



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA CASCA DO *Caryocar brasiliense* COMO POTENCIAL  
ANTIGLICANTE, INIBIDOR DAS ENZIMAS  $\alpha$ -AMILASE E  $\alpha$ -GLICOSIDASE, E  
DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* E *ex vivo***

**Aluno: Victor Hugo Mota Alves**

**Orientador: Foued Salmen Espindola**

**Uberlândia - MG**

**2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA CASCA DO *Caryocar brasiliense* COMO POTENCIAL  
ANTIGLICANTE, INIBIDOR DAS ENZIMAS  $\alpha$ -AMILASE E  $\alpha$ -GLICOSIDASE, E  
DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* E *ex vivo***

**Aluno: Victor Hugo Mota Alves**

**Orientador: Foued Salmen Espindola**

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

**Uberlândia - MG**

**2022**

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

A474  
2022 Alves, Victor Hugo Mota, 1998-  
AVALIAÇÃO DA CASCA DO Caryocar brasiliense COMO  
POTENCIAL ANTIGLICANTE, INIBIDOR DAS ENZIMAS alfa-  
AMILASE E alfa-GLICOSIDASE, E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE  
in vitro E ex vivo [recurso eletrônico] / Victor Hugo  
Mota Alves. - 2022.

Orientador: Foued Salmen Espindola.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de  
Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.411>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Espindola, Foued Salmen ,1957-,  
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-  
graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



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

**AVALIAÇÃO DA CASCA DO *Caryocar brasiliense* COMO POTENCIAL  
ANTIGLICANTE, INIBIDOR DAS ENZIMAS  $\alpha$ -AMILASE E  $\alpha$ -GLICOSIDASE, E  
DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* E *ex vivo***

**Aluno: Victor Hugo Mota Alves**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente: Foued Salmen Espindola**

**Examinadores:**

**Cassia Regina da Silva**

**Francielle Borges Rosa de Moura**

---

---

**Data da Defesa: 29/08/2022**

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

---

Dr. Foued Salmen Espindola



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



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB.				
Data:	Trinta de agosto de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	10:00h	Hora de encerramento:	10:30h
Matrícula do Discente:	11922GBI015				
Nome do Discente:	Victor Hugo Mota Alves				
Título do Trabalho:	Avaliação da casca do <i>Caryocar brasiliense</i> como potencial antiglicante, inibidor das enzimas $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -glicosidase, e da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i> .				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Bioquímica redox e estresse oxidativo, enzimologia e marcadores bioquímicos.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação das propriedades adaptogênicas e antioxidantes de produtos naturais em animais submetidos ao estresse induzido por imobilização e frio.				

Aos trinta dias do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, às 10:00 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma *Cisco Webex*, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Foued Salmen Espindola (Orientador), Francielle Borges Rosa de Moura e Cassia Regina Silva. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Foued Salmen Espindola apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

( A ) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Foued Salmen Espíndola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/08/2022, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cassia Regina da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/09/2022, às 09:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francielle Borges Rosa de Moura, Usuário Externo**, em 01/09/2022, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3799075** e o código CRC **A6F33F4C**.

*Dedico este trabalho aos meus pais, que nunca me desamparam,  
me apoiando em cada passo da minha vida.*

*Agradeço,*

*Aos meus pais, Wagna e Apraniano, que sempre estiveram ao meu lado, seja nos momentos bons ou ruins, me apoiando e incentivando a seguir em frente;*

*Ao professor Dr. Foued Salmen Espindola pela disponibilidade e paciência em me orientar, além dos conhecimentos transmitidos e sempre manter aberta as portas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI);*

*À professora Ana Paula Oliveira Nogueira por disponibilizar as amostras utilizadas para este trabalho;*

*Aos amigos do LABIBI, Vinicius, Ana, Renner e Romário, sempre presentes, discutindo resultados e sempre me auxiliando quando necessário;*

*Ao Instituto de Biotecnologia e seus professores, pelas aulas ministradas com excelência e qualidade;*

*À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Vivian, pela paciência e auxílio necessário;*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica;*

*À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – MEC), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por fomentarem as pesquisas no Brasil;*

*À Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação.*

*À Universidade Federal de Uberlândia, por além de proporcionar a realização dessa dissertação, também marcou minha vida na graduação em biotecnologia;*

*E a todos que aos poucos contribuíram para o meu crescimento e minha formação como indivíduo.*

*Meu muito obrigado a todos!*



# ÍNDICE

ÍNDICE .....	ix
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2. OBJETIVOS GERAIS .....	3
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	4
2.1. EXTRAÇÃO, PARTICIONAMENTO E DILUIÇÃO DOS EXTRATOS.....	4
2.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA .....	4
2.2.1. DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES.....	5
2.2.2. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS.....	5
2.3. ENSAIOS ANTIOXIDANTES.....	6
2.3.1. CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC).....	6
2.3.2. POTENCIAL ANTIOXIDANTE REDUTOR FÉRRICO (FRAP) .....	7
2.3.3. MÉTODO DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) .....	8
2.4. DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA .....	8
2.4.1. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -AMILASE.....	8
2.4.2. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -GLICOSIDASE .....	10
2.5. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (CAPACIDADE ANTIGLICANTE).....	11
2.5.1. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO BSA (ALBUMINA SÉRICA BOVINA) /FRUTOSE .....	12
2.5.2. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO BSA/METILGLIOXAL.....	13
2.5.3. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO ARGININA/METILGLIOXAL.....	13
2.5.4. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO LISINA/METILGLIOXAL .....	14
2.6. ENSAIOS <i>ex vivo</i> EM TECIDO HEPÁTICO.....	15
2.6.1. FRAP .....	15
2.6.2. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	15
2.6.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	16
2.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	16

3.	RESULTADOS.....	17
3.1.	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA .....	17
3.2.	ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	18
3.2.1.	CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC).....	18
3.2.2.	POTENCIAL ANTIOXIDANTE REDUTOR FÉRRICO (FRAP) .....	19
3.2.3.	MÉTODO DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) .....	20
3.3.	DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA .....	21
3.3.1.	INIBIÇÃO $\alpha$ -AMILASE .....	21
3.3.2.	INIBIÇÃO $\alpha$ -GLICOSIDASE.....	22
3.4.	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA.....	23
3.5.	ENSAIOS <i>ex vivo</i> EM TECIDO HEPÁTICO.....	25
3.5.1.	FRAP .....	25
3.5.2.	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	26
3.5.3.	ROS <i>ex vivo</i> .....	27
4.	DISCUSSÃO .....	28
5.	CONCLUSÃO .....	32
6.	REFERÊNCIAS .....	33

## RESUMO

O cerrado é um dos grandes biomas brasileiros, sendo o segundo maior da América do Sul, possuem as nascentes de enormes bacias hidrográficas. Com plantas com características típicas deste bioma, um dos grandes destaques é o pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.), caracterizada como uma planta frutífera e oleaginosa. Além da importância do fruto na culinária local, a polpa do pequi vem se mostrando em pesquisas recente como um produto natural com excelência em atividades antioxidantes. A *Diabetes Mellitus* do tipo 2, caracterizada pela hiperglicemia sanguínea, é uma das principais causas de morte em todo o mundo, é de grande valia a busca por fitoterápicos capazes de promover um tratamento auxiliar, agindo sobre enzimas de importância para o controle glicêmico, diminuindo os danos que podem ser causados nos tecidos. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a capacidade antioxidante, antiglicante e enzimática-inibitória de um dos subprodutos, a casca, do pequi com e sem espinho, fracionadas e avaliando a atividade de cada. Para isto foram aplicados diversos ensaios para a atividade antioxidante, avaliando a Capacidade De Absorção Do Radical Oxigênio (ORAC), o Potencial Antioxidante Redutor Férrico (FRAP), e por fim o Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), demonstrando a atividade antioxidante de ambas as amostras. O modelo enzimático foi realizado com a inibição da  $\alpha$ -amilase, na qual a fração de acetato de etila também se mostrou capaz de inibir a ação da  $\alpha$ -amilase em ambas as amostras, e da  $\alpha$ -glicosidase, onde somente a fração diclorometano da amostra sem espinho e o extrato bruto etanólico da amostra com espinho apresentaram capacidade inibitória em baixa porcentagem. Para a atividade antiglicante, nos modelos utilizados, as frações da amostra sem espinho se sobressaem. Além disso, ensaios *ex vivo* foram realizados, que demonstraram a proteção de cada amostra sob o tecido hepático. Estudos anteriores já demonstraram uma boa atividade presente nos frutos do pequi. Porém outro aspecto tratado como subproduto do fruto, a casca, demonstra ter efeito relevante nas complicações de doenças crônicas em ensaios *in vitro*. Além disso, as frações de casca demonstraram segurança, sem a presença de danos hepáticos.

Palavras-chave: Pequi, Produtos Naturais, Espécies Reativas de Oxigênio

## ABSTRACT

The cerrado is one of the great Brazilian biomes, being the second largest in South America, with the headwaters of huge hydrographic basins. With plants with typical characteristics of this biome, one of the highlights is the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb.), characterized as a fruit and oleaginous plant. In addition to the importance of the fruit in the local cuisine, the pequi pulp has been shown in recent research as a natural product with excellence in antioxidant activities. Type 2 Diabetes Mellitus, characterized by blood hyperglycemia, is one of the main causes of death worldwide, the search for herbal medicines capable of promoting an auxiliary treatment, acting on enzymes of importance for glycemic control, is of great value. the damage that can be caused to the tissues. The objective of the present work was to characterize the antioxidant, antiglycant and enzymatic-inhibitory capacity of one of the by-products, the peel, of the pequi tree with and without thorn, fractionated and evaluating the activity of each. For this, several tests were applied for the antioxidant activity, evaluating the Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC), the Ferric Reducing Antioxidant Potential (FRAP), and finally the DPPH Method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), demonstrating the antioxidant activity of both samples. The enzymatic model was carried out with the inhibition of  $\alpha$ -amylase, in which the ethyl acetate fraction was also able to inhibit the action of  $\alpha$ -amylase in both samples, and of  $\alpha$ -glucosidase, where only the dichloromethane fraction of the sample without thorn and the crude ethanolic extract of the sample with thorn showed a low percentage of inhibitory capacity. For the antiglycant activity, in the models used, the fractions of the sample without spine stand out. In addition, ex vivo assays were performed, which demonstrated the protection of each sample under the liver tissue. Previous studies have already demonstrated a good activity present in pequi fruits. However, another aspect treated as a by-product of the fruit, the peel, has been shown to have a relevant effect on the complications of chronic diseases in in vitro assays. In addition, the shell fractions demonstrated safety, without the presence of liver damage.

Keywords: Pequi, Natural Products, Reactive Oxygen Species

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando cerca de 23,3% do território nacional, neste espaço encontram-se as nascentes das três maiores bacias hidrográficas sul-americanas, resultando em um elevado potencial aquífero que favorece sua biodiversidade (BRASIL, 2022). O *Caryocar brasiliense* Cambessedes (Camb.), popularmente conhecido como pequi, é uma planta perene típica desse bioma, podendo ser classificada como frutífera ou oleaginosa (CALDEIRA *et al.*, 2021). Encontrada em mais de doze estados brasileiros mais o Distrito Federal, possui fisionomia comum às plantas deste bioma, sendo pouco exigente quanto a fertilização do solo. A elevada concentração de minerais em seus frutos surpreendem quanto sua capacidade nutricional, conduzindo a hipótese do pequi ser um eficiente extrator de nutrientes (Rodriguésia, 2010).

O fruto do pequi, o pequi, é tradicionalmente utilizado na culinária regional, sendo muito apreciado em diversas formas de preparo, até mesmo como acompanhamento em alguns pratos típicos, porém a farinha do epicarpo, juntamente com a do mesocarpo, é rica em fibras alimentares e carboidratos, cinzas, magnésio, cálcio, manganês e cobre (CARVALHO; PEREIRA; ARAÚJO, 2015). Além disso, os habitantes locais também integram o óleo dessa planta em sua medicina tradicional contra gripes, doenças inflamatórias, cicatrização de feridas, lesões gástricas, disfunções menstruais, doenças oftalmológicas e hepáticas, e chegam a empregar no controle de tumores (BRAGA *et al.*, 2022; JUNIOR *et al.*, 2020). Os frutos do pequi podem ou não apresentar espinhos em seu caroço (KERR; SILVA; TCHUCARRAMAE, 2007). Neste trabalho foi utilizada amostras da casca de ambos os tipos de pequi, caroço com e sem espinho, buscando avaliar e comparar as amostras dos dois tipos de caroço.

Estudos recentes, utilizando modelos animais, mostram o potencial do *C. brasiliense* na atividade anti-inflamatória, anti-edematogênico e anti-hiperalgésico, em camundongos (JUNIOR *et al.*, 2020). Também tem se mostrado bastante

efetivo em testes *in-vitro* sobre sua atividade antioxidantes, reduzindo os níveis de espécies reativas livres (ROLL *et al.*, 2018).

As espécies reativas de oxigênio, conhecidas como EROs (do inglês *reactive oxygen species*, ROS), produzidas durante processos fisiológicos têm efeitos deletérios sobre os componentes celulares e tecidos conjuntivos, podendo causar danos cumulativos no tecido com o passar o tempo, o que resulta em envelhecimento e doenças degenerativas (ROLL *et al.*, 2018; ROMANO *et al.*, 2010). Apesar de prejudiciais as EROs e as espécies reativas de nitrogênio, ERNs, são importantes na manutenção da homeostase celular, além de importantes mensageiros na sinalização redox (RIDDLE, 2007). O próprio organismo possui mecanismos de defesa contra esses radicais livres, porém o dano oxidativo às mitocôndrias pode levar a um círculo vicioso, onde a quantidade de radicais fica cada vez maior, levando a um aumento progressivo do dano causado (RIDDLE, 2007; VESKOUKIS; TSATSAKIS; KOURETAS, 2012; YAN, 2014).

Nesse pretexto da manutenção dos radicais livres, tem crescido a busca por fontes de redução do estresse oxidativo, principalmente de fontes naturais ricas em polifenóis (VESKOUKIS; TSATSAKIS; KOURETAS, 2012). A presença de polifenóis nas plantas possui ação protetora contra os fatores ambientais nocivos à elas e o ataque de microrganismos (MANACH *et al.*, 2004). Milhares de compostos polifenólicos já foram descritos, caracterizados pela presença de pelo menos um anel aromático em sua molécula e em geral existem na forma de glicosídeos (VESKOUKIS; TSATSAKIS; KOURETAS, 2012).

A Organização Mundial de Saúde define a *Diabetes Mellitus* como uma das principais causas de morte em todo o mundo atualmente, acometendo 1,5 milhões de pessoas anualmente. A *Diabete Mellitus* do tipo 2 é mais comum em adultos do que o tipo 1, é caracterizada pela alta concentração de açúcar sanguínea, levando ao longo do tempo a severos danos a diversos tecidos, atingindo o coração, os vasos sanguíneos, os rins, os olhos e os nervos (“Diabetes”, 2022). A busca por fitoterápicos capazes de promover um tratamento auxiliar é de grande valia. Compostos estes que possam tanto agir sobre enzimas de importância para o controle glicêmico, quanto auxiliar nos danos que a glicose em excesso no

organismo pode causar, como o aumento das EROS e a reação com proteínas e aminoácidos formando AGEs, apresentando um efeito protetor para os tecidos atingidos (DE SOUSA et al., 2004; FRANCO et al., 2020).

Estudos anteriores já demonstraram boas atividades protetoras contra inflamações e o estresse oxidativo presentes nos frutos no pequi (BRAGA et al., 2022; ROLL et al., 2018). Porém outra parte tratada como subproduto do fruto, a casca, pode ainda apresentar esses mesmos resultados, visto sua importância na manutenção do fruto. A partir destes pontos que este trabalho busca o fracionamento do extrato etanólico da casca de duas amostras, com e sem espinho, cedidas pela Estação Experimental da Fazenda Água Limpa, da Universidade Federal de Uberlândia, a fim de analisar suas atividades e compará-las entre si.

## 1.2. OBJETIVOS GERAIS

Procura-se elucidar neste trabalho as propriedades das partições da casca do *C. brasiliense*, antioxidante, antiglicante e inibidor enzimático. Além de avaliar a segurança das frações em tecido hepático.

## 1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fracionar o extrato bruto, pelos solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, e avaliar o potencial da casca quanto a:
  - determinar quantitativamente por meio de métodos de prospecção fitoquímica as proporções de flavonoides e fenóis totais.
  - capacidade antioxidante, avaliando a Capacidade De Absorção Do Radical Oxigênio (ORAC), o Potencial Antioxidante Redutor Férrico (FRAP), e por fim o Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila);
  - capacidade antiglicante, pelos métodos de antiglicação de BSA/frutose, BSA/metilglioxal, arginina/metilglioxal e lisina//metilglioxal;
  - inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase;

- avaliar a proteção do tecido hepático pelas frações, utilizando o método de FRAP, como antioxidante no tecido; peroxidação lipídica; e a produção de radicais livres;

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. EXTRAÇÃO, PARTICIONAMENTO E DILUIÇÃO DOS EXTRATOS

Para a obtenção do extrato bruto, foram utilizadas 500 g da casca secas do *C. brasiliense*. Foi feita a maceração estática, onde o material permaneceu imerso em 2,5 litros do solvente etanólico (proporção de 1:5 m/v) durante seis dias em média. Após esse período, a solução com os extrativos foi filtrada e o solvente removido em rotaevaporador sobre pressão reduzida a 40° C. O resíduo do material vegetal foi então remacerado por mais duas vezes, utilizando-se o solvente recuperado na rotaevaporação. O extrato foi congelado e liofilizado para a remoção de água e posteriormente utilizado para o particionamento.

Para o particionamento, foi feita a diluição de 5g do extrato bruto em 50 mL de solução hidrometanólica na proporção de 1:9. Misturou-se a solução hidrometanólica com o extrato bruto, depois filtrou-se a solução em papel filtro com o auxílio de funil comum. A massa residual no papel filtro foi descontada para avaliação do rendimento final de cada fração. Utilizando-se de um funil de bromo a partição foi realizada com solventes de polaridade crescentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, completando-se com o residual que foi denominado de fração água. Para tal foi realizada três extrações com 50 mL de cada solvente. Os solventes foram rotaevaporados com pressão reduzida a 40°C, congelados e liofilizados para a remoção da água remanescente e em seguida armazenados a -20° C (FRANCO *et al.*, 2020).

### 2.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA



A prospecção fitoquímica teve por finalidade a caracterização dos compostos fenólicos nas frações, determinando quantitativamente as concentrações de flavonoides, taninos condensados e fenóis totais (ZOU *et al.*, 2011).

### 2.2.1. DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES

Adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de cada fração de 10 mg/mL em triplicada em uma placa de 96 poços, foi acrescentado 180  $\mu\text{L}$  de água milli-Q e 10  $\mu\text{L}$  de solução de 5% de  $\text{NaNO}_2$  em todos os poços com pipeta multicanal e incubou por 6 minutos à 25° C. Adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  a 10% (m/v) que permaneceu em repouso por 6 minutos, sendo posteriormente adicionados à mistura 60  $\mu\text{L}$  de solução  $\text{NaOH}$  4% e incubado por mais 15 minutos. A curva padrão foi preparada para análise dos dados utilizando-se quercetina (QE) nas concentrações de 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Tanto a curva padrão quanto o branco (medida negativa com etanol) foram adicionados na mesma proporção das frações nos poços (30  $\mu\text{L}$ ). A placa foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 510 nm, onde o branco foi descontado das amostras posteriormente. Tais medidas foram expressas em mg de equivalentes de quercetina por grama de material vegetal (mg QE/g) (ZOU *et al.*, 2011).

### 2.2.2. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

Adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de cada fração de 10 mg/mL em triplicada em uma placa de 96 poços. Posteriormente, foi acrescentado 195  $\mu\text{L}$  de água milli-Q e 25  $\mu\text{L}$  de reagente Folin-Ciocalteu em todos os poços com pipeta multicanal e incubou-se por 6 minutos à 25° C. Ainda nos poços, adicionou-se 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 7% e foi incubado por duas horas no escuro à 25° C. A curva padrão foi preparada para análise dos dados utilizando-se ácido gálico (GAE) nas concentrações de 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Tanto a curva padrão quanto o

branco (medida negativa) foram adicionados na mesma proporção do extrato (5  $\mu\text{L}$ ). A placa foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm, onde o branco foi descontado das amostras posteriormente. Tais medidas foram expressas em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de material vegetal (mg GAE/g) (ZOU *et al.*, 2011).

## 2.3. ENSAIOS ANTIOXIDANTES

### 2.3.1. CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC)

Este ensaio avaliou a atividade antioxidante através da inibição da oxidação da fluoresceína, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons de moléculas antioxidantes. Assim o azobis foi utilizado para produzir o radical peroxil por aquecimento, o que degrada a molécula fluorescente, resultando na perda de fluorescência (FRANCO *et al.*, 2018).

Para o ensaio todos os reagentes foram preparados com tampão ORAC a 75 mM e pH 7,4. Preparou-se o radical Azobis a 153 mM em tampão, cobrindo com papel alumínio para evitar a reação do radical com a luz. Já a curva padrão foi realizada com Trolox (pesou-se 0,0125g de Trolox em 5 mL de tampão ORAC) e diluiu serialmente para as concentrações de 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125 e 250  $\mu\text{M}$ . Preparou-se fluoresceína em tampão ORAC na concentração de  $8,5 \times 10^{-5}$  mM de fluoresceína.

Em uma microplaca de 96 poços de cor preta pipetou-se 25  $\mu\text{L}$  do extrato em duplicata. Na curva pipetou-se a mesma quantidade dos extratos e para o controle positivo pipetou-se soluções de ácido ascórbico, ácido gálico e quercetina nas mesmas concentrações das frações. Para o Branco, acrescentou-se 25  $\mu\text{L}$  de tampão ORAC em triplicata na microplaca, o valor obtido foi então descontado da absorbância das amostras e da curva padrão. Adicionou-se a todos os poços 150  $\mu\text{L}$  da solução de fluoresceína à concentração de  $8,5 \times 10^{-5}$  mM e momentos antes da leitura ainda se acrescentou 30  $\mu\text{L}$  da solução de Azobis. Utilizou-se o espectrofluorímetro para análise da fluorescência, com excitação a 485 nm e

emissão a 528 nm, em temperatura de 37 °C durante 90 minutos em um intervalo de leitura de 90 segundos. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ .

### 2.3.2. POTENCIAL ANTIOXIDANTE REDUTOR FÉRRICO (FRAP)

Este método colorimétrico é uma avaliação indireta para a determinação antioxidante. Nele os antioxidantes presentes na amostra reduzem  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , o qual é quelado pela 2,4,6-tri (2 piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo  $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ, de coloração azul, lida no comprimento de onda de 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996).

Inicialmente, preparou-se o tampão de acetato de sódio à 0,3 M e pH 3,6. Em seguida preparou-se uma solução de HCl à 40 mM, armazenado em temperatura ambiente. A solução anterior foi utilizada no preparo da solução de TPTZ à 10 mM, que foi armazenando em frasco âmbar e mantido sob refrigeração. A solução com íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) foi preparado pesando-se 0,108 g de cloreto férrico, diluindo-o em 20 mL de água destilada.

Utilizando-se as soluções de TPTZ e a solução de cloreto férrico, juntamente com o tampão de acetato de sódio, preparou-se o reagente FRAP, na seguinte proporção: 10 partes de tampão de acetato de sódio para 1 parte de cada solução, 1 parte de solução TPTZ e 1 parte de solução de cloreto férrico. Para a curva padrão foi utilizado Trolox (pesou-se 0,0125g de Trolox em 5 mL de tampão FRAP) e diluiu serialmente para as concentrações de 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ . Para o controle positivo preparou-se soluções de ácido ascórbico, ácido gálico e quercetina nas mesmas concentrações das frações.

A reação foi feita em microplaca de 96 poços adicionando-se 10  $\mu\text{L}$  da amostra ou as diluições da curva Trolox, mais 25  $\mu\text{L}$  de água destilada e 250  $\mu\text{L}$  tampão FRAP. Após a preparação da placa, incubou-se a mesma por 6 minutos a 37°C. Após incubação, leu-se a placa em espectrofotômetro em 593 nm de absorbância. Os dados obtidos são expressões como  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ .

### 2.3.3. MÉTODO DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Tal método baseia-se na doação de um elétron ou hidrogênio da amostra para o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), quando há reação de redução do radical no poço da microplaca há indicação positiva de absorvância que é lida à 517 nm (YILDIRIM; MAVI; KARA, 2001). Foi realizado o ensaio de IC50 para avaliar a concentração necessária para que cada fração atinja 50% da capacidade inibitória, construindo uma curva para cada fração.

Primeiramente a solução de DPPH foi preparada a uma concentração de 0,06 mM. Com a concentração do DPPH devidamente corrigida iniciou-se o processo de pipetagem em microplaca, adicionando 75 µL da amostra testada e mais 225 µL da solução DPPH e incubando por 30 minutos a 30° C e ao abrigo da luz. Ao final da incubação, foi feita a leitura da placa no comprimento de onda de 517 nm. Para obtenção dos valores de branco foram pipetados em outra microplaca 50 µL das amostras testadas e adicionou-se 200 µL de metanol em cada poço, lendo a placa em espectrofotômetro.

$$CA = (\%) = \left( \frac{Abs\ controle - (Abs\ amostra - Abs\ branco)}{Abs\ controle} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: CA é Capacidade Antioxidante, Abs controle é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH, Abs amostra é a absorvância da mistura (DPPH + amostra), Abs branco é a absorvância da amostra em metanol.

## 2.4. DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

### 2.4.1. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA α-AMILASE

As partições da casca do pequiwereiro foram analisadas quanto à sua capacidade de inibição sobre a enzima α-amilase pelo método GALC2CNP modificado, onde foram necessários o substrato α-(2-cloro-4-nitrofenil)-β-1,4-galactopiranosilmaltosídeo (GAL-G2-α-CNP) e fração de saliva enriquecida com a

enzima  $\alpha$ -amilase salivar (JUSTINO *et al.*, 2018). A amostra de saliva foi obtida pelo método de salivacção, onde o indivíduo voluntário salivou e, posteriormente, esta foi submetida a cromatografia e com isso foi obtido fração enriquecida em  $\alpha$ -amilase salivar que foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . No momento de realização do teste a saliva foi então descongelada e centrifugada a  $12000\times g$  por 10 minutos a  $20^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi fracionado em uma coluna de Q-Sepharose, fazendo uso de tampão contendo 50 mM de Tris-HCL (pH 8,0), 10 mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e 10 mM de EGTA (ácido etilenoglicol tetra-acético). O volume de exclusão da coluna de Q-Sepharose foi dialisado em tampão de bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,0, liofilizado e solubilizado em 50 mM de tampão ácido 2-(N-morfolino) - etanossulfônico (MES), contendo 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 140 mM de tiocianato de potássio e 300 mM de cloreto de sódio pH 6,0.

Foram utilizadas as frações diluídas à uma concentração de 5 mg/mL, sendo incubadas com a fração enriquecida de amilase (proporção 1:10) durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . A reação iniciou-se com a adição de 320  $\mu\text{L}$  do substrato GAL-G2- $\alpha$ -CNP (12 mM) e as absorbâncias foram medidas utilizando comprimento de onda de 405 nm, durante 3 minutos com intervalos de 1 minuto, a  $37^{\circ}\text{C}$ . O controle positivo utilizado foi a Acarbose, diluída na mesma concentração das frações. Além do controle positivo, foi incluído dois ácidos isolados, que são identificados pela literatura como abundante no *C. brasiliense*, o ácido elágico e o ácido gálico, diluídos à 5 mg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata, com diferentes concentrações de extrato afim de determinar a menor concentração de amostra que atingiu 50% de inibição da enzima (IC50). Os resultados foram apresentados em porcentagem de inibição da  $\alpha$ -amilase que foi calculado pela Equação 4 que segue abaixo. Equações 2 e 3 determinaram a atividade da enzima em U.m/L e %, respectivamente, e foram utilizadas no cálculo da inibição (JUSTINO *et al.*, 2018).

$$\textit{Atividade de } \alpha - \textit{amilase (U/mL)} = [(\delta\textit{Abs}/\textit{minuto}).Vf.Fd].\xi Vs.1 \quad \textit{Equação 2}$$

$$\textit{Atividade da } \alpha - \textit{amilase (\%)} = \left[ \frac{(A \textit{ amostra})}{A \textit{ controle}} \right].100 \quad \textit{Equação 3}$$

$$\textit{Inibição em \%} = 100 - (\textit{Atividade da } \alpha - \textit{amilase em \%}) \quad \textit{Equação 4}$$

Onde,  $\delta Abs / \text{minuto}$  significa a diferença das absorvâncias por minuto ( $Abs_3 - Abs_1/2$ ); ( $Abs = \text{Absorbância}$ );  $V_f$  é o volume total da reação ( $328 \mu\text{L}$ );  $V_s$  é o volume de amostra de fração somado com a enzima  $\alpha$ -amilase que corresponde a  $8 \mu\text{L}$ ;  $F_d$  é o fator de diluição da saliva ( $50$ );  $\xi$  é o coeficiente de absorvidade do 2-cloro-p-nitrofenol;  $l$  consiste no comprimento de percurso da luz ( $0,97$ );  $A_{\text{controle}}$  é a atividade da  $\alpha$ -amilase e  $A_{\text{amostra}}$  é a atividade da  $\alpha$ -amilase na presença das frações.

#### 2.4.2. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA $\alpha$ -GLICOSIDASE

O ensaio de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase foi feito utilizando-se fração enriquecida em  $\alpha$ -glicosidase obtida a partir de solução preparada com  $0,1 \text{ g}$  de pó cetônico de intestino de rato diluído em  $3 \text{ mL}$  de tampão fosfato de potássio a  $50 \text{ mM}$ . A fração obtida foi centrifugada a  $12000g$  por  $30$  minutos, sendo o sobrenadante coletado. O controle positivo utilizado foi a Acarbose, diluída na mesma concentração das frações ( $5 \text{ mg/mL}$ ) e assim como no ensaio anterior, foi utilizado os ácidos elágico e ácido gálico, à  $5 \text{ mg/mL}$ , além da quercetina na mesma concentração. Foram utilizados  $75 \mu\text{L}$  do sobrenadante que contém a enzima, adicionou-se  $30 \mu\text{L}$  de Glutathione reduzida (GSH)  $1,5 \text{ mM}$  e por fim  $15 \mu\text{L}$  de amostra ou do controle positivo. A solução contendo a enzima, o GSH e a amostra foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por  $20$  minutos. Posteriormente em uma placa de  $96$  poços e adicionou-se  $50 \mu\text{L}$  da solução anterior e  $220$  de substrato (p-nitrofenil-alfa-D-glicopiranosídeo ( $301,25 \text{ g/mol}$ ) a  $4 \text{ mM}$ ). O ensaio cinético foi conduzido a  $405 \text{ nm}$  durante  $30$  minutos com intervalos de leitura a cada  $5$  minutos e os resultados foram expressões pela porcentagem de inibição, dada pelo Equação 5 (FRANCO *et al.*, 2020).

$$\begin{aligned} & \text{Inibição da } \alpha \text{ - glicosidase (\%)} \\ & = \left( \frac{(ASC_{\text{controle}} - ASC_{\text{amostra}})}{ASC_{\text{controle}}} \right) \cdot 100 \text{ Equação 5} \end{aligned}$$

Onde: ASC controle é a área sob a curva na ausência da fração, e ASC amostra é a área sob a curva na presença da fração.

## 2.5. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (CAPACIDADE ANTIGLICANTE)

O ensaio contou com a preparação de quatro conjuntos de micro tubos distintos, ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1 : conjuntos dos grupos de tubos preparados para o ensaio

1º conjunto	São os que possuem amostras que foram testadas (450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL da solução de proteína (albumina sérica bovina) ou aminoácido (arginina ou lisina), 150 µL da solução contendo o açúcar glicante (frutose ou metilglioxal) e 50 µL do agente antiglicantes (extratos particionados da casca do <i>C. brasiliense</i> e os ácidos elágico e gálico)
2º conjunto	Onde não houve glicação, contendo 450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL da solução de proteína (albumina sérica bovina) ou aminoácido (arginina ou lisina), 150 µL da solução contendo o açúcar glicante (frutose ou metilglioxal) e 50 µL de quercetina (inicialmente com 10 mg/mL e diluída serialmente mais seis vezes)
3º conjunto	Sendo considerado o controle negativo, onde ocorreu a glicação, contendo 450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL da solução de proteína (albumina sérica bovina) ou aminoácido (arginina ou lisina), 150 µL da solução contendo o açúcar glicante (frutose ou metilglioxal) e 50 µL de água

4º conjunto	Consistindo no controle branco, onde não houve a presença de frutose e de agentes antiglicantes, contendo 600 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL da solução de proteína (albumina sérica bovina) ou aminoácido (arginina ou lisina) e 50 µL de água
-------------	--

As amostras foram incubadas por 3 dias em condições de privação de luz a 37°C (FRANCO et al., 2020).

### 2.5.1. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO BSA (ALBUMINA SÉRICA BOVINA) /FRUTOSE

Este método utiliza da proteína BSA diluída em tampão fosfato à uma concentração de 50 mg/mL e frutose 1,25 mM em tampão fosfato, preparando os conjuntos de acordo com a Tabela 1. Após a incubação foram adicionados 800 µL de ácido tricloroacético 20%, posteriormente centrifugou-se os tubos a 10000g por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em 800 µL de tampão fosfato. Foram pipetados 300 µL da solução de pellet ressuscitado em placa de 96 poços preta, foi pipetado somente tampão fosfato em alguns poços para que fosse descontado seus valores das demais amostras. A leitura foi realizada no comprimento de onda de excitação (350 nm) e de emissão (420 nm). A porcentagem de inibição foi calculada conforme a Equação 6 (FRANCO et al., 2020).

$$IG (\%) = 100 - \left( \frac{(IF \text{ amostra} - IF \text{ branco})}{(IF \text{ controle} - IF \text{ branco})} \right) 100 \text{ Equação 6}$$

Sendo: IF amostra a intensidade de fluorescência na presença da fração, IF branco a intensidade de fluorescência na ausência de frutose e fração, e IF controle a intensidade de fluorescência na ausência da fração.



### 2.5.2. ENSAIO DE ANTIGLIFICAÇÃO: MODELO BSA/METILGLIOXAL

Para o método foi utilizado da proteína BSA diluída em tampão fosfato à uma concentração de 50 mg/mL e metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato, preparando os conjuntos conforme a Tabela 1. Posteriormente, realizou-se a centrifugação dos tubos a 10000g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspensando o pellet em 800 µL de tampão fosfato, foram pipetados 300 µL de amostra na microplaca preta de 96 poços, foi pipetado somente tampão fosfato em alguns poços para que fosse descontados seus valores das demais amostras. A leitura foi então realizada em comprimento de onda de excitação (340 nm) e de emissão (380 nm). A porcentagem de inibição foi calculada pela Equação 6 (FRANCO *et al.*, 2020).

$$IG (\%) = 100 - \left( \frac{(IF \text{ amostra} - IF \text{ branco})}{(IF \text{ controle} - IF \text{ branco})} \right) 100 \text{ Equação 6}$$

Sendo: IF amostra a intensidade de fluorescência na presença da fração, IF branco a intensidade de fluorescência na ausência de metilglioxal e da fração, e IF controle a intensidade de fluorescência na ausência da fração.

### 2.5.3. ENSAIO DE ANTIGLIFICAÇÃO: MODELO ARGININA/METILGLIOXAL

Método utilizando da arginina 106,6mM em tampão fosfato e metilglioxal a 53,3 mM em tampão fosfato, os tubos foram preparados conforme a Tabela 1. Realizada a incubação, foram pipetados 300 µL de amostra na microplaca preta de 96 poços, foi pipetado somente tampão fosfato em alguns poços para que fosse descontado seus valores das demais amostras. A leitura deverá ser realizada em

comprimento de onda de excitação (340 nm) e de emissão (380 nm). A porcentagem de inibição foi calculada pela Equação 6 (FRANCO *et al.*, 2020).

$$IG (\%) = 100 - \left( \frac{(IF \text{ amostra} - IF \text{ branco})}{(IF \text{ controle} - IF \text{ branco})} \cdot 100 \right) \text{ Equação 6}$$

Sendo: IF amostra a intensidade de fluorescência na presença da fração, IF branco a intensidade de fluorescência na ausência de metilglioxal e da fração, e IF controle a intensidade de fluorescência na ausência da fração.

#### 2.5.4. ENSAIO DE ANTIGLICAÇÃO: MODELO LISINA/METILGLIOXAL

Para o método foi utilizado do aminoácido lisina 106,6mM em tampão fosfato e metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato e os conjuntos foram preparados conforme a Tabela 1. Realizada a incubação, foram pipetados 300 µL de amostra na microplaca preta de 96 poços, foi pipetado somente tampão fosfato em alguns poços para que fosse descontado seus valores das demais amostras. A leitura deverá ser realizada em comprimento de onda de excitação (340 nm) e de emissão (380 nm). A porcentagem de inibição foi calculada pela Equação 6 (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2021).

$$IG (\%) = 100 - \left( \frac{(IF \text{ amostra} - IF \text{ branco})}{(IF \text{ controle} - IF \text{ branco})} \cdot 100 \right) \text{ Equação 6}$$

Sendo: IF amostra a intensidade de fluorescência na presença da fração, IF branco a intensidade de fluorescência na ausência de metilglioxal e da fração, e IF controle a intensidade de fluorescência na ausência da fração.

## 2.6. ENSAIOS *ex vivo* EM TECIDO HEPÁTICO

Para avaliar os parâmetros oxidativos *ex vivo*, a indução da oxidação tecidual pelo Fe<sup>2+</sup>-ascorbato foi realizada (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2021). Camundongos C57BL/6 (6-8 semanas de idade, pesando cerca de 20 g) foram eutanasiados (CEUA nº 056/18) e o fígado removido e congelado a -70 °C até a data do teste. As amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato-salino (PBS) (1:10) e depois centrifugadas a 3.000×g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para o teste de oxidação *ex vivo*. Para isso, eles foram incubados por 60 min a 37°C com 0,01 mmol/L de FeSO<sub>4</sub> e 0,1 mmol/L de ácido ascórbico isolado (Oxidized Hepatic Tissue – OHT), e com a adição simultânea das frações de *C. brasiliense* (5000 µg/mL). Estas amostras, submetidas à oxidação, e um controle de PBS isolado (Fig<sup>-</sup>), sem danos ao tecido, foram utilizadas para os testes descritos abaixo.

### 2.6.1. FRAP

Para avaliar a capacidade antioxidante no tecido hepático as amostras foram incubadas com tampão acetato de sódio 300 mM (pH 3,6), 2,4,6-tri(2piridil)-estriazina (TPTZ) 10 mM e cloreto férrico 20 mM (10:1:1) por 6 minutos a 37°C e a absorbância foi medida a 593 nm (FRANCO *et al.*, 2020).

### 2.6.2. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Ácido tricloroacético (10% TCA) e ácido tiobarbitúrico (0,67% TBA) foram adicionados às amostras com o tecido hepático, esses tubos foram incubados por 120 minutos em banho-maria a 100°C. Em seguida, butanol foi adicionado as amostras e elas foram centrifugadas a 5.000×g por 3 minutos. A leitura foi realizada à excitação de 515nm e emissão de 553nm (JUSTINO *et al.*, 2019).

### 2.6.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O nível de espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*, ROS) foi quantificado pelo método proposto por Lima Júnior *et al.*, (2021). Uma mistura contendo as amostras, diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína 10 µM (DCFH-DA) e tampão Tris-HCl 5 mM (pH 7,4) foi incubada por 3 min a 37°C e a intensidade de fluorescência foi medida a 474nm de excitação e 530nm emissão. Os resultados são apresentados pela área sobre a curva (ASC), utilizando a Equação 7.

$$ASC = \left( \frac{(A \text{ controle} - A \text{ amostra})}{A \text{ controle}} \right) \cdot 100 \text{ Equação 7}$$

Sendo que *A controle* representa o valor de absorvância do branco e *A amostra* é o valor de absorvância de cada amostra/controles.

### 2.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism versão 6.0. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média e a análise da variância foi realizada pelo teste One-Way ANOVA com teste Dunnett para comparações múltiplas entre os controles e as médias das amostras, One-Way e two-Way ANOVA com teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias das amostras e dos controles. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos.

### 3. RESULTADOS

Utilizando do extrato bruto etanólico, o particionamento líquido/líquido foi realizado, obtendo as seguintes frações, que foram denominadas pelo solvente utilizado para separar os compostos, e estão presentes na Tabela 1 abaixo.

Tabela 2: denominação das frações obtidas do fracionamento do *C. brasiliense*

Solvente \ Amostra	Com espinho	Sem espinho
Residual (hidrometanólica)	C1	S1
Hexano	Não obteve massa suficiente	S2
Diclorometano	C2	S3
Acetato de etila	C3	S4
n-Butanol	C4	S5

A fração do solvente hexano da amostra com espinho não obteve massa suficiente após secagem. As frações foram diluídas na concentração de 5mg/mL em etanol para realização dos ensaios. A partir dos testes de inibição enzimática foi diluído o extrato bruto, denominado de C0 para o extrato bruto etanólico com espinho e S0 para o extrato bruto etanólico sem espinho.

#### 3.1. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Os resultados da prospecção fitoquímica pode ser observada na Tabela 3 e na Figura 1 abaixo.

Tabela 3: Prospecção fitoquímica das frações do *C. brasiliense*.

Flavonoides (mgQE/g)	Fenóis totais (mg GAE/g)
----------------------	--------------------------

S1	118,52	n/s
S2	153,23	50,62
S3	284,99	162,12
S4	n/s	285,97
S5	n/s	26,29
C1	105,02	2,68
C2	262,50	102,20
C3	27,25	288,88
C4	52,32	70,60

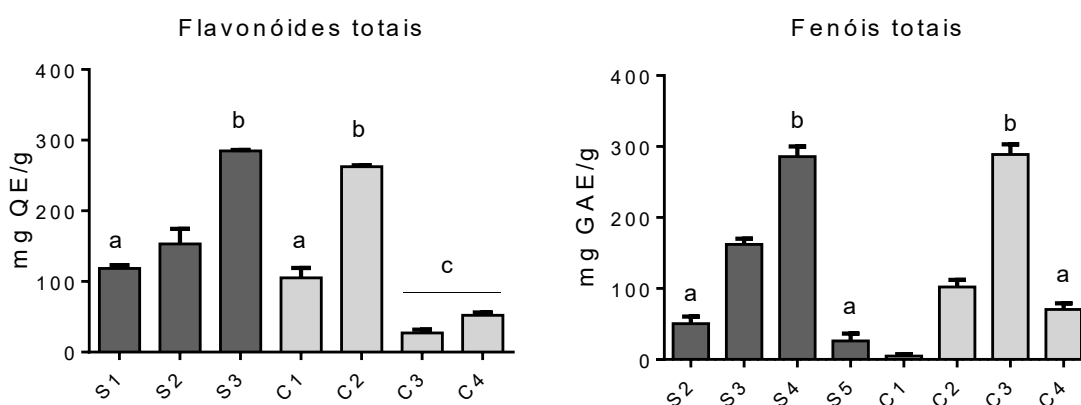


Figura 1: Prospecção fitoquímica das frações do *C. brasiliense*. Amostras com espinho: C1: hidrometanólica; C2: diclorometano; C3: acetato de etila; C4 n-Butanol; amostras sem espinho: S1 hidrometanólica; S2: Hexano; S3: diclorometano; S4: acetato de etila; S5: n-Butanol. Análise one-way ANOVA indicando que não houve diferença significativa entre as frações de mesma letra.

### 3.2. ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.2.1. CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO (ORAC)

Para iniciar os ensaios de estresse oxidativo *in-vitro*, o primeiro método foi o ORAC, onde a alta capacidade de redução do oxigênio foi avaliada nas frações, como visto na Figura 2. Sete das nove frações testadas obtiveram valores próximos

ao controle positivo (ácido ascórbico 1193,25  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ ), estes foram: C1 (1160,07) C2 (1213,62) C3 (1184,15), C4 (1145,51), S2 (1147,06), S3 (1140,08), S5 (1166,38). S1 (924,39) e S4 (1016,44) obtiveram valores mais baixos que os demais. Similar ao ácido ascórbico, o ácido gálico (1131,37) obteve uma capacidade significativa, diferente da quercetina (824,56) que não alcançou os demais.

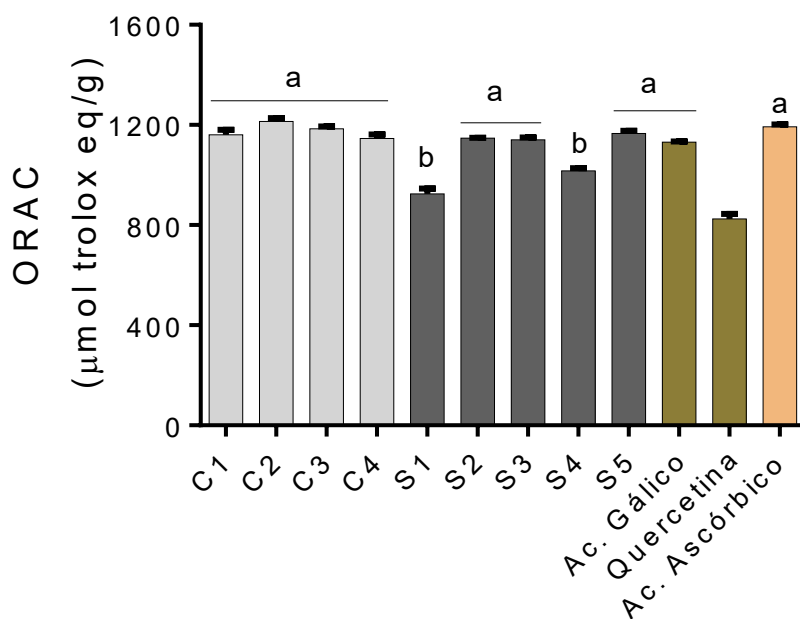


Figura 2: Gráfico da atividade antioxidante avaliada no método ORAC, em cada fração de *C. brasiliense*. Amostras com espinho: C1: hidrometanólica; C2: diclorometano; C3: acetato de etila; C4 n-Butanol; amostras sem espinho: S1 hidrometanólica; S2: Hexano; S3: diclorometano; S4: acetato de etila; S5: n-Butanol. Análise one-way ANOVA indicando que não houve diferença significativa entre as frações C1, C2, C3, C4, S2, S3, S5 com os controles ácido gálico e ácido ascórbico e entre S1 e S4. Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas.

### 3.2.2. POTENCIAL ANTIOXIDANTE REDUTOR FÉRRICO (FRAP)

Para este método, onde o potencial antioxidante das frações sob o íon férrico é avaliado, obtiveram valores contrastantes entre si e entre os controles. Duas amostras se sobressaíram em relação ao ácido ascórbico (520,48  $\mu\text{mol Trolox}$

eq/g), C2 (1220,24) e C3 (1145,71). As demais frações obtiveram valores inferiores: C1 (434,76), C4 (380,71) S1 (266,67), S2 (197,38), S3 (205,71), S4 (246,67) e S5 (284,05), como demonstra a Figura 3. Os dois controles também utilizados obtiveram os seguintes valores: quercetina 749,52 e ácido gálico 274,76  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ .

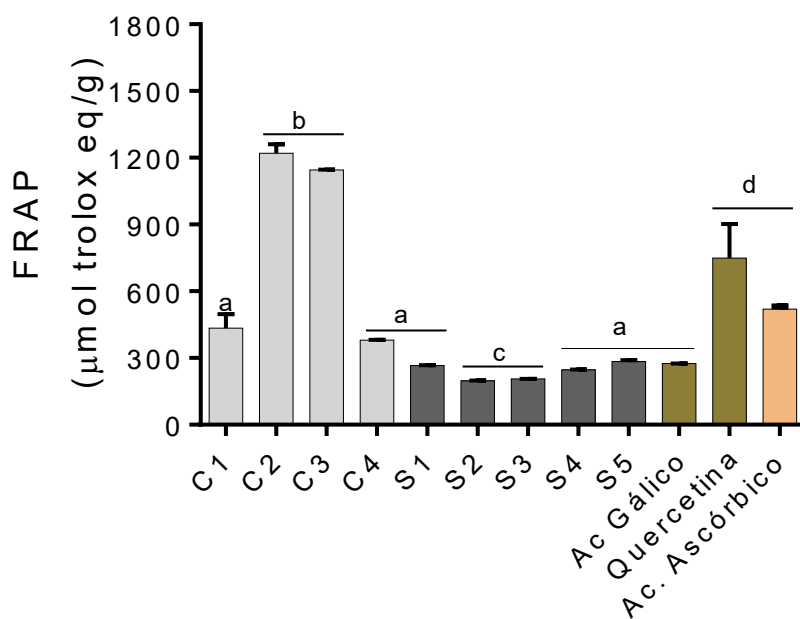


Figura 3: Gráfico da atividade antioxidante avaliada no método FRAP, em cada fração de *C. brasiliense*. Amostras com espinho: C1: hidrometanólica; C2: diclorometano; C3: acetato de etila; C4 n-Butanol; amostras sem espinho: S1 hidrometanólica; S2: Hexano; S3: diclorometano; S4: acetato de etila; S5: n-Butanol. Análise one-way ANOVA indicando que não houve diferença significativa entre C1, C4, S1, S4 e S5 e o controle ácido gálico. Não houve diferença significativa entre C2 e C3, e entre os controles quercetina e ácido ascórbico. Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas.

### 3.2.3. MÉTODO DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Para a realização do método DPPH, as frações foram diluídas seriamente mais três vezes a partir da concentração de 1 mg/mL, totalizando cinco pontos para



a curva (5, 1, 0,5, 0,25 0,125 mg/mL). Onde foi obtido o IC<sub>50</sub> de cada fração: C1: 830,1 ± 103,3; C2: 2,4 ± 0,6; C3: 1,2 ± 0,4; C4: 54,1 ± 11,7; S1: 1833 ± 314,7; S2: 101,5 ± 17,5; S3: 1,8 ± 0,2; S4: 0,2 ± 0,1; S5: 191,8 ± 34,29, como demonstrado na Figura 4. O controle positivo ácido ascórbico obteve 0,018 ± 0,003.

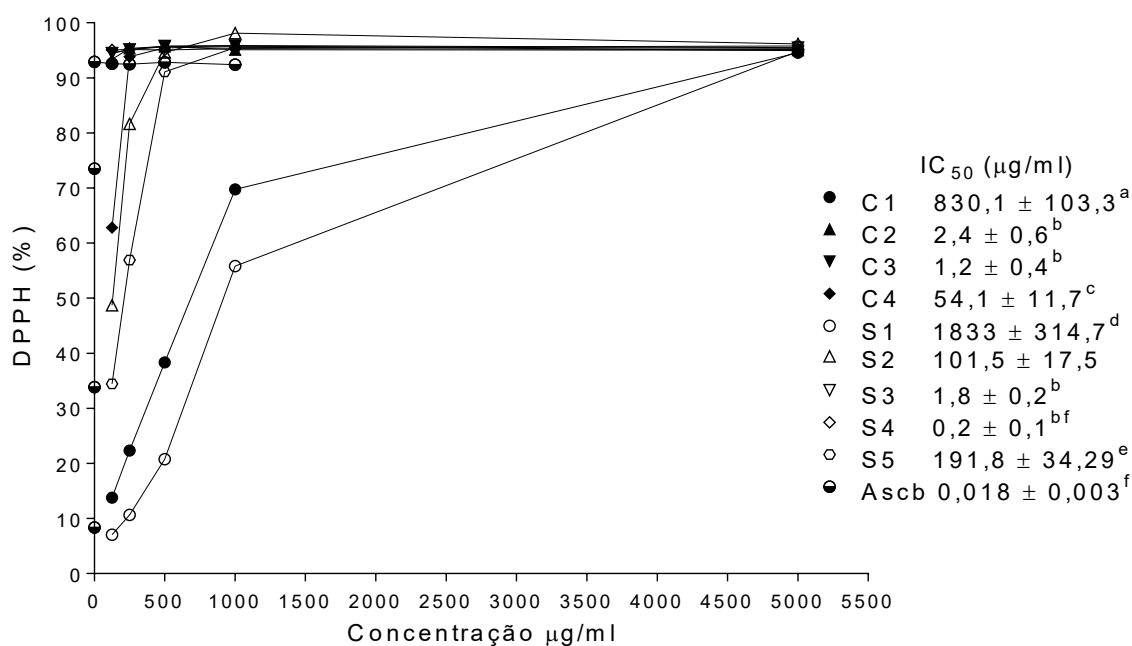


Figura 4: Gráfico da atividade antioxidante pelo método DPPH, em cada fração de *C. brasiliense*. Amostras com espinho: C1: hidrometanólica; C2: diclorometano; C3: acetato de etila; C4 n-Butanol; amostras sem espinho: S1 hidrometanólica; S2: Hexano; S3: diclorometano; S4: acetato de etila; S5: n-Butanol. Análise estatística da curva não linear (Hiperbola) indicando o EC<sub>50</sub> de cada amostra ± o erro. A análise two-way ANOVA indicando que não houve diferença significativa entre as frações C2, C3, S3 e S4. Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas.

### 3.3. DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

#### 3.3.1. INIBIÇÃO $\alpha$ -AMILASE

A amostras que apresentaram melhores resultados inibindo a  $\alpha$ -amilase foram C3 e S4 (64,65% e 38,07%, respectivamente). Seguidos de S3 (15,33%), C4 (14,22%) e S2 (13,47%). O restante tivera menos de 10% de inibição da atividade enzimática: C1: 8,16%, C2: 6,3%, C0: 3,95%, S1: 8,65%, S5: 2,53% como

apresenta a Figura 5. A fração S0 não obteve capacidade inibitória significativa. O ácido elágico apresentou 2,57% de inibição, enquanto o ácido gálico não teve atividade inibitória sob a enzima. Já o controle positivo, acarbose, apresentou 99,03% de inibição.

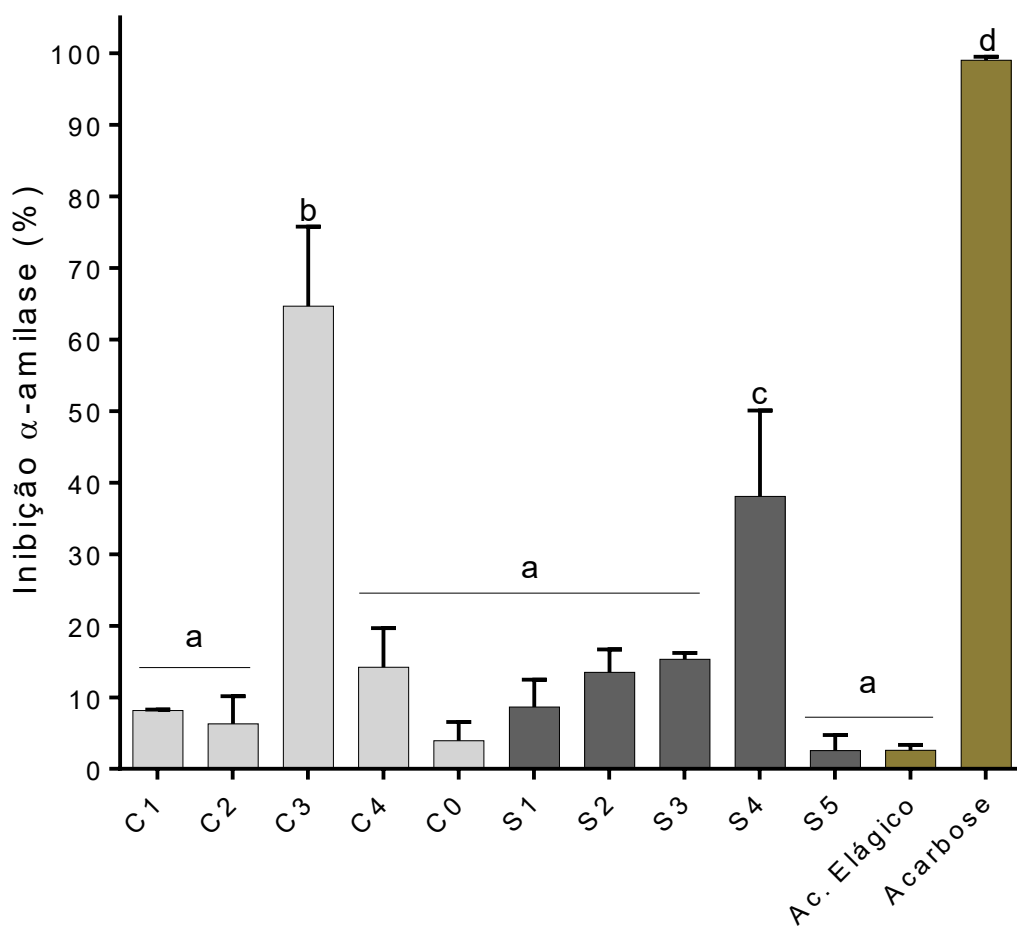


Figura 5: Gráfico da inibição da atividade da enzima  $\alpha$ -amilase, em cada fração de *C. brasiliense*. Amostras com espinho: C0: extrato etanólico; C1: hidrometanólica; C2: diclorometano; C3: acetato de etila; C4 n-Butanol; amostras sem espinho: S0: extrato etanólico; S1 hidrometanólica; S2: Hexano; S3: diclorometano; S4: acetato de etila; S5: n-Butanol. Análise one-way ANOVA indicando que não houve diferença significativa entre as frações C1, C2, C4, C0, S1, S2, S3, S5 e o controle ácido elágico. S0 e Ácido Gálico não inibiram a enzima em valores significativos ( $\geq 0$ ). Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas.

### 3.3.2. INIBIÇÃO $\alpha$ -GLICOSIDASE

Para a inibição da  $\alpha$ -glicosidase as amostras apresentaram pouca atividade. Somente duas amostras, C0 (3,20%) e S3 (13,64%), obtiveram a capacidade de inibir a enzima em baixa porcentagem. A quercetina alcançou a porcentagem de 23,02 %, enquanto a acarbose 54,79% demonstrados na Figura 6. Os ácidos elágico e gálico não obtiveram inibição quantitativa, semelhante ao restante das amostras.

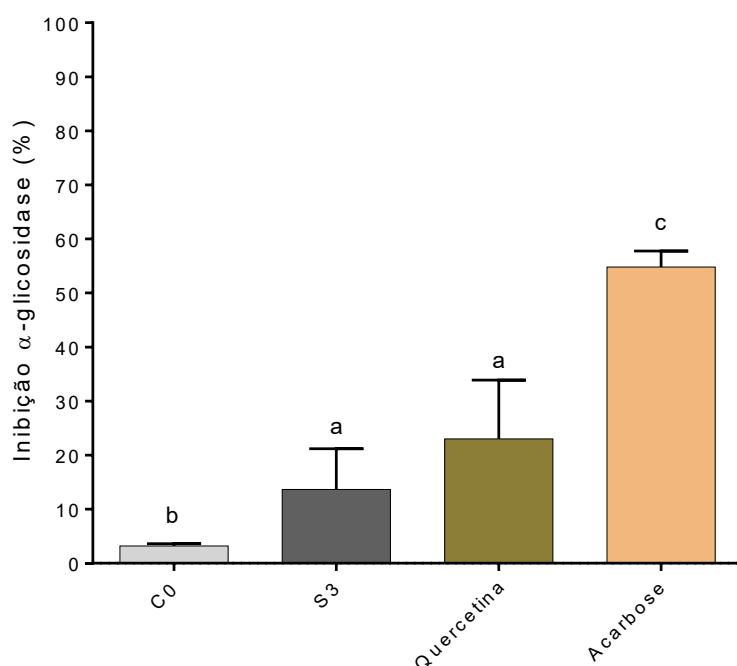


Figura 6: Gráfico da inibição da atividade da enzima  $\alpha$ -glicosidase, em cada fração de *C. brasiliense*. Amostras com espinho: C0: extrato etanólico; amostras sem espinho: S3: diclorometano. Análise one-way ANOVA indicando que não houve diferença significativa entre S3 e o controle quercetina. Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas.

### 3.4. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA

No ensaio de antiglicação, dos quatro protocolos que foram executados, o que obteve os melhores resultados para as amostras foi o BSA/frutose. C0 foi a amostra que apresentou maior porcentagem de inibição, 87,58%. Seguida de S3

(85,59%), S0 (82,65%), C4 (82,49%), S4 (84,48%), C2 (81,91%), C3 (81,35%), S5 (78,46%), C1 (63,07%). As amostras S2 (56,39%) e S1 (18,69%) foram as mais baixas, como demonstra a Figura 7. O controle positivo, quercetina, apresentou 100% de atividade, enquanto os ácidos elágico (85,01%) e gálico (94,26%) também apresentaram ótima atividade.

Para o método que utilizou da albumina sérica bovina, BSA, juntamente com o açúcar redutor metilglioxal os níveis percentuais de inibição da glicação proteica foram inferiores ao método anterior. A fração S3 alcançou 44,48% dessa inibição, visto que essa foi a maior porcentagem inibitória, seguidas de S4 (31,85%), C0 (31,30%) e S0 (30,32%), demonstra o baixo desempenho das frações ao impedir a glicação da BSA, como visto na Figura 7. As frações C2 e C4 não apresentaram inibição significativa para este método. Enquanto o controle positivo, quercetina, obteve um total de 85,34% de inibição, o ácido gálico (84,39%) se mostrou tão eficaz quanto o controle positivo, em contrapartida do ácido elágico (10%) que não teve eficiência na formação dos produtos da glicação.

No método seguinte, utilizando o aminoácido arginina juntamente com o metilglioxal, quatro (C1, S1, S4 e S5) das onze frações testadas não obtiveram sucesso ao inibir a glicação, como demonstrado na Figura 7. C3 (55,57%) foi a fração com maior porcentagem inibitória, seguida de S3 (43,72%) e S0 (27,90%). O controle quercetina obteve 81,90% de inibição, sendo superada pelo ácido gálico isolado, com 83,19%. Já o ácido elágico alcançou 42,77%.

Semelhante ao princípio do método anterior, utilizando o aminoácido arginina, mais um protocolo foi realizado com a utilização da lisina juntamente com o açúcar redutor metilglioxal. Nesses métodos as frações obtiveram melhores valores em relação ao método com a arginina. As frações C3 (66,78%), S4 (64,60%) e S3 (62,66%) foram as que melhores inibiram a glicação. Como pode se observar na Figura 7, as demais frações ficaram abaixo dos 50%. O controle quercetina inibiu 93,42% da glicação neste método, seguido pelo ácido gálico com 89,10%. O ácido elágico obteve 59,28% de inibição.

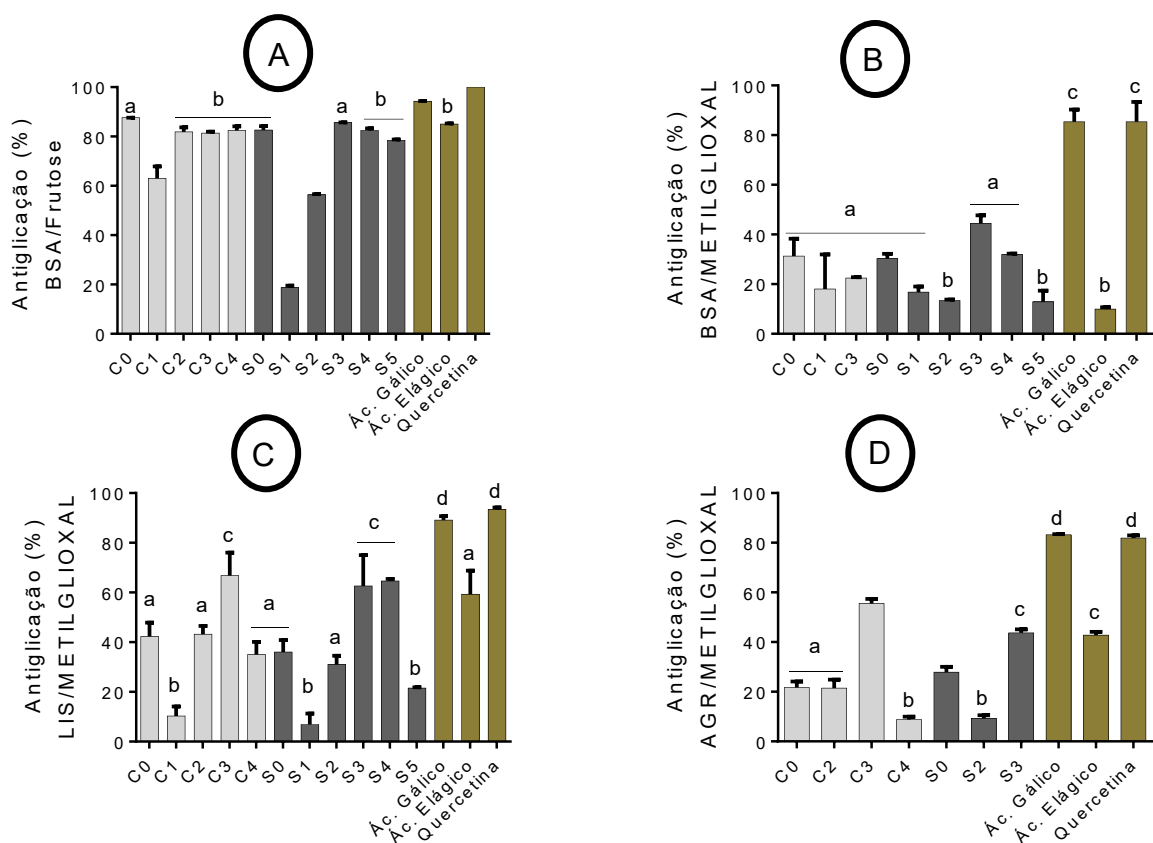


Figura 7: Gráfico da inibição da atividade da enzima  $\alpha$ -amilase, em cada fração de *C. brasiliense*. Amostras com espinho: C0: extrato etanólico; C1: hidrometanólica; C2: diclorometano; C3: acetato de etila; C4 n-Butanol; amostras sem espinho: S0: extrato etanólico; S1 hidrometanólica; S2: Hexano; S3: diclorometano; S4: acetato de etila; S5: n-Butanol. Métodos BSA/frutose (A); BSA/metilgloxal (B); lisina/metilgloxal (C); e arginina/metilgloxal (D). Letras iguais indicam que não houve diferenças significativa entre si.

### 3.5. ENSAIOS *ex vivo* EM TECIDO HEPÁTICO

#### 3.5.1. FRAP

Nesse método antioxidante realizado no tecido hepático, os controles Fig e FigOHT obtiveram os valores: 7,53 e 5,26  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ , respectivamente. Enquanto as frações alcançaram os valores de: C0: 62,37; C1: 17,29; C2: 97,14; C3: 113,93; C4: 43,94; S0: 62,30; S1: 13,70; S2: 41,67; S3: 96,20; S4: 108,62; S5:

28,70  $\mu\text{mol Trolox eq/g}$ , como demonstrado na Figura 8. Os ácidos gálico (893,16) e elágico (139,77) também foram testados para este método.

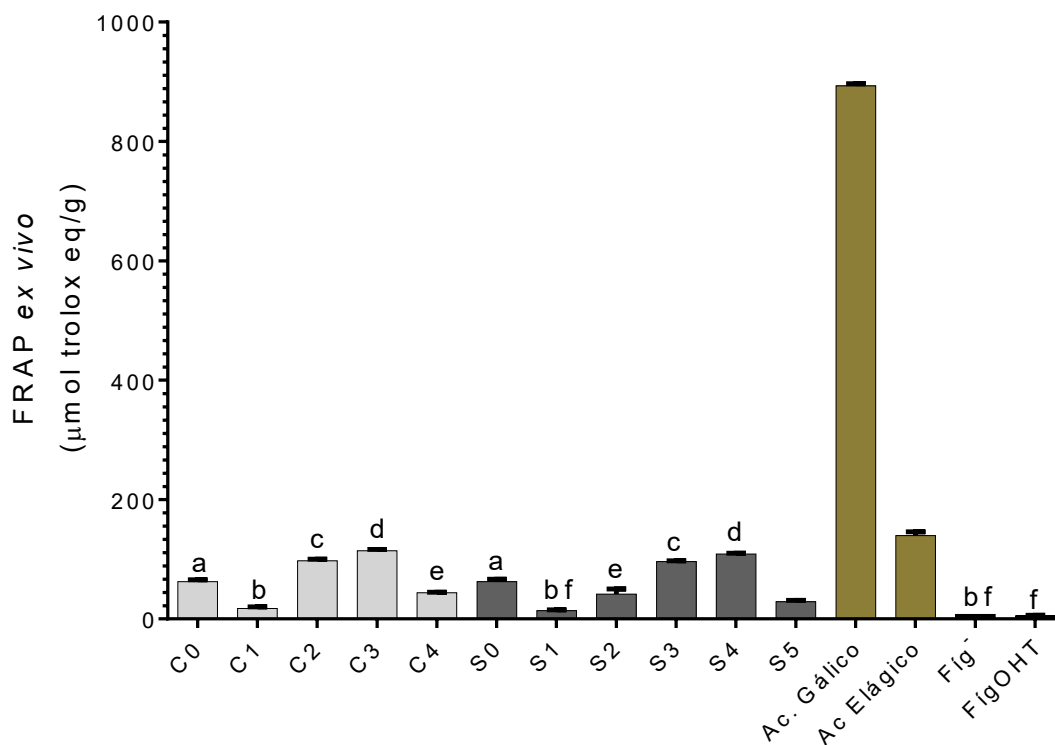


Figura 8: Gráfico da atividade antioxidante avaliada no método FRAP, em cada fração de *C. brasiliense*. Amostras com espinho: C1: hidrometanólica; C2: diclorometano; C3: acetato de etila; C4 n-Butanol; amostras sem espinho: S1 hidrometanólica; S2: Hexano; S3: diclorometano; S4: acetato de etila; S5: n-Butano. Fig-: controles do tecido não lesionado e FigOHT: controle com o tecido do fígado lesionado. Análise estatística one-way ANOVA indicando que não houve diferença significativa entre as frações C0 e S0, e entre C1, S1 e o controle Fig-. As frações C2 e S3, e C3 e S4, também foram indicadas como significativamente iguais, além dos controles Fig- e FigOHT. Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas.

### 3.5.2. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para o ensaio da peroxidação lipídica as frações obtiveram os seguintes valores em  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína: C0: 0,0924; C1: 0,0957; C2: 0,0988; C3: 0,0794:

C4: 0,081; S0: 0,0953; S1: 0,1078; S2: 0,103; S3: 0,1001; S4: 0,0905; S5: 0,0825, como visto na Figura 9. Assim como os ácidos gálico e elágico: 0,0857 e 0,0819, respectivamente. Os controles do tecido não lesionado (Fig) e lesionado (FigOHT) obtiveram os seguintes valores: 0,0794 e 0,1784, respectivamente.

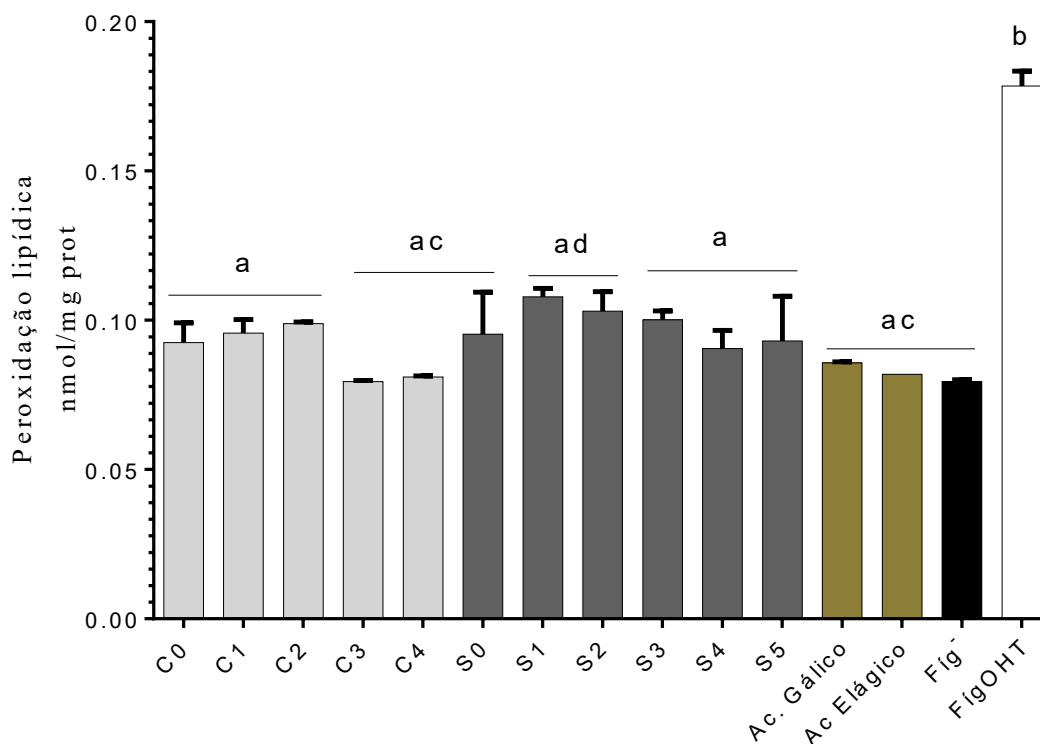


Figura 9: Gráfico da peroxidação lipídica, em cada fração de *C. brasiliense*. Amostras com espinho: C1: hidrometanólica; C2: diclorometano; C3: acetato de etila; C4 n-Butanol; amostras sem espinho: S1 hidrometanólica; S2: Hexano; S3: diclorometano; S4: acetato de etila; S5: n-Butano. Fig: controles do tecido não lesionado e FigOHT: controle com o tecido do fígado lesionado. A análise one-way ANOVA indica que não houve diferença significativa entre as frações e os ácidos gálico e elágico com o controle Fig. Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas.

### 3.5.3. ROS *ex vivo*

A quantidade de radicais livres no tecido em cada fração obteve os seguintes resultados: C0: 90,39; C1: 97,74; C2: 94,09; C3: 93,02; C4: 89,99; S0: 107,70; S1: 75,97; S2: 70,60; S3: 59,98; S4: 60,5; S5: 76,46. Os ácidos gálico e elágico

alcançaram os resultados de 50,79 e 50,42, respectivamente, como observado na Figura 10. Já os controles teciduais obtiveram 97,75 para o Fig<sup>-</sup> e 108,41 para o FigOHT.

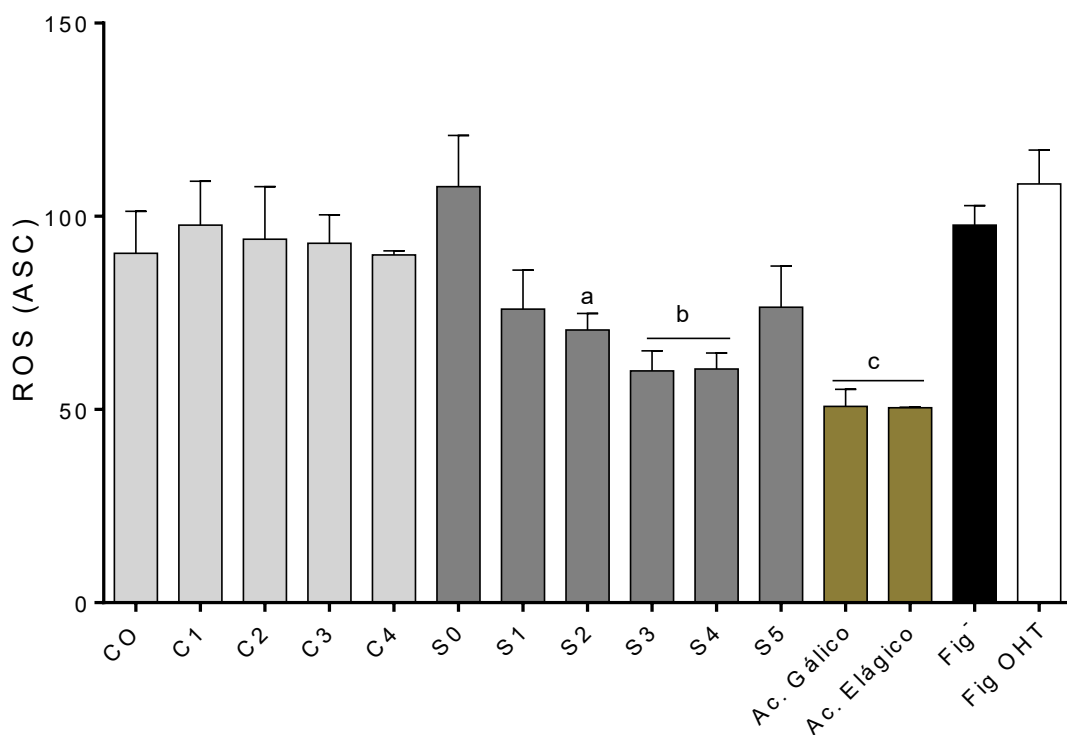


Figura10: gráfico da área sobre a curva do nível de espécies reativas de oxigênio livres, em cada fração de *C. brasiliense*. Amostras com espinho: C1: hidrometanólica; C2: diclorometano; C3: acetato de etila; C4 n-Butanol; amostras sem espinho: S1 hidrometanólica; S2: Hexano; S3: diclorometano; S4: acetato de etila; S5: n-Butano. Fig<sup>-</sup>: controles do tecido não lesionado e FigOHT: controle com o tecido do fígado lesionado. Análise one-way ANOVA indicando que não houve diferença significativa entre as frações S3 e S4, e entre os ácidos gálico e elágico. Letras iguais indicam que não houve diferenças significativas.

#### 4. DISCUSSÃO

O valor econômico e o âmbito social engrandecem o uso de fitoterápicos popularmente conhecidos, devido à sua disponibilidade em abundância, baixo



custo, pouco efeito colateral e baixa citotoxicidade, auxiliando na manutenção da qualidade de vida da população. O uso de fitoterápicos são assim, parte complementar para o tratamento de diversas enfermidades entre a população de baixa renda (BESSA *et al.*, 2013). O pequizeiro é considerado uma das principais espécies da flora brasileira, tanto na sua importância gastronômica regional, quanto na extração de óleos essenciais para cosméticos e propriedades terapêuticas (BRAGA *et al.*, 2022). Dessa maneira o estudo do *Caryocar brasiliense* (Camb.), seus produtos e subprodutos, tem extrema relevância para a comunidade. Com relação os compostos presentes em cada fração das amostras, casca de pequi com e sem espinho, apesar de ambos demonstrarem teores de flavonoides presente nas partições, a amostra com espinhos possui maiores concentrações de flavonoides totais. Já a relação de fenóis totais aparece distribuídas de forma similar em cada fração

Dentre as várias características do *C. brasiliense*, uma das que mais chama atenção é sua capacidade antioxidante. Óleos extraídos da polpa do pequi já haviam se mostrado eficientes no combate aos radicais livres, como demonstrou Braga *et al.* (2022). A capacidade da redução de ROS em tecido endotelial na presença do extrato etanólico do pequi descrita por Braga *et al.*, (2022), reforçam os achados de nosso trabalho em que as frações separadas do extrato etanólico apresentam alta capacidade na redução de íons livres, com aspecto antioxidante tanto para a amostra com espinho, quanto para a amostra sem espinho.

Uma maior diversidade de resultados entre as amostras é observada nos demais ensaios. Partindo para os ensaios antioxidantes, analisando a capacidade de redução do oxigênio (ORAC), as frações com espinho possuem alta capacidade em todas as frações, enquanto as frações hidrometanólica e acetato de etila da amostra sem espinho não possuem essa alta capacidade. No ensaio da redução do íon férrico, as frações obtidas a partir do diclorometano e do acetato de etila da amostra com espinho, possuem alta capacidade de redução do íon, o restante ficou abaixo dessas frações, demonstrando atividade, porém em baixo teor. Utilizando o íon 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, o método do DPPH demonstrou que as frações de diclorometano e acetato de etila de ambas as amostras obtiveram sucesso, estabelecendo um baixo valor de IC<sub>50</sub>.

Quando se trata de doenças degenerativas, como a *Diabetes Mellitus* do tipo 2, a inibição da  $\alpha$ -amilase e da  $\alpha$ -glicosidase é utilizada como uma importante via na regulação da absorção de glicose no intestino (THILAGAM *et al.*, 2013). Atualmente, fármacos como a acarbose, Miglitol e a Voglibose já estão disponíveis no mercado, porém o crescente número de estudos com fitoterápicos, que visam inibidores naturais para estas enzimas, tem demonstrado o potencial dessa classe. Utilizando das frações do extrato etanólico do *C. brasiliense*, pode-se observar a ação inibitória sob a  $\alpha$ -amilase de todas essas partições, com destaque para as frações que continham compostos do âmbito polar, visto que elas foram “capturadas” pelo solvente acetato de etila e o n-butanol.

Ao contrário da  $\alpha$ -amilase que foi afetada por quase todas as frações, a enzima  $\alpha$ -glicosidase teve sua atividade afetada somente por uma fração isolada, diclorometano pela amostras sem espinho, e o extrato etanólico bruto da amostra sem espinho. A presença de fenóis nas frações mais polares pode ter grande influência sob essa inibição, Caldeira *et al.*, (2021), demonstrou que frações ricas em fenóis possuem grande inibição para essas enzimas, diminuindo sua atividade.

Os AGEs constituem uma grande variedade de substâncias formadas a partir de interações amino carbonílico, de natureza não-enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (MONNIER, 2003). Os mecanismos alternativos de formação de AGEs incluem a chamada via do estresse carbonílico, na qual a oxidação de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos. Metilglioxal e glioxal são produtos da glicólise e da autooxidação da glicose, esses dicarbonílicos chegam a serem vinte mil vezes mais reativos que a glicose e agem como principais intermediários da formação de AGEs interagindo com aminoácidos (FRANCO *et al.*, 2020). Dos métodos utilizados neste trabalho, o que teve melhor ação das frações no processo de inibição da formação de AGEs, foi o método envolvendo a albumina sérica bovina, ASB (*Bovine serum albumin*, BSA) e a frutose como açúcar redutor.

Produtos naturais que possuem altos teores de flavonoides e polifenóis, tem ações antioxidantes e podem influenciar na eliminação de AGEs através de

diversos mecanismos, como a captura do açúcar redutor ou a inibição da reação, interferindo nas bases de Schiff, intermediários da produção de AGEs (YEH *et al.*, 2017). Como observado neste trabalho, as frações que possuem teores consideráveis desses compostos obtiveram mais sucesso nos ensaios antioxidantes e antiglicantes. Mesmo as frações que não tiveram esses compostos identificados na prospecção fitoquímica realizada podem conter metabólitos secundários que estejam atuando e contribuindo para a manutenção da redução de radicais livres nos ensaios. Na inibição da produção de AGEs, quando se trata de açúcar pouco reativo, como a frutose, as frações obtiveram sucesso na neutralização na produção dos AGEs, porém ao adicionar um açúcar mais reativo, como o metilglioxal utilizado, poucas frações possuem tal reação.

O tecido hepático está entre os mais suscetíveis aos danos causados pela hiperglicemia, levando a danos causados pela presença dos radicais livres, que em produção excessiva pode induzir a apoptose do tecido, levando a liberação de componentes pró-inflamatórios (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2021).

Como visto nesse trabalho, frações da casca de *C. brasiliense* apresentam ação protetora sobre o tecido hepático da peroxidação lipídica e da produção de ROS nos ensaios *ex-vivo*. Assim como nos ensaios *in-vitro*, essa proteção pode ser originária dos flavonoides e polifenóis presentes nas frações, ou em consequência de metabólitos secundários presentes. (YEH *et al.*, 2017).

Ao analisar os ensaios em tecido hepático, começando pelo teste antioxidantes, vemos um comportamento similar nas frações obtidas de cada solvente, num comparativo com o teste *in-vitro*, é observado uma diminuição na atividade das amostras com espinho, diclorometano e acetato de etila, porém a atividade ainda é presente. Na peroxidação lipídica, a amostra com espinho, frações acetato de etila e n-butanol, demonstrou capacidade de diminuir a peroxidação maior que o restante das frações, as demais frações ainda obtiveram baixos valor, comparadas ao controle negativo do tecido lesionado, protegendo o tecido. Por fim, inibindo a produção de espécies de oxigênio livre, ambas as amostras protegeram o tecido da peroxidação da membrana lipídica, obtendo

baixos valores para o ensaio de ROS, com destaque para a amostra sem espinho, que tiveram efeitos mais baixo e, portanto, um melhor efeito protetor para o tecido.

O ácido gálico isolado se mostrou superior ao ácido elágico ao obter uma alta capacidade antiglicante. Além de oferecer uma maior proteção ao tecido hepático nos ensaios *ex-vivo*.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram a capacidade das amostras fracionadas da casca do *C. brasiliense*, com e sem espinho, na ação como antioxidante e antiglicantes nos métodos *in-vitro* propostos. Além dos ensaios *ex vivo* demonstrar que as frações protegeram o tecido, com destaque para as frações diclorometano e acetato de etila de cada amostra. Para a inibição enzimática, as amostras obtiveram sucesso em inibir a  $\alpha$ -amilase, com destaque para a fração acetato de etila novamente. Já para a  $\alpha$ -glicosidase, as amostras não obtiveram tanto êxito. Os modelos antiglicantes demonstraram que as frações não foram muito eficiente na reação com o açúcar mais reativo, porém no método envolvendo a enzima BSA e um açúcar menos reativo, a frutose, os resultados são melhores. Podemos concluir que as frações obtidas pelos solventes diclorometano e acetato de etila obtivera os compostos que melhor respondeu aos testes e protocolos propostos. Demais estudos são necessários para avaliar melhor os efeitos dessas frações e seus componentes, definindo melhor os mecanismos presentes em cada uma e se possuem efeitos isolados ou em conjuntos.

## 6. REFERÊNCIAS

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v. 239, n. 1, p. 70-76, 15 jul. 1996.

<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

BESSA, N. G. F. DE et al. Preliminary phytochemical screening of native Cerrado plants of medicinal popular use by the rural community of the Vale Verde settlement - Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500010>

BRAGA, K. M. S. et al. Pequi Fruit Extract Increases Antioxidant Enzymes and Reduces Oxidants in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Antioxidants*, v. 11, n. 3, p. 474, 28 fev. 2022.

<https://doi.org/10.3390/antiox11030474>

BRASIL, M. DO M. A. Cerrado. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/ecossistemas-1/biomas/cerrado>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

CALDEIRA, A. S. P. et al. Bioguided chemical characterization of pequi (*Caryocar brasiliense*) fruit peels towards an anti-diabetic activity. *Food Chemistry*, v. 345, p. 128734, 30 maio 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128734>

CARVALHO, L. S. DE; PEREIRA, K. F.; ARAÚJO, E. G. DE. Botanical features, therapeutic effects and active ingredients present in pequi (*Caryocar brasilia*). *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 19, n. 2, p. 147-157, 2015.

<https://doi.org/10.25110/arqsaude.v19i2.2015.5435>

DE SOUSA, E. et al. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *Journal of Natural*

Products, v. 67, n. 5, p. 829-832, maio 2004.  
<https://doi.org/10.1021/np030513u>

Diabetes. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/diabetes>>. Acesso em: 18 ago. 2022.

FRANCO, R. R. et al. Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 215, p. 140-146, 6 abr. 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.032>

FRANCO, R. R. et al. Antidiabetic potential of *Bauhinia forficata* Link leaves: a non-cytotoxic source of lipase and glycoside hydrolases inhibitors and molecules with antioxidant and antiglycation properties. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, v. 123, p. 109798, mar. 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109798>

JUNIOR, A. J. et al. Analgesic and Anti-inflammatory Effects of *Caryocar brasiliense*. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 3, p. 313-322, 2020.  
<https://doi.org/10.2174/1871523018666190408144320>

JUSTINO, A. B. et al. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, v. 100, p. 83-92, abr. 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.172>

JUSTINO, A. B. et al. B procyanidins of *Annona crassiflora* fruit peel inhibited glycation, lipid peroxidation and protein-bound carbonyls, with protective effects on glycated catalase. *Scientific Reports*, v. 9, p. 19183, 16 dez. 2019.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55779-3>

KERR, W. E.; SILVA, F. R. DA; TCHUCARRAMAE, B. Pequi (Caryocar Brasiliense Camb.): informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 29, p. 169-171, abr. 2007.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-29452007000100035>

LIMA JÚNIOR, J. P. DE et al. Anacardium humile St. Hil as a novel source of antioxidant, antiglycation and  $\alpha$ -amylase inhibitors molecules with potential for management of oxidative stress and diabetes. Journal of Ethnopharmacology, v. 268, p. 113667, 25 mar. 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113667>

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition, v. 79, n. 5, p. 727-747, maio 2004.  
<https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>

MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 419, n. 1, p. 1-15, 1 nov. 2003.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.014>

RIDDLE, D. R. Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms. [s.l.] CRC Press, 2007.  
<https://doi.org/10.1201/9781420005523>

Rodriguésia: Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 61p. 1-1556

ROLL, M. M. et al. The pequi pulp oil (Caryocar brasiliense Camb.) provides protection against aging-related anemia, inflammation and oxidative stress in Swiss mice, especially in females. Genetics and Molecular Biology, v. 41, n. 4, p. 858-869, 2018.  
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0218>

ROMANO, A. D. et al. Oxidative stress and aging. *Journal of Nephrology*, v. 23 Suppl 15, p. S29-36, out. 2010.

THILAGAM, E. et al.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of *Senna surattensis*. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, v. 6, n. 1, p. 24-30, fev. 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.jams.2012.10.005>

VESKOUKIS, A. S.; TSATSAKIS, A. M.; KOURETAS, D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress & Chaperones*, v. 17, n. 1, p. 11-21, jan. 2012.

<https://doi.org/10.1007/s12192-011-0293-3>

YAN, L.-J. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biology*, v. 2, p. 165-169, 9 jan. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.01.002>

YEH, W.-J. et al. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. *Journal of Food and Drug Analysis, Dietary Natural Compounds*. v. 25, n. 1, p. 84-92, 1 jan. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.017>

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, ago. 2001.

<https://doi.org/10.1021/jf0103572>

ZOU, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 6, p. 2268-2276, 23 mar. 2011.

<https://doi.org/10.1021/jf104640k>