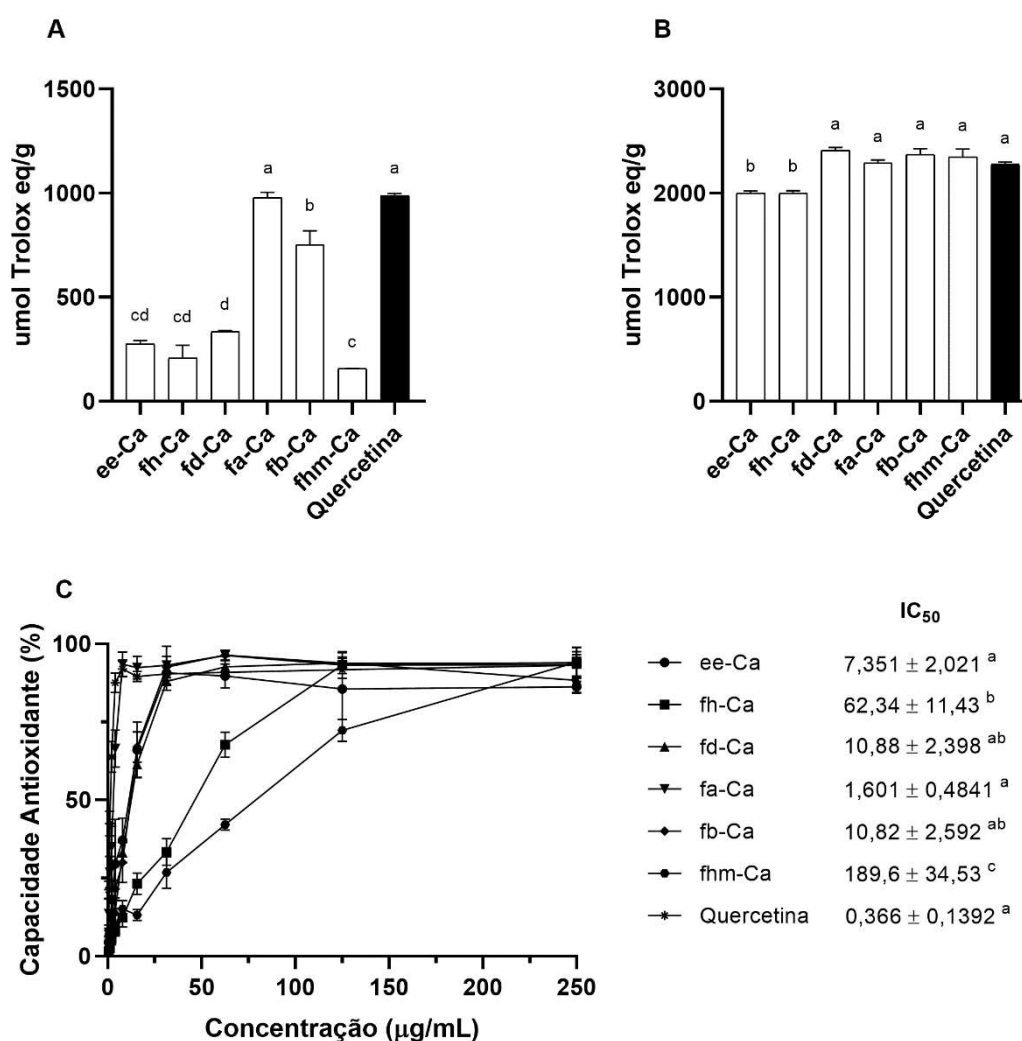


Fig. 3: Capacidade antioxidante do ee-Ca, suas frações orgânicas e o controle positivo quercetina pelos métodos FRAP (A), ORAC (B) e DPPH (C). ee-Ca: extrato etanólico de *Centella asiatica*; fh-Ca: fração de hexano; fd-Ca: fração de dicloro-metano; fa-Ca: fração de acetato de etila; fb-Ca: fração de n-butanol; fhm-Ca: fração hidrometanólica. Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão, para DPPH e média $\pm$ desvio padrão para FRAP e ORAC. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A capacidade antioxidante do ee-Ca e suas frações orgânicas foi avaliada pelos métodos FRAP, ORAC e DPPH (Fig. 2).

No ensaio FRAP (A) a fração fa-Ca e o controle positivo quercetina ($978,4 \pm 26,05$ e $987,8 \pm 10,15$ $\mu\text{mol Trolox eq/g}$, respectivamente) não apresentaram diferença significativa entre si, assim, sendo as duas amostras com maior capacidade antioxidante neste ensaio. A fb-Ca ($753,2 \pm 66,15$ $\mu\text{mol Trolox eq/g}$) também exibiu capacidade antioxidante satisfatória, porém, reduzida em relação à fração fa-Ca e a quercetina.

Já no ensaio ORAC (B), quando comparadas ao controle positivo quercetina, todas as amostras, com exceção da fh-Ca e o ee-Ca, não apresentaram diferença significativa. Apesar da fh-Ca e do ee-Ca apresentarem valores mais baixos em relação ao controle positivo, pode-se afirmar que, ainda assim, possuem capacidade expressiva para inibir a oxidação induzida pelo radical azobis.

Na avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH (C), os valores obtidos foram expressos como IC_{50} , que se refere à concentração mínima necessária para atingir 50% de atividade antioxidante. Como já observado nos outros métodos, a fa-Ca (1.601 ± 0.48 $\mu\text{g/mL}$) se destaca com o menor valor de IC_{50} além do controle positivo ($0.366 \pm 0,1392$ $\mu\text{g/mL}$), não havendo diferença significativa entre eles. Apesar dos valores de IC_{50} do ee-Ca e das fd-Ca e fb-Ca serem levemente mais altos, também não houve diferença estatística com a quercetina e com a fa-Ca.

3.5 Potencial antiglicante de ee-Ca e suas frações orgânicas

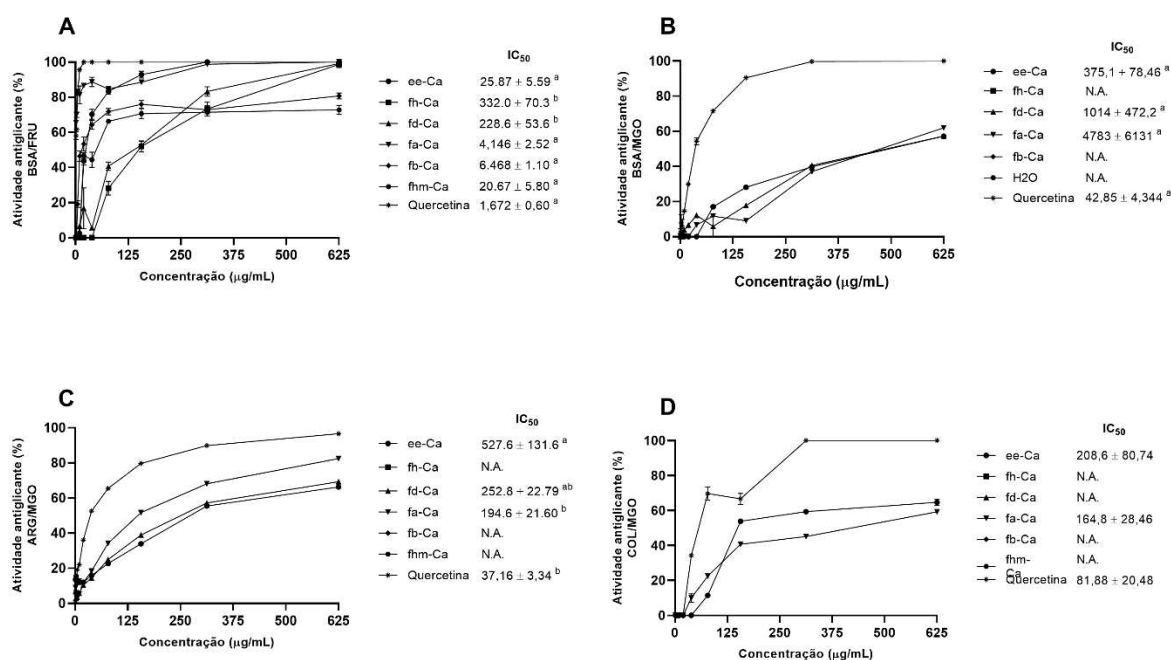


Fig. 4: Efeito antiglicante do ee-Ca e suas frações orgânicas nos modelos BSA/FRU (A), BSA/MGO (B), ARG/MGO (C) e COL/MGO (D). ee-Ca: extrato etanólico de *Centella asiatica*; fh-Ca: fração de hexano; fd-Ca: fração de dicloro-metano; fa-Ca: fração de acetato de etila; fb-Ca: fração de n-butanol; fhm-Ca: fração hidrometanólica. Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). N.A.: significa nenhuma atividade

O potencial antiglicante do ee-Ca e suas frações foi avaliado de acordo com os modelos em que utilizam Frutose (FRU) e Metilglioxal (MGO) como agentes indutores de glicação e BSA, Colágeno e Arginina (ARG) como alvos de glicação.

No método BSA/FRU, a fa-Ca e o controle positivo quercetina exibiram inibição da glicação acima de 80% a partir de 19 $\mu\text{g/mL}$, sendo as duas amostras a apresentarem os menores valores de IC_{50} neste método ($4,146 \pm 2,52 \mu\text{g/mL}$ e $1,672 \pm 0,60 \mu\text{g/mL}$), sendo estatisticamente similares. Do mesmo modo, também não foi observado diferença significativa entre os valores de IC_{50} da quercetina, do ee-Ca e das frações fa-Ca, fb-Ca e fhm-Ca.

Em relação ao método BSA/MGO não foi observado uma notável capacidade antiglicante como foi visto no método anterior. Apesar dos valores de IC_{50} do ee-Ca e das frações fa-Ca e fd-Ca não apresentarem diferença significativa em relação ao controle positivo, é possível perceber que na concentração máxima das amostras utilizada no ensaio, 625 $\mu\text{g/mL}$, a quercetina é capaz de inibir 100% a

glicação do BSA pelo MGO, enquanto as outras amostras apresentam capacidade de inibição de 55 a 65% apenas.

Já no método ARG/MGO, não houve diferença significativa entre os valores de IC_{50} das frações fa-Ca e fd-Ca e do controle positivo (194.6 ± 21.60 ; 252.8 ± 22.79 e $37,16 \pm 3,34$). Na maior concentração utilizada no ensaio, o controle positivo inibiu 96% da glicação, enquanto a fa-Ca inibiu 82% e a fd-Ca inibiu 69%.

Já no modelo COL/MGO, o ee-Ca e a fa-Ca foram as únicas amostras a demonstrarem atividade antiglicante. Não houve diferença significativa entre os valores de IC_{50} dessas amostras com o controle positivo (ee-Ca: $208,6 \pm 80,74$; fa-Ca: $164,8 \pm 28,46$ e Quercetina: $81,88 \pm 20,48$).

O ee-Ca e suas frações orgânicas não foram eficazes em inibir a glicação da LDL pelo MGO.

3.6 Inibição da atividade enzimática de ee-Ca e suas frações orgânicas

3.6.1 Inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase

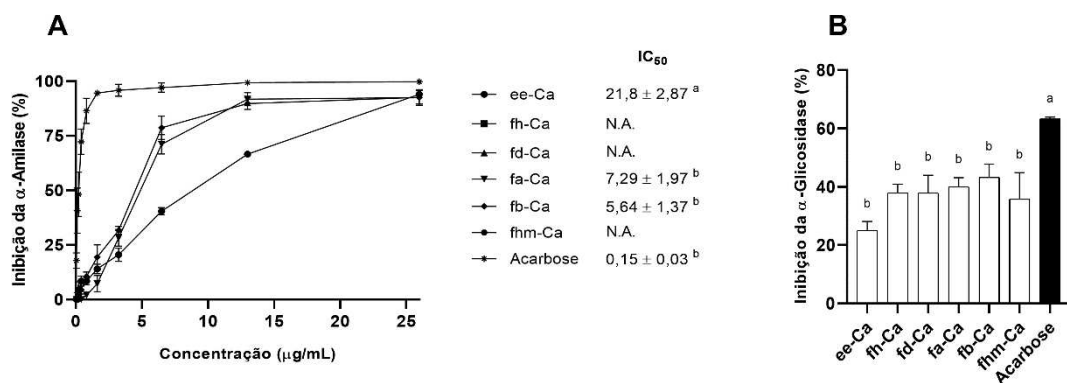


Fig. 5: Avaliação do potencial inibitório da atividade das enzimas α -amilase (A) e α -glicosidase (B) pelo ee-Ca e suas frações orgânicas. ee-Ca: extrato etanólico de *Centella asiatica*; fh-Ca: fração de hexano; fd-Ca: fração de dicloro-metano; fa-Ca: fração de acetato de etila; fb-Ca: fração de n-butanol; fhm-Ca: fração hidrometanólica. Os valores de IC_{50} são expressos como média $\pm$ erro padrão para (A) e média $\pm$ desvio padrão para (B). Letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Foram realizados ensaios para verificar a capacidade de inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase pelo ee-Ca e suas frações (Fig 4). No ensaio de inibição da enzima alfa-amilase, o controle positivo acarbose, inibiu $99,29\% \pm 0,10$ a atividade enzimática a $12 \mu\text{g/mL}$. Enquanto isso, na mesma concentração, as fa-Ca e fb-Ca inibiram $91,80\% \pm 2,12$ e $91,74\% \pm 0,08$, respectivamente. Verificou-se que os valores de IC_{50} das frações de fa-Ca e fb-Ca ($7,29 \pm 1,97$ e $5,64 \pm 1,37 \mu\text{g/mL}$) não apresentaram diferença significativa com o controle positivo, Acarbose ($0,15 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$). O ee-Ca apresentou valor de IC_{50} maior do que as frações citadas acima, ou seja, exibiu menor potencial inibitório da enzima. Na concentração de $12 \mu\text{g/mL}$, inibiu $72,67\% \pm 1,01$. Já nas análises de inibição da enzima alfa-glicosidase, a Acarbose obteve um valor de inibição de $63,28 \pm 0,60\%$ a uma concentração de $231,4 \mu\text{g/mL}$. Entretanto, o ee-Ca e suas frações, nesta mesma concentração, não apresentaram resultados relevantes quanto à inibição dessa enzima, sendo todos abaixo de 50% .

3.6.2 Inibição da AChE e BChE

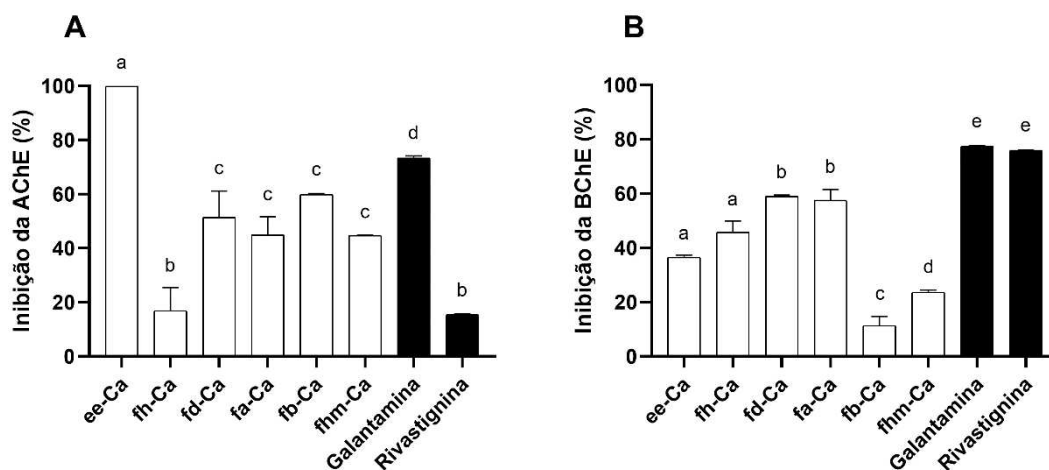


Fig. 6: Avaliação do potencial inibitório da atividade das enzimas acetilcolinesterase (A) e butirilcolinesterase (B) pelo ee-Ca e suas frações orgânicas. ee-Ca: extrato etanólico de *Centella asiatica*; fh-Ca: fração de hexano; fd-Ca: fração de dicloro-metano; fa-Ca: fração de acetato de etila; fb-Ca: fração de n-butanol; fhm-Ca: fração hidrometanólica. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A inibição das colinesterases (AChE e BChE) pelo ee-Ca e suas frações orgânicas também foi avaliado no presente estudo e os resultados estão presentes na Fig. 5. O controle positivo para o ensaio de inibição da AChE foi a galantamina, apresentando um percentual de inibição de $73,4 \pm 0,69 \%$ na concentração de $550 \mu\text{g/mL}$. As frações fd-Ca ($51,36 \pm 9,8 \%$), fa-Ca ($44,84 \pm 6,75 \%$), fb-Ca ($59,88 \pm 0,3 \%$) e fhm-Ca ($44,73 \pm 0,03 \%$) apresentarem inibição reduzida significativa em relação à galantamina na mesma concentração, entretanto, valores que devem ser considerados. O ee-Ca apresentou $99,9 \pm 0,14 \%$ de inibição, superando estatisticamente o controle positivo, porém, apresentou apenas $36,44 \pm 0,82 \%$ de inibição da atividade de BChE. Ambos os controles, galantamina e rivastignina, demonstraram inibição a BChE ($77,34 \pm 0,34 \%$ e $75,89 \pm 0,27\%$, respectivamente). As frações fd-Ca ($58,92 \pm 0,55 \%$) e fa-Ca ($57,43 \pm 4,12 \%$), apesar de inibição reduzida significativa em relação aos controles, apresentaram valores notórios.

3.7 Inibição da peroxidação lipídica no tecido hepático em modelo *ex-vivo*

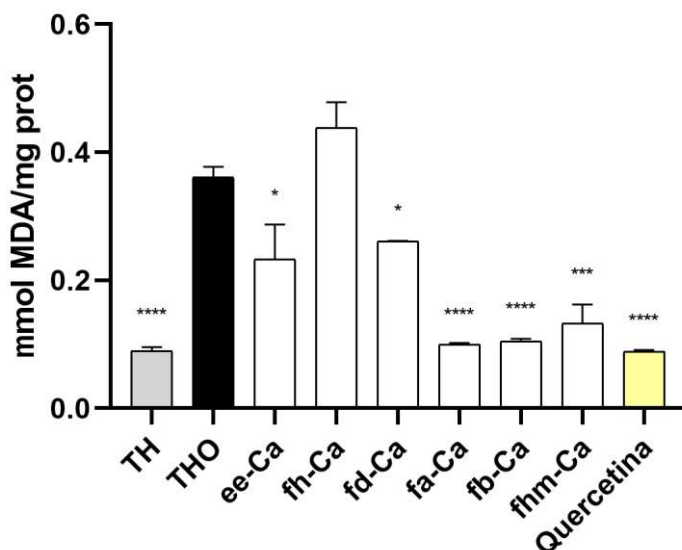


Fig 7: Análise da capacidade de inibição da peroxidação lipídica em tecido hepático. TH: tecido hepático; THO: tecido hepático oxidado; as demais barras representam amostra THO tratadas com ee-Ca, suas frações orgânicas e controle positivo, Quercetina. ee-Ca: extrato etanólico de *Centella asiatica*; fh-Ca: fração de hexano; fd-Ca: fração de dicloro-metano; fa-Ca: fração de acetato de etila; fb-Ca: fração de n-butanol; fhm-Ca: fração hidrometanólica. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao THO.

Também foi avaliado a capacidade de inibição da peroxidação lipídica em tecido hepático (Fig 6). As frações que apresentaram maior potencial antioxidante, fa-Ca e fb-Ca, também foram as que mais protegeram o tecido da peroxidação lipídica, apresentando diferença significativa quando comparadas ao controle THO ($p < 0,0001$). O controle positivo, quercetina, e a fhm-Ca também demonstraram eficácia para impedir a peroxidação, não demonstrando diferença significativa entre as frações citadas acima. Observa-se também que os níveis de malondialdeído (MDA) são reduzidos na presença de ee-Ca e fd-Ca, quando comparados com o THO ($p < 0,05$).

3.8 Inibição da oxidação e peroxidação da LDL

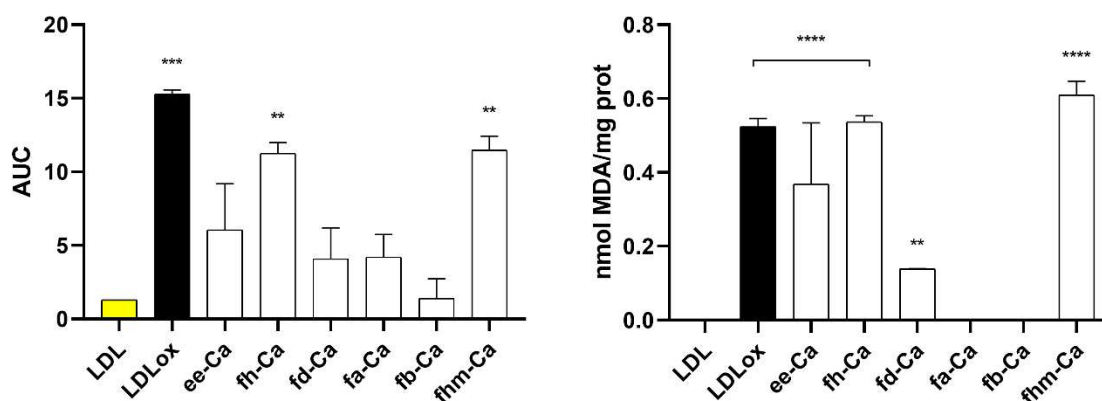


Fig 8.: Avaliação da inibição da oxidação e peroxidação da LDL pelo ee-Ca e suas frações. ee-Ca: extrato etanólico de *Centella asiatica*; fh-Ca: fração de hexano; fd-Ca: fração de dicloro-metano; fa-Ca: fração de acetato de etila; fb-Ca: fração de n-butanol; fhm-Ca: fração hidrometanólica. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em relação a LDL nativa.

A inibição da oxidação e peroxidação da LDL por íons de Cu^{2+} por ee-Ca e suas frações orgânicas foi avaliado. Foi observado que ee-Ca e suas frações fd-Ca, fa-Ca e fb-Ca foram capazes de inibir a oxidação da LDL, não apresentando diferença significativa com a LDL nativa (sem presença do Cu^{2+}). Em relação à peroxidação lipídica da LDL, as frações fd-Ca, fa-Ca e fb-Ca reduziram os níveis de MDA

formados, entretanto, o ee-Ca que inibiu a oxidação, não inibiu a peroxidação da porção lipídica da lipoproteína.

3.9 Concentração Inibitória Mínima (MIC) frente a bactérias cariogênicas e de pele

Tabela 3: Avaliação da atividade antimicrobiana de ee-Ca e suas frações orgânicas frente a bactérias cariogênicas.

Resultados em µg/mL							
BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS							
<i>C. asiatica</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4082	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 29975	<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33448	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456	<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC 11578
ee-Ca	>2000	250	125	62,5	62,5	125	1000
fh-Ca	1000	125	15,6	15,6	31,25	15,6	62,5
fd-Ca	2000	250	125	31,25	31,25	125	250
fb-Ca	>2000	250	250	250	500	250	250
fa-Ca	>2000	250	250	250	250	250	250
fhm-Ca	1000	250	500	500	500	250	1000
Quercetina	2000	500	500	500	500	250	500
Clorexidina	3,688	0,922	0,922	3,688	1,844	0,922	1,844

ee-Ca: extrato etanólico de *Centella asiatica*; fh-Ca: fração de hexano; fd-Ca: fração de dicloro-metano; fa-Ca: fração de acetato de etila; fb-Ca: fração de n-butanol; fhm-Ca: fração hidrometanólica. Concentrações das amostras avaliadas frente às bactérias = 0,98 µg/mL a 2000 µg/mL. Concentrações da Clorexidina avaliadas frente às bactérias = 0,115 a 59,0 µg/mL.

Tabela 4: Avaliação da atividade antimicrobiana de ee-Ca e suas frações orgânicas frente a bactérias relacionadas a doenças da pele.

Resultados em µg/mL				
BACTÉRIAS PELE				
<i>C. asiatica</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-Ca	1000	250	500	125
fh-Ca	500	250	500	125
fd-Ca	1000	125	500	125
fb-Ca	250	62,5	500	125
fa-Ca	500	12,5	2000	125
fhm-Ca	62,5	250	500	125
Quercetina	500	62,5	2000	250
Cloranfenicol	-	-	-	>5,9
Gentamicina	0,7375	0,0461	0,7375	-

ee-Ca: extrato etanólico de *Centella asiatica*; fh-Ca: fração de hexano; fd-Ca: fração de dicloro-metano; fa-Ca: fração de acetato de etila; fb-Ca: fração de n-butanol; fhm-Ca: fração hidrometanólica. -: Não avaliado. Concentrações das amostras avaliadas frente às bactérias = 0,98

µg/mL a 2000 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 5: Avaliação da atividade antimicrobiana de ee-Ca e suas frações orgânicas frente a bactéria anaeróbia *C. acnes* relacionada a doenças da pele.

BACTÉRIAS PELE - Anaeróbia	
<i>C. asiatica</i>	<i>Cutibacterium acnes</i> ATCC 11827
ee-Ca	500
fh-Ca	250
fd-Ca	1000
fb-Ca	250
fa-Ca	250
fhm-Ca	500
Quercetina	1000
Gentamicina	5,9

ee-Ca: extrato etanólico de *Centella asiatica*; fh-Ca: fração de hexano; fd-Ca: fração de dicloro-metano; fa-Ca: fração de acetato de etila; fb-Ca: fração de n-butanol; fhm-Ca: fração hidrometanólica. Concentrações das amostras avaliadas frente às bactérias = 0,98 µg/mL a 2000 µg/mL. Concentrações do controle positivo testado Gentamicina= 0,0115 µg /mL a 5,9 µg/mL.

A atividade antimicrobiana do ee-Ca e suas frações orgânicas foi avaliada frente a bactérias relacionadas ao desenvolvimento da cárie e de doenças cutâneas. As frações fh-Ca e fd-Ca apresentaram inibição frente a algumas bactérias cariogênicas. A fração fh-Ca apresentou valores de MIC de 15,6 µg/mL para *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus mutans* e 31,25 µg/mL para *Streptococcus sanguinis*. Já a fração fd-Ca apresentou valor de MIC de 31,25 µg/mL para *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*. A fb-Ca apresentou boa inibição contra *Staphylococcus epidermitis*, com valor de MIC de 12.5 µg/mL.

4. Discussão

Apesar de existirem inúmeros estudos avaliando o potencial terapêutico do extrato das folhas de *Centella asiatica* e de seus triterpenos isolados, a análise de seu fracionamento ainda é pouco explorada. Por isso, este trabalho avaliou a capacidade antioxidante, atividade de inibição enzimática e da formação de AGEs, a inibição da oxidação, peroxidação e glicação da LDL *in vitro*, inibição da peroxidação lipídica em tecido hepático *ex vivo* e atividade antimicrobiana do EE-Ca e suas frações orgânicas (fh-Ca, fd-Ca, fa-Ca, fb-Ca e fhm-Ca).

Os polifenóis são metabólitos secundários que ocorrem naturalmente nas plantas. Esses compostos possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória (Rahman et al., 2022), antiglicante (Anwar et al., 2021) e possuem potencial inibitório da atividade de enzimas como α -amilase e α -glicosidase (Taslimi & Gulçin, 2017; Zhou et al., 2021). Por essa razão, o potencial farmacológico dos compostos fenólicos tem sido amplamente estudado na atualidade.

De acordo com as análises de prospecção fitoquímica, foi possível observar alto teor de compostos fenólicos e flavonoides em fa-Ca e fb-Ca (Tabela 1), justificando a capacidade antioxidante superior nessas frações nos ensaios FRAP, ORAC e DPPH (Fig 2). Essas classes de moléculas, além de possuírem atividade antioxidante, apresentam potencial quelante de íons de metais de transição, inibindo a produção de ROS (Dai & Mumper, 2010; Kampa et al., 2007). Estudos já relataram a capacidade de redução de Fe^{3+} pelo extrato aquoso e etanólico de *C. asiatica* (Kulkarni et al., 2011; Rattanakom & Yasurin, 2015), contudo, o fracionamento do extrato etanólico demonstrou um aumento da capacidade antioxidante e de redução de metais de transição.

No sequestro de DPPH, o ee-Ca apresentou IC_{50} de $7,35 \pm 2,02 \mu\text{g/mL}$, enquanto nos estudos de Kumari et al., (2016) e Pittella et al., (2009), o extrato aquoso de CA apresentou valores de IC_{50} de $9.62 \pm 0.88 \mu\text{g/mL}$ e $31.25 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A fa-Ca apresentou $\text{IC}_{50} = 1,60 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$, enquanto segundo Marques et al., (2015), a fração de acetato de etila derivada do extrato aquoso de *C. asiatica* apresentou valor de IC_{50} de $38.86 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$. Vale destacar que o

teor de compostos fenólicos encontrados no presente estudo é cerca de 10 vezes maior do que o teor encontrado no estudo de Marques et al., (2015). O solvente utilizado no processo de maceração pode alterar a taxa de moléculas extraídas. De acordo com as análises de HPLC-ESI-MS/MS foram encontrados ácido gálico, ácido elágico e rutina na fa-Ca, compostos com alto potencial antioxidante (Tabela 2). Os triterpenos, como asiaticosídeo e madecassosídeo, também possuem atividade antioxidante, e podem estar relacionados com a inibição do radical DDPH (Razali et al., 2019). As frações fh-Ca e fd-Ca, também apresentaram níveis elevados de flavonoides (Tabela 1), entretanto, apresentaram capacidade antioxidante reduzida nos ensaios FRAP e DPPH (Fig. 2).

A glicação é uma reação não-enzimática entre um açúcar redutor e o grupo amino pertencente a uma proteína, resultando na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Thornalley, 2005). Proteínas como BSA e colágeno e o aminoácido arginina foram incubados com agentes indutores de glicação, como Frutose e Metilglioxal, uma molécula dicarbonil formada na glicólise, para verificar se o ee-Ca e suas frações conseguem inibir a formação dos AGEs, visto que a glicação é uma das principais causas de danos espontâneos às proteínas (van Bussel et al., 2017). Nos modelos de glicação estudados, observou-se potente inibição apenas em BSA/FRU, em que ee-Ca, fa-Ca, fb-Ca e fhm-Ca não apresentaram diferença estatística dos seus valores de IC₅₀ em relação ao controle positivo, quercetina. Nos outros modelos, que utilizam MGO como agente indutor de glicação, a atividade antiglicante do extrato etanólico e suas frações foi moderada, visto que o MGO é um dos agentes glicantes mais intensos, podendo ser até 50000 vezes mais potente do que a glicose (Thornalley, 2005). O extrato de *C. asiatica* enriquecido com compostos fenólicos, a uma concentração de 500 µg/mL, inibiu 38% da formação de AGEs em modelo de BSA glicado com glicose (Eze & Tola, 2020), contudo, neste trabalho foi mostrado que ee-Ca, fd-Ca e fa-Ca inibiram de 36 a 41% a glicação em modelo BSA/MGO. Outro estudo também reportou que o extrato metanólico de *C. asiatica* a 1 mg/mL inibiu em 20% a formação de AGEs em modelo BSA/MGO (Alqahtani et al., 2021).

Devido à extensa utilização da *C. asiatica* no setor cosmético e suas propriedades cicatrizantes (Bylka et al., 2013; Park, 2021), é importante investigar

a propriedade antiglicante do colágeno, uma proteína de vida longa e, por isso, mais suscetível a sofrer modificações, como a formação de AGEs (Verzijl et al., 2000). O ee-Ca e fa-Ca inibiram cerca de 60% da glicação do colágeno a uma concentração de 625 µg/mL, apresentando potencial em auxiliar no tratamento de feridas crônicas, especialmente em situações de hiperglicemia, e reforça sua propriedade de proteção da pele frente ao envelhecimento. A glicação do colágeno (e de outras proteínas da matriz extracelular) afeta as propriedades químicas, físicas e mecânicas dessa proteína, comprometendo os processos de cicatrização e regeneração, principalmente em pacientes diabéticos (Alqahtani et al., 2021; Niu et al., 2008). Um estudo conduzido por Alqahtani et al., (2021) mostrou que a fração acetato de etila de *Centella cordifolia* otimizou o espalhamento e adesão celular de fibroblastos e queratinócitos nos poços revestidos com colágeno glicado com MGO.

O estresse oxidativo é um fator que pode estimular a oxidação da LDL e promover o desenvolvimento da aterosclerose (Kattoor et al., 2017), portanto, é necessário o estudo de compostos com capacidade antioxidante e que reduzam o estresse oxidativo, a fim de inibir a oxidação dessa lipoproteína e evitar o surgimento de placas ateroscleróticas. Estudos conduzidos por (Meyer et al., 1997) revelaram que os compostos fenólicos interagem de forma física com o núcleo lipídico da LDL, além de possuir atividade quelante de íons Cu^{2+} . O ee-Ca, fa-Ca e fb-Ca, devido ao seu potencial antioxidante e expressivo conteúdo de compostos fenólicos, foram capazes de inibir a oxidação e peroxidação da LDL, sendo possíveis candidatos para estudo *in vivo*. Apesar da fd-Ca não ter apresentado capacidade antioxidante similar às frações supracitadas, também protegeu a LDL da oxidação e peroxidação. À vista disso, o aumento do consumo de alimentos ricos em polifenóis pode auxiliar na prevenção da aterosclerose. O asiaticosídeo, triterpeno marcador de *C. asiatica*, demonstrou potencial de prevenir a progressão da aterosclerose através da inibição da hiperpermeabilidade endotelial e do aumento da expressão de moléculas de adesão em células HUVEC expostas a ox-LDL (Jing et al., 2018).

As fa-Ca, fb-Ca e fhm-Ca se mostraram eficazes para inibir a peroxidação lipídica em tecido hepático oxidado por meio do método Fe^{2+} -ascorbato (Fig 6). Apesar de demonstrar pouca atividade nos ensaios anteriores e baixo teor de

compostos fenólicos e flavonoides em relação às outras frações, a fhm-Ca surpreendeu ao desempenhar proteção hepática frente a indução de oxidação. Como foi observado por Lu et al., (2021), o extrato butanólico de *C. asiatica* aumentou a viabilidade de hepatócitos L02 frente ao estresse oxidativo induzido por H₂O₂. Outro estudo reportou que o extrato aquoso de *C. asiatica* inibiu a peroxidação lipídica em homogeneizado de tecido hepático induzida por Fe²⁺-ascorbato (Kumari et al., 2016). Estudos evidenciam que a presença de compostos fenólicos e flavonoides, devido a sua capacidade antioxidante, exercem efeito protetor em tecido hepático. Isso justifica a inibição da peroxidação lipídica por parte de fa-Ca e fb-Ca, pois além de ter sido observado um alto teor de compostos fenólicos e flavonoides nessas frações, o ácido gálico e ácido elágico, compostos encontrados nessas frações, já apresentaram inibição da peroxidação lipídica e redução de ROS em trabalhos anteriores (Aishwarya et al., 2021; C. H. Chen et al., 2007; Gupta & Pandey, 2020). Os triterpenos presentes em *C. asiatica*, aisaticosídeo e madecassossídeo, também desempenham inibição da peroxidação lipídica, reduzindo níveis de MDA no cérebro de ratos pré-tratados com d-Galactose (Lin et al., 2014), no fígado de ratos hiperlipidêmicos (Zhao et al., 2014), em modelo de reparo tecidual (Shukla et al., 1999).

A inibição das hidrolases glicosídicas pode ser uma alternativa interessante para o controle do Diabetes mellitus e suas complicações. As frações fa-Ca e fb-Ca exibiram eficiente potencial inibitório da enzima α -amilase, não apresentando diferença significativa com a acarbose. A inibição dessa enzima pelo extrato etanólico de *C. asiatica* já foi reportado e, de acordo com estudos de Supkamonseni et al., (2014), foi observado um valor de IC₅₀ de 536.51 $\pm$ 8.80 μ g/mL para inibição da α -amilase, enquanto no presente trabalho o IC₅₀ para ee-Ca obtido foi de 21,8 $\pm$ 2,87 μ g/mL. Os compostos fenólicos têm exibido propriedade de inibição da α -amilase devido à posição e quantidade de grupos hidroxila livres (Gonçalves et al., 2017; Rasouli et al., 2017), isso explica a potente inibição dessa enzima por fa-Ca e fb-Ca, uma vez que essas frações apresentaram conteúdo expressivo de fenóis totais. Compostos presentes em fa-Ca, como ácido gálico, ácido elágico e rutina possuem várias hidroxilas livres, de modo que podem contribuir com a inibição da α -amilase. As folhas de *C. asiática*, utilizadas para o preparo de saladas e chás,

contêm grandes quantidades de fibras insolúveis, reduzindo o tempo de trânsito no trato gastrointestinal e, dessa forma, reduzindo também a digestão e absorção de di e polissacarídeos vindos da dieta, resultando em picos glicêmicos mais baixos. Com isso, estudos *in vivo* têm demonstrado efeitos benéficos do uso dessa planta para auxiliar no tratamento de pacientes portadores de Diabetes mellitus (Jamil et al., 2007; Kabir et al., 2014; Supkamonseni et al., 2014). Apesar da presença de grupos galoil em fa-Ca, fortes inibidores da α -glicosidase, não foi observado inibição da atividade dessa enzima por essa fração, provavelmente devido a uma concentração não relevante desses grupos (Justino et al., 2020).

As colinesterases, AChE e a BChE, são serina hidrolases que hidrolisam os neurotransmissores acetil e butirilcolina em acetato e butiril e colina na fenda colinérgica. Sua inibição permite com que a acetilcolina ou butirilcolina permaneça mais tempo na fenda, potencializando a transmissão colinérgica, efeito desejado no tratamento de doenças como o Alzheimer (Hafiz et al., 2020; Rather et al., 2018). As frações fd-Ca, fa-Ca, fb-Ca e fhm-Ca demonstraram inibição de 44 a 59% da atividade da AChE enquanto a galantamina, medicamento prescrito para doença de Alzheimer (DA) (Prvulovic et al., 2010), apresentou 73% de inibição. No ensaio de inibição da BChE, as frações fd-Ca e fa-Ca apresentaram inibição da atividade enzimática em $58,92 \pm 0,55$ e $57,43 \pm 4,12$ %, respectivamente. No cérebro saudável, a AChE é a principal responsável pela regulação dos níveis de acetilcolina enquanto que no cérebro com DA, a atividade de BChE aumenta e de AChE permanece a mesma ou é reduzida, assim, ambas as enzimas estão relacionadas com o controle dos níveis de acetilcolina e representam alvos terapêuticos para melhorar o déficit colinérgico em DA (Greig et al., 2002). De acordo com estudos de (Hafiz et al., 2020) o extrato de *C. asiatica* inibiu, de modo dependente da concentração, a AChE em linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Orhan et al., (2013) reportaram inibição de cerca de 50% da atividade enzimática pelo extrato etanólico de *C. asiatica*, contendo 11% de triterpenos (asiaticosídeo e madecassossídeo), a 200 $\mu\text{g/mL}$. O ácido asiático inibe a AChE, como já mostrado em alguns estudos. Segundo (Rather et al., 2018), este composto inibiu a atividade da AChE no córtex e no hipocampo em ratos modelo para Alzheimer. Segundo (Nasir et al., 2012), este triterpeno compete com a

acetilcolina pelo sítio ativo esterásico da enzima em modelo *in vitro*. Estudos que avaliam a inibição da BChE ainda são escassos, mas existem algumas referências que sugerem essa atividade (Hassan & Kumari, 2012; Orhan et al., 2013). Deste modo, é possível sugerir que os triterpenos e polifenóis encontrados em *C. asiatica* estejam relacionados com a propriedade de inibição enzimática (Hashim et al., 2011b; Sun et al., 2020c).

O extrato de *C. asiatica* possui potencial antimicrobiano devido a presença de triterpenoides, que exercem citotoxicidade seletiva e previnem a infecção por patógenos (Idris & Nadzir, 2021). As frações fh-Ca e fd-Ca apresentaram baixos valores de concentração inibitória mínima para bactérias associadas ao desenvolvimento da cárie. A polaridade dos extratos e frações é um fator importante determinante da atividade antimicrobiana. Solventes apolares, como hexano e dicloro-metano, permitem a extração de compostos lipofílicos, que podem promover a ruptura de membrana celular (Cowan, 1999). O extrato dicloro-metano-metanólico de *C. asiatica* inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *B. subtilis*, e *Shigella sonnei*, apontando maior atividade em bactérias gram-negativa (Sieberi et al., 2020). Entretanto, foi observado que as bactérias cariogênicas mais suscetíveis a fh-CA, são gram-positivas.

5. Conclusão

Portanto foi possível observar que as frações fa-Ca e fb-Ca possuem alto teor de compostos fenólicos, justificando sua alta capacidade antioxidante e antiglicante, inibição da oxidação e peroxidação lipídica da LDL e de tecido hepático em modelo *ex-vivo* e inibição da α -amilase justificando a continuação do estudo dessas frações em modelos *in vivo*. As frações fh-Ca e fd-Ca se destacaram em relação a atividade antimicrobiana em bactérias cariogênicas, sugerindo a continuação do estudo nessa área. Em relação as colinesterases, fd-Ca e fa-Ca apresentaram valores de inibição significativo em ambas AChE e BChE, sendo necessários maiores estudos e isolamento de compostos dessas frações para intensificar tal atividade.

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>
- Aishwarya, V., Solai priya, S., & Sivaramakrishnan, V. (2021). Role of ellagic acid for the prevention and treatment of liver diseases. In *Phytotherapy Research* (Vol. 35, Issue 6, pp. 2925–2944). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ptr.7001>
- 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>
- Anwar, S., Khan, S., Almatroudi, A., Khan, A. A., Alsahli, M. A., Almatroodi, S. A., & Rahmani, A. H. (2021). A review on mechanism of inhibition of advanced glycation end products formation by plant derived polyphenolic compounds. In *Molecular Biology Reports* (Vol. 48, Issue 1, pp. 787–805). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06084-0>
- Arribas-López, E., Zand, N., Ojo, O., Snowden, M. J., & Kochhar, T. (2022). A Systematic Review of the Effect of *Centella asiatica* on Wound Healing. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 19, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph19063266>
- Buranasudja, V., Rani, D., Malla, A., Kobtrakul, K., & Vimolmangkang, S. (2021). Insights into antioxidant activities and anti-skin-aging potential of callus extract from *Centella asiatica* (L.). *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92958-7>
- Bylka, W., Znajdek-Awizeń, P., Studzińska-Sroka, E., & Brzezińska, M. (2013). *Centella asiatica* in cosmetology. In *Postepy Dermatologii i Alergologii* (Vol. 30, Issue 1, pp. 46–49). <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33378>
- Chen, C. H., Liu, T. Z., Chen, C. H., Wong, C. H., Chen, C. H., Lu, F. J., & Chen, S. C. (2007). The efficacy of protective effects of tannic acid, gallic acid, ellagic acid, and propyl gallate against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damages in IMR-90 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(8), 962–968. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600230>

- Chen, Z., & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 30, Issue 2, pp. 271–281). Science Press. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1423-y>
- CLSI (2007) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Information Supplement. CLSI Document M100-S17 (M2-A7 and M7-A7), Clinical and laboratory Standards institute, Wayne, 27(1).
- CLSI (2012) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Document M 100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Corrêa, J. G. de S., Bianchin, M., Lopes, A. P., Silva, E., Ames, F. Q., Pomini, A. M., Carpes, S. T., de Carvalho Rinaldi, J., Cabral Melo, R., Kioshima, E. S., Bersani-Amado, C. A., Pilau, E. J., de Carvalho, J. E., Ruiz, A. L. T. G., Visentainer, J. v., & Santin, S. M. de O. (2021). Chemical profile, antioxidant and anti-inflammatory properties of *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) fruits extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 273. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113979>
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. In *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* (Vol. 12, Issue 4).
- 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>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. In *Molecules* (Vol. 15, Issue 10, pp. 7313–7352). <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Das, A., & Mallick, R. (1991). *Correlation between genomic diversity and asiaticoside content in Centella asiatica (L.) Urban.*
- Eze, F. N., & Tola, A. J. (2020). Protein glycation and oxidation inhibitory activity of *Centella asiatica* phenolics (CAP) in glucose-mediated bovine serum albumin glycoxidation. *Food Chemistry*, 332. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127302>
- Forman, H. J., & Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 20, Issue 9, pp. 689–709). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>

- Franco, R. R., Justino, A. B., Martins, M. M., Silva, C. G., Campana, P. R. V., Lopes, J. C. D., de Almeida, V. L., & Espindola, F. S. (2019). Phytoscreening of Vochysiaceae species: Molecular identification by HPLC-ESI-MS/MS and evaluating of their antioxidant activity and inhibitory potential against human α -amylase and protein glycation. *Bioorganic Chemistry*, 91. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103122>
- Fraternale, D., Ricci, D., Verardo, G., Gorassini, A., Stocchi, V., & Sestili, P. (2015). *Activity of Vitis vinifera Tendrils Extract Against Phytopathogenic Fungi*.
- 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>
- 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>
- Gonçalves, S., Moreira, E., Grosso, C., Andrade, P. B., Valentão, P., & Romano, A. (2017). Phenolic profile, antioxidant activity and enzyme inhibitory activities of extracts from aromatic plants used in Mediterranean diet. *Journal of Food Science and Technology*, 54(1), 219–227. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2453-z>
- Governa, P., Baini, G., Borgonetti, V., Cettolin, G., Giachetti, D., Magnano, A. R., Miraldi, E., & Biagi, M. (2018). Phytotherapy in the management of diabetes: A review. In *Molecules* (Vol. 23, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23010105>
- Greig, N. H., Lahiri, D. K., & Sambamurti, K. (2002). Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics*, 14(SUPPL. 1), 77–91. <https://doi.org/10.1017/S1041610203008676>
- Gupta, A., & Pandey, A. K. (2020). Basic Study Aceclofenac-induced hepatotoxicity: An ameliorative effect of *Terminalia bellirica* fruit and ellagic acid. *World Journal of Hepatology*, 12(11), 949–964. <https://doi.org/10.4254/wjh.v12.i11.949>
- Hafiz, Z. Z., Mohd Amin, M. A., Johari James, R. M., Teh, L. K., Salleh, M. Z., & Adenan, M. I. (2020). Inhibitory Effects of Raw-Extract *Centella asiatica* (RECA) on Acetylcholinesterase, Inflammations, and Oxidative Stress

- Activities via in Vitro and in Vivo. *Molecules*, 25(4).
<https://doi.org/10.3390/molecules25040892>
- Hashim, P., Sidek, H., Helan, M. H. M., Sabery, A., Palanisamy, U. D., & Ilham, M. (2011a). Triterpene composition and bioactivities of centella asiatica. *Molecules*, 16(2), 1310–1322. <https://doi.org/10.3390/molecules16021310>
- Hashim, P., Sidek, H., Helan, M. H. M., Sabery, A., Palanisamy, U. D., & Ilham, M. (2011b). Triterpene composition and bioactivities of centella asiatica. *Molecules*, 16(2), 1310–1322. <https://doi.org/10.3390/molecules16021310>
- Hassan, M., & Kumari, P. (2012). *Phytochemical screening, Antioxidant, Anti-Alzheimer and Anti-diabetic activities of Centella asiatica Related papers A review on medicinal properties of Centella asiatica*.
www.scholarsresearchlibrary.com
- Idris, F. N., & Nadzir, M. M. (2021). Comparative studies on different extraction methods of centella asiatica and extracts bioactive compounds effects on antimicrobial activities. In *Antibiotics* (Vol. 10, Issue 4). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10040457>
- James, J. T., & Dubery, I. A. (2009). Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, Centella asiatica (L.) Urban. In *Molecules* (Vol. 14, Issue 10, pp. 3922–3941). <https://doi.org/10.3390/molecules14103922>
- Jamil, S., Nizami, Q., & Salam, M. (2007). Natural Product Radiance Centella asiatica (Linn.) Urban óA Review. In *Review Article Natural Product Radiance* (Vol. 6, Issue 2).
- Jing, L., Haitao, W., Qiong, W., Fu, Z., Nan, Z., & Xuezheng, Z. (2018). Anti inflammatory effect of asiaticoside on human umbilical vein endothelial cells induced by ox-LDL. *Cytotechnology*, 70(2), 855–864.
<https://doi.org/10.1007/s10616-018-0198-4>
- Justino, A. B., de Moura, F. R. B., Franco, R. R., & Espindola, F. S. (2020). α -Glucosidase and non-enzymatic glycation inhibitory potential of Eugenia dysenterica fruit pulp extracts. *Food Bioscience*, 35.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100573>
- Justino, A. 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).
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55779-3>
- Kabir, A. U., Samad, M. bin, Malrina D'costa, N., Akhter, F., Ahmed, A., & Hannan, J. (2014). *Anti-hyperglycemic activity of Centella asiatica is partly mediated by*

carbohydrase inhibition and glucose-fiber binding.

<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/31>

- Kampa, M., Nifli, A. P., Notas, G., & Castanas, E. (2007). Polyphenols and cancer cell growth. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 159, 79–113. https://doi.org/10.1007/112_2006_0702
- Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., & Mehta, J. L. (2017). Oxidative Stress in Atherosclerosis. In *Current Atherosclerosis Reports* (Vol. 19, Issue 11). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>
- Klaunig, J. E. (2019). Oxidative Stress and Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 24(40), 4771–4778. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190215121712>
- Kulkarni, O., Mukherjee, S., Bhandare, R., Jagtap, S., Dugad, S., Pawar, N., & Pawar, P. (2011). Evaluation of comparative free-radical quenching potential of Brahmi (*Bacopa monnieri*) and Mandookparni (*Centella asiatica*). *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)*, 32(2), 258. <https://doi.org/10.4103/0974-8520.92549>
- Kumari, S., Deori, M., Elancheran, R., Kotoky, J., & Devi, R. (2016). In vitro and in vivo antioxidant, anti-hyperlipidemic properties and chemical characterization of *Centella asiatica* (L.) extract. *Frontiers in Pharmacology*, 7(OCT). <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00400>
- Li, Y., Li, Y., & Chen, J. (2021). Screening and identification of acetylcholinesterase inhibitors from *Terminalia chebula* fruits based on ultrafiltration and ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 168. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106438>
- Lin, X., Zhang, S., Huang, R., Wei, L., Tan, S., Liang, C., Lv, S., Chen, Y., Liang, S., Tian, Y., Lu, Z., & Huang, Q. (2014). Protective effect of madecassoside against cognitive impairment induced by d-galactose in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.07.014>
- Lu, J., Chen, C., Gai, R., Qiu, H., Wu, Y., He, Q., & Yang, X. (2021). Protective effects and possible mechanisms of *Centella asiatica* (L.) urban extract against acute and chronic liver injury: Evidence from in vivo and in vitro studies. *Phytotherapy Research*, 35(5), 2785–2796. <https://doi.org/10.1002/ptr.7024>

- Luo, S., Guo, L., Sheng, C., Zhao, Y., Chen, L., Li, C., Jiang, Z., & Tian, H. (2020). Rapid identification and isolation of neuraminidase inhibitors from mockstrawberry (*Duchesnea indica* Andr.) based on ligand fishing combined with HR-ESI-Q-TOF-MS. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(10), 1846–1855. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.001>
- Maleš, Ž., Drvar, D. L., Duka, I., & Žužul, K. (2019). Application of medicinal plants in several dermatovenerological entities. In *Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)* (Vol. 69, Issue 4, pp. 525–531). NLM (Medline). <https://doi.org/10.2478/acph-2019-0045>
- Manczak, M., Mao, P., Calkins, M. J., Cornea, A., Reddy, A. P., Murphy, M. P., Szeto, H. H., Park, B., & Reddy, P. H. (2010). Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(SUPPL.2). <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100564>
- Marques, N. F., Stefanello, S. T., Froeder, A. L. F., Busanello, A., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Soares, F. A. A., & Fachinetto, R. (2015). Centella asiatica and Its Fractions Reduces Lipid Peroxidation Induced by Quinolinic Acid and Sodium Nitroprusside in Rat Brain Regions. *Neurochemical Research*, 40(6), 1197–1210. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1582-5>
- Mena, P., Calani, L., Dall'Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., Crozier, A., & del Rio, D. (2012). Rapid and comprehensive evaluation of (Poly)phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice by UHPLC-MSn. *Molecules*, 17(12), 14821–14840. <https://doi.org/10.3390/molecules171214821>
- Meyer, A. S., Heinonen, M., & Frankel, E. N. (1997). *Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation*.
- Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Mel'Nikova, T. I., Porozov, Y. B., & Terentiev, A. A. (2019). Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/3085756>
- Nasir, M. N., Abdullah, J., Habsah, M., Ghani, R. I., & Rammes, G. (2012). Inhibitory effect of asiatic acid on acetylcholinesterase, excitatory post synaptic potential and locomotor activity. *Phytomedicine*, 19(3–4), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.10.004>
- Neves, N. de A., Stringheta, P. C., Gómez-Alonso, S., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2018). Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of

- jabuticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chemistry*, 252, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.078>
- Niu, Y., Xie, T., Ge, K., Lin, Y., & Lu, S. (2008). *Effects of Extracellular Matrix Glycosylation on Proliferation and Apoptosis of Human Dermal Fibroblasts Via the Receptor for Advanced Glycosylated End Products*.
- Nowotny, K., Jung, T., Höhn, A., Weber, D., & Grune, T. (2015). Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. In *Biomolecules* (Vol. 5, Issue 1, pp. 194–222). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom5010194>
- Orhan, I. E. (2012). *Centella asiatica* (L.) Urban: From traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential. In *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/946259>
- Orhan, I. E., Atasu, E., Senol, F. S., Ozturk, N., Demirci, B., Das, K., & Sekeroglu, N. (2013). Comparative studies on Turkish and Indian *Centella asiatica* (L.) Urban (gotu kola) samples for their enzyme inhibitory and antioxidant effects and phytochemical characterization. *Industrial Crops and Products*, 47, 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.022>
- Park, K. S. (2021). Pharmacological Effects of *Centella asiatica* on Skin Diseases: Evidence and Possible Mechanisms. In *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 2021). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/5462633>
- Peppas, M., & Vlassara, H. (2005). *Advanced glycation end products and diabetic complications: A General overview* (Vol. 4, Issue 1).
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., & Predoi, G. (2016). Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/9130976>
- Pittella, F., Dutra, R. C., Junior, D. D., Lopes, M. T. P., & Barbosa, N. R. (2009). Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L) Urb. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3713–3721. <https://doi.org/10.3390/ijms10093713>
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., Marcuzzan, G. L., & Bogdanov, S. (2004). QUANTIFICATION OF CONSTITUENTS OF PROPOLIS 235 Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-type Propolis.

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS *Phytochem. Anal.*, 15, 235–240.
<https://doi.org/10.1002.pca.777>

- Prvulovic, D., Hampel, H., & Pantel, J. (2010). Galantamine for Alzheimer's disease. In *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* (Vol. 6, Issue 3, pp. 345–354). <https://doi.org/10.1517/17425251003592137>
- Quintans-Júnior, L. J., Gandhi, S. R., Passos, F. R. S., Heimfarth, L., Pereira, E. W. M., Monteiro, B. S., dos Santos, K. S., Duarte, M. C., Abreu, L. S., Nascimento, Y. M., Tavares, J. F., Silva, M. S., Menezes, I. R. A., Coutinho, H. D. M., Lima, Á. A. N., Zengin, G., & Quintans, J. S. S. (2020). Dereplication and quantification of the ethanol extract of *Miconia albicans* (Melastomaceae) by HPLC-DAD-ESI/MS/MS, and assessment of its anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles in a mice arthritis-like model: Evidence for involvement of TNF- α , IL-1 β and IL-6. *Journal of Ethnopharmacology*, 258. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112938>
- Rahman, M. M., Rahaman, M. S., Islam, M. R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T., Almikhlaifi, M. A., Alghamdi, S. Q., Alruwaili, A. S., Hossain, M. S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T. bin, & Uddin, M. S. (2022). Role of phenolic compounds in human disease: Current knowledge and future prospects. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27010233>
- Rasouli, H., Hosseini-Ghazvini, S. M. B., Adibi, H., & Khodarahmi, R. (2017). Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: A virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food and Function*, 8(5), 1942–1954. <https://doi.org/10.1039/c7fo00220c>
- Rather, M. A., Thenmozhi, A. J., Manivasagam, T., Dhivya Bharathi, M., Essa, M. M., & Guillemin, G. J. (2018). *Neuroprotective role of Asiatic acid in aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease*.
- Rattanakom, S., & Yasurin, P. (2015). Chemical profiling of *Centella asiatica* under different extraction solvents and its antibacterial activity, antioxidant activity. *Oriental Journal of Chemistry*, 31(4), 2453–2459. <https://doi.org/10.13005/ojc/310480>
- Razali, N. N. M., Ng, C. T., & Fong, L. Y. (2019). Cardiovascular Protective Effects of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review. In *Planta Medica* (Vol. 85, Issue 16, pp. 1203–1215). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/a-1008-6138>
- 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. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 915). www.elsevier.com/locate/chroma
- Ríos, J. L., Francini, F., & Schinella, G. R. (2015). Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. In *Planta Medica* (Vol. 81, Issues 12–13, pp. 975–994). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546131>
- 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, 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.097>
- Salehi, B., Anil Kumar, N. v., Şener, B., Sharifi-Rad, M., Kılıç, M., Mahady, G. B., Vlaisavljevic, S., Iriti, M., Kobarfard, F., Setzer, W. N., Ayatollahi, S. A., Ata, A., & Sharifi-Rad, J. (2018). Medicinal plants used in the treatment of human immunodeficiency virus. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19051459>
- Schofield, P., Mbugua, D. M., & Pell, A. N. (2001). *Analysis of condensed tannins: a review*.
- Shukla, A., Rasik, A. M., & Dhawan, B. N. (1999). *Asiaticoside-induced Elevation of Antioxidant Levels in Healing Wounds*.
- Sieberi, B. M., Omwenga, G. I., Wambua, R. K., Samoei, J. C., & Ngugi, M. P. (2020). Screening of the Dichloromethane: Methanolic Extract of Centella asiatica for Antibacterial Activities against Salmonella typhi, Escherichia coli, Shigella sonnei, Bacillus subtilis, and Staphylococcus aureus. *Scientific World Journal*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6378712>
- Singh, A., Bajpai, V., Kumar, S., Sharma, R., & Kumar, B. (2016). *Profiling of Gallic and Ellagic Acid Derivatives in Different Plant Parts of Terminalia arjuna by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS*.
- Sousa, A. D., Maia, I. v., Ribeiro, P. R. V., Canuto, K. M., Zocolo, G. J., & Sousa de Brito, E. (2017). UPLC-QTOF-MSE-based chemometric approach driving the choice of the best extraction process for Phyllanthus niruri. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 52(10), 1696–1706. <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1298612>
- Sun, B., Wu, L., Wu, Y., Zhang, C., Qin, L., Hayashi, M., Kudo, M., Gao, M., & Liu, T. (2020a). Therapeutic Potential of Centella asiatica and Its Triterpenes: A Review. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.568032>

- Sun, B., Wu, L., Wu, Y., Zhang, C., Qin, L., Hayashi, M., Kudo, M., Gao, M., & Liu, T. (2020b). Therapeutic Potential of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.568032>
- Sun, B., Wu, L., Wu, Y., Zhang, C., Qin, L., Hayashi, M., Kudo, M., Gao, M., & Liu, T. (2020c). Therapeutic Potential of *Centella asiatica* and Its Triterpenes: A Review. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.568032>
- Supkamonseni, N., Thinkratok, A., Meksuriyen, D., & Srisawat, R. (2014). Hypolipidemic and hypoglycemic effects of *Centella asiatica* (L.) extract in vitro and in vivo. In *Indian Journal of Experimental Biology* (Vol. 52).
- Taslimi, P., & Gulçin, İ. (2017). Antidiabetic potential: in vitro inhibition effects of some natural phenolic compounds on α -glycosidase and α -amylase enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(10). <https://doi.org/10.1002/jbt.21956>
- Thornalley, P. J. (2005). Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043, 111–117. <https://doi.org/10.1196/annals.1333.014>
- Tönnies, E., & Trushina, E. (2017). Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 57, Issue 4, pp. 1105–1121). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>
- Tundis, R., Loizzo, M. R., & Menichini, F. (2010). Natural Products as-Amylase and-Glucosidase Inhibitors and their Hypoglycaemic Potential in the Treatment of Diabetes: An Update. In *Reviews in Medicinal Chemistry* (Vol. 10).
- van Bussel, B. C. T., van de Poll, M. C. G., Schalkwijk, C. G., & Bergmans, D. C. J. J. (2017). Increased dicarbonyl stress as a novel mechanism of multi-organ failure in critical illness. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2). <https://doi.org/10.3390/ijms18020346>
- Verzija, N., Degroot, J., Oldehinkel, E., Bank, R. A., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., Bayliss, M. T., Bijlsma, J. W. J., Lafeber, F. P. J. G., & Tekoppele, J. M. (2000). Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. In *Biochem. J* (Vol. 350).
- Wong, J. H., Barron, A. M., & Abdullah, J. M. (2021). Mitoprotective Effects of *Centella asiatica* (L.) Urb.: Anti-Inflammatory and Neuroprotective Opportunities in Neurodegenerative Disease. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.687935>

- Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J., & Li, H. bin. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>
- Yuan, T., Yang, T., Chen, H., Fu, D., Hu, Y., Wang, J., Yuan, Q., Yu, H., Xu, W., & Xie, X. (2019). New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. In *Redox Biology* (Vol. 20, pp. 247–260). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.09.025>
- Zhao, Y., Shu, P., Zhang, Y., Lin, L., Zhou, H., Xu, Z., Suo, D., Xie, A., & Jin, X. (2014). Effect of centella asiatica on oxidative stress and lipid metabolism in hyperlipidemic animal models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/154295>
- Zhao, Y., & Zhao, B. (2013). Oxidative stress and the pathogenesis of alzheimer's disease. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2013/316523>
- Zhou, Y., Jiang, Q., Mak, S., & Zhou, X. (2021). Effect of quercetin on the in vitro Tartary buckwheat starch digestibility. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 818–830. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.013>
- 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>