

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARIA JÚLIA MAIA GONÇALVES GRANATO

**EXTRATO DE *Salacia crassifolia* ATENUA O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO
PELO ACÚMULO DE LIPÍDIOS EM CÉLULAS HepG2**

PATOS DE MINAS – MG
ABRIL DE 2025

MARIA JÚLIA MAIA GONÇALVES GRANATO

**EXTRATO DE *Salacia crassifolia* ATENUA O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO
PELO ACÚMULO DE LIPÍDIOS EM CÉLULAS HepG2**

Artigo científico apresentado ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Joyce Guerra
Coorientador: Me. Vinícius Marques Arruda

PATOS DE MINAS – MG

ABRIL DE 2025

MARIA JÚLIA MAIA GONÇALVES GRANATO

Extrato de *Salacia crassifolia* atenua o estresse oxidativo induzido pelo acúmulo de lipídios em células HepG2

Artigo científico apresentado ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Dra. Joyce Ferreira da Costa Guerra – IBTEC – UFU
Presidente

Dra. Terezinha Aparecida Teixeira – IBTEC – UFU
Membro

Me. Bruno Quintanilha Faria – PPGCF – UFPR
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

Patos de Minas, 25 de abril de 2025

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio e incentivo de diversas pessoas, às quais sou eternamente grata.

Agradeço primeiramente à minha família, por toda a compreensão e carinho ao lidar com a distância e por estarem presentes em todos os momentos difíceis.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, principalmente aos do Laboratório de Bioquímica e Processos Redox, pelo companheirismo e pelos momentos de cumplicidade, que evitaram a ocorrência de um colapso mental.

A toda a comunidade da UFU, especialmente aos professores e funcionários do curso de Biotecnologia, pela excelência no ensino e pelo apoio constante ao longo da graduação.

À professora Terezinha e ao Laboratório de Nanotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, pela colaboração essencial no trabalho com o extrato e a espécie estudada.

Às agências de fomento CNPq e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de pesquisa, essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

À minha professora orientadora Joyce Guerra, pela dedicação, paciência e valiosas contribuições acadêmicas, fundamentais para a realização deste trabalho.

Extrato de *Salacia crassifolia* atenua o estresse oxidativo induzido pelo acúmulo de lipídios em células HepG2

Maria Júlia Maia Gonçalves Granato¹, Vinícius Marques Arruda¹, Adilson Júnior Alves Bezerra¹, Frank Machado Silva¹, Tiara da Costa Silva^{2,3}, Diego Godina Prado⁴, Raoni Pais Siqueira⁵, Terezinha Aparecida Teixeira¹, Joyce Ferreira da Costa Guerra^{2,*}.

¹ Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas 38700-002, Brasil;

² Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 38405-319, Brasil.

³ Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 38025-440, Brasil

⁴ Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 38405-319, Brasil.

⁵ Instituto Nacional da Propriedade Industrial, INPI, Rua Mairink Veiga, 9 - Centro, Rio de Janeiro, RJ, 20090-910.

* Autor correspondente: joyceguerra@ufu.br

Resumo: A esteatose hepática metabólica (MASLD) é a mais frequente das doenças crônicas do fígado no mundo e ainda não possui tratamento farmacológico aprovado. Sua patogênese é multifatorial, sendo o estresse oxidativo o principal fator envolvido. Nesse contexto, espécies do gênero *Salacia* têm despertado interesse devido ao seu potencial terapêutico e ação antioxidante. Assim, este estudo avaliou os efeitos do extrato aquoso das folhas de *S. crassifolia* (EAS) em um modelo *in vitro* da MASLD utilizando células HepG2 com acúmulo de lipídios induzido pela incubação com os ácidos graxos palmítico e oleico. A caracterização fitoquímica do EAS demonstrou a presença de compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos e flavonoides e uma alta atividade antioxidante pelo método ORAC. O EAS não apresentou citotoxicidade e, embora não tenha reduzido o acúmulo de lipídios, promoveu melhora significativa no balanço redox das células, com diminuição dos níveis de ROS e aumento das defesas antioxidantes, glutatona total, e atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona transferase. Este é o primeiro estudo a associar *S. crassifolia* à modulação do estresse oxidativo na MASLD, indicando seu potencial como fonte promissora de compostos bioativos. Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos.

Palavras-chaves: Ácidos graxos; Antioxidantes; Bacupari; Espécies reativas de oxigênio; Esteatose hepática; Glutaciona.

Abstract: *Metabolic-associated steatotic liver disease (MASLD) is the most common chronic liver disease worldwide and currently lacks approved pharmacological treatment. Its pathogenesis is multifactorial, with oxidative stress being the main contributing factor. In this context, species of the Salacia genus have attracted interest due to their therapeutic potential and antioxidant activity. Therefore, this study evaluated the effects of the aqueous extract from *S. crassifolia* leaves (EAS) in an in vitro model of MASLD using HepG2 cells with lipid accumulation induced by incubation with palmitic and oleic fatty acids. Phytochemical characterization of EAS demonstrated the presence of bioactive compounds, including phenolic compounds and flavonoids, as well as high antioxidant activity measured by the ORAC method. EAS showed no cytotoxicity and, although it did not reduce lipid accumulation, it significantly improved the redox balance of the cells, decreasing ROS levels and increasing antioxidant defenses, including total glutathione and the activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione S-transferase. This is the first study to associate *S. crassifolia* with oxidative stress modulation in MASLD, indicating its potential as a promising source of bioactive compounds. Further studies are needed to elucidate the molecular mechanisms involved.*

Keywords: *Antioxidants; Bacupari; Fatty acids; Glutathione; Hepatic steatosis; Reactive oxygen species*

1. INTRODUÇÃO

A esteatose hepática metabólica (MASLD, *Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*) é uma condição caracterizada por um acúmulo maior que 5% de lipídios nas células do fígado que pode evoluir para estágios mais graves como a esteato-hepatite, cirrose e hepatocarcinoma [1]. Ademais, essa patologia é multifatorial e está associada a resistência à insulina (RI), diabetes *mellitus* tipo II e obesidade. Atualmente, é a mais frequente das doenças crônicas do fígado, com uma prevalência estimada em mais de 30% na população global, e aproximadamente 35% no Brasil [2,3].

O fígado desempenha um papel essencial na homeostase do metabolismo lipídico, sendo responsável pela síntese e exportação de ácidos graxos (AG). Entretanto, a desregulação desse processo leva ao acúmulo de gotículas lipídicas nos hepatócitos, resultando em um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), disfunção mitocondrial e estresse no retículo endoplasmático [4]. Em condições fisiológicas, as ROS são neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante endógeno, através da ação das enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), que transforma o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é neutralizado pela ação da catalase (CAT) gerando água e oxigênio molecular, e glutathione peroxidase (GP_X) que também decompõe o H_2O_2 em água ao utilizar a glutathione (GSH) como doador de elétrons, peróxidos orgânicos e xenobióticos são reduzidos pela glutathione S-transferase (GST) [5]. Adicionalmente, a GSH é oxidada na reação catalisada pela GP_X à sua forma glutathione

dissulfeto (GSSG), a qual é reduzida novamente a GSH pela glutathione redutase, uma reação dependente do NADPH, formando um ciclo redox [6]. No entanto, o desequilíbrio entre a produção excessiva de ROS e a ação das defesas antioxidantes desencadeia o estresse oxidativo, um dos principais fatores envolvidos na patogênese da MASLD [1]. Pacientes diagnosticados com a doença, frequentemente apresentam níveis elevados de ROS e produtos de peroxidação lipídica, e alteração do balanço redox [7]. Essas evidências reforçam o papel central do estresse oxidativo na MASLD e destacam a importância da compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos, visando aprimorar estratégias de diagnóstico e tratamento.

Até o momento, não existe tratamento farmacológico aprovado para a MASLD. Uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos agentes é o uso de compostos bioativos derivados de plantas [8]. Os metabólitos secundários podem ser classificados em três grandes grupos, compostos fenólicos, terpenos e alcaloides e suas propriedades biológicas estão intimamente relacionadas à sua ampla diversidade estrutural [9]. Dentre os compostos fenólicos, os polifenóis se destacam por sua abundância e relevância funcional, sendo subdivididos em flavonoides e não flavonoides. Nesse contexto, diversas pesquisas têm investigado suas propriedades, e já foi demonstrado que, quando isolados, esses compostos apresentam atividade antioxidante e antiesteatótica, promovendo a redução do acúmulo de lipídios intracelular. Além disso, evidências indicam que os polifenóis modulam o sistema antioxidante celular, induzindo o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e, consequentemente, atenuando o estresse oxidativo [10]. Esses achados sustentam a hipótese de que tais compostos possuem potencial terapêutico na prevenção e progressão da MASLD.

Nesse cenário, o Cerrado Brasileiro, o segundo maior bioma do país, é considerado um *hotspot* mundial de biodiversidade. Espécies do gênero *Salacia* (família *Celastraceae*), amplamente distribuídas na América do Sul, têm sido descritas na literatura como potenciais fontes de compostos bioativos com propriedades antiinflamatórias e antidiabéticas [11]. Entre as espécies deste gênero, *Salacia crassifolia* (Mart. Ex Schult.) G. Don, popularmente conhecida como Bacupari, nativa do Cerrado brasileiro, tem sido usada na medicina tradicional como um agente antiinflamatório, antitumoral e antimicrobiano [11,12]. Rodrigues *et al* [11] determinaram a composição fitoquímica do extrato hexânico das folhas do *S. crassifolia* e identificaram diferentes metabólitos secundários como triterpenos pentacíclicos, flavonoides, e esteroides, dentre outras moléculas. Além disso, os compostos testados apresentaram alta atividade antioxidante, potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase e ação antimicrobiana. Em estudos adicionais, a pristimerina isolada, composto da classe dos terpenos, combinada com o extrato bruto da *S. crassifolia* apresentou atividade antimicrobiana.

Outro composto isolado e testado, o flavonoide epicatequina, também apresentou atividade contra o vírus Mayaro, abrindo possibilidade para ser combinado com outras terapias antivirais [13,14].

O objetivo deste trabalho foi determinar a composição fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *Salacia crassifolia* (EAS) e investigar seus efeitos biológicos sobre a viabilidade celular, o acúmulo de lipídios e o estresse oxidativo em um modelo *in vitro* da esteatose hepática metabólica.

2. RESULTADOS

2.1 Análise do extrato por HPLC-ESI-MS/MS e determinação da capacidade antioxidante

A análise de composição química do EAS, através de HPLC-ESI-MS/MS, identificou 21 diferentes compostos (Tabela 1), classificados pela ordem do tempo de retenção das moléculas obtido pelo cromatograma (Figura 1). Dentre os principais achados, tem-se dois ácidos orgânicos, quatro terpenos e quatorze compostos fenólicos, seis dos quais pertencentes à classe dos flavonoides, com destaque para o kaempferol, rutina e quercetina.

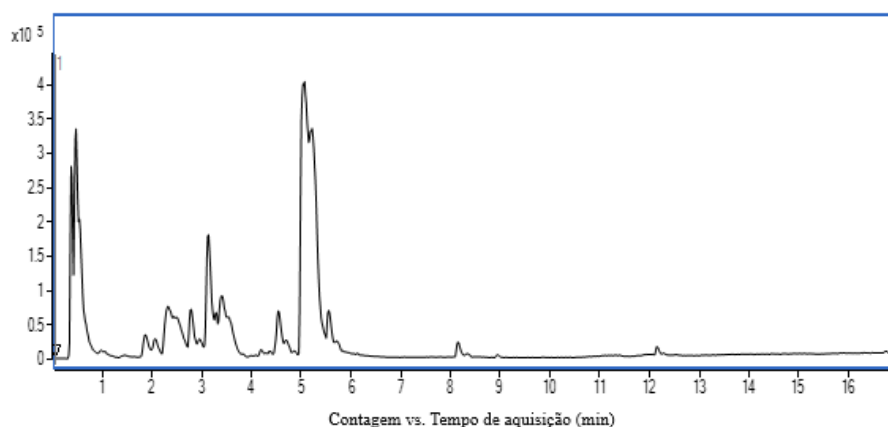


Figura 1: Cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem usando ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MS/MS) de uma amostra do extrato aquoso de *S. crassifolia*. Cada pico corresponde à presença de compostos bioativos identificados com base no tempo de retenção e comparação com a literatura.

Composto	Tempo de retenção (min)	Massa Molecular	Fragmento de íons (<i>m/z</i>) MS/MS	Fórmula Molecular
Sorbitol	0.395	181.0745	15 eV: 163, 119, 101, 89, 71, 59	C ₆ H ₁₄ O ₆
Ácido málico	0.480	133.0142	15 eV: 115, 89, 71, 59	C ₄ H ₆ O ₅
Ácido cítrico	0.528	191.0197	10 eV: 111, 87, 85	C ₆ H ₈ O ₇
(Epi)galocatequina →(epi)galocatequina	0.863	609.1250	15 eV: 483, 441, 423, 305, 177, 125	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄
Ácido protocatecuico glicosídeo	1.061	315.0722	20 eV: 153, 152, 109, 108	C ₁₃ H ₁₆ O ₉
Derivado de catequina	1.926	--	20 eV: 405, 289, 243, 179, 161, 14, 119, 113, 101, 89, 71, 59	--
(Epi)catequina- (epi)galocatequina	1.961	593.1301	15 eV: 575, 467, 441, 423, 407, 305, 289, 125	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃
Epigalocatequina	2.459	305.0667	20 eV: 219, 179, 167, 165, 137, 125	C ₁₅ H ₁₄ O ₇
Cumaroil- hexosídeo	2.742	325.0929	20 eV: 163, 119	C ₁₅ H ₁₈ O ₈
Uveosídeo	2.792	491.1348	20 eV: 371, 311, 281, 251, 209	C ₂₇ H ₂₄ O ₉
Lasiantionosídeo isômero I	2.892	449.2028	20 eV: 241	C ₁₉ H ₃₂ O ₉ (HCOOH)
(Epi)catequina- (epi)catequina	2.912	577.1351	15 eV: 451, 425, 407, 289, 245, 161, 125	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
Lasiantionosídeo isômero II	3.110	449.2028	20 eV: 241	C ₁₉ H ₃₂ O ₉ (HCOOH)
Epicatequina	3.541	289.0718	15 eV: 245, 221, 205, 203, 179, 151, 137, 125, 109	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Diidro-vomifoliol glicosídeo formiato	3.824	433.2079	15 eV: 387, 179, 161, 119, 89, 71	C ₁₉ H ₃₂ O ₈ (HCOOH)
Quercetina O- glicosil-ramnosil- glicosídeo	4.390	771.1989	30 eV: 591, 505, 301, 300	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁
Miricetina ramnosídeo- glicosídeo	4.457	625.1410	30 eV: 463, 317, 316, 300, 271	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇
Lariciresinol 4'-O- glicosídeo	4.490	567.2083	15 eV: 521, 359, 329	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁ (HCOOH)
Vomifoliol glicosídeo formiato	4.673	431.1923	20 eV: 385, 367, 327, 205, 298, 261, 223, 205, 165, 161, 119, 113, 101, 89, 71, 59	C ₂₀ H ₃₂ O ₁₀ (HCOOH)
Quercetina xilosil- rutinosídeo	4.856	741.1884	25 eV: 300, 161	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₀
N.a	4.990	--	15 eV: 387, 297, 271, 221, 161, 71	--
Rutina	5.107	609.1461	30 eV: 301, 300, 271, 255, 179	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
Kaempferol- glicosídeo- ramnosídeo	5.706	593.1512	30 eV: 285, 284, 255, 227, 151	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
N.a	5.855	--	30 eV: 677, 609	--
N.a	6.188	--	--	--

Tabela 1: Anotação dos compostos do extrato aquoso de *Salacia crassifolia* determinados por HPLC-ESI-MS/MS.

A capacidade antioxidante do EAS, testada em concentrações de 2,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ está representada na Figura 2. Os resultados indicam uma alta capacidade de sequestro do radical peroxila do extrato aquoso das folhas de *S. crassifolia* e que o perfil da curva de decaimento da amostra exibe um comportamento dose-dependente. Além disso, o EAS na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ foi mais eficaz em inibir o decaimento da fluorescência que o antioxidante de referência Trolox na mesma concentração.

O EAS apresentou um valor médio de $7237,5 \pm 60,10 \mu\text{M ET/g}$ (equivalente de Trolox por grama de extrato), revelando uma elevada capacidade antioxidante.

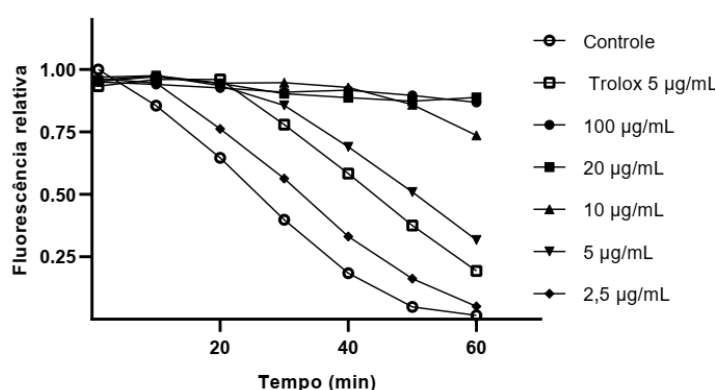


Figura 2: Cinética do decaimento da fluorescência do ensaio ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) durante 60 minutos na presença de Trolox à 5 $\mu\text{g/mL}$ e do extrato aquoso de *Salacia crassifolia* nas concentrações de 2,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Média \pm DP = $7237,5 \pm 60,10 \mu\text{M ET/g}$ (equivalente de Trolox por grama de extrato) ($n=3$).

Esses resultados indicam que o EAS apresenta uma composição rica em compostos bioativos e com alta atividade antioxidante. Essa caracterização é fundamental para elucidação dos potenciais efeitos terapêuticos na MASLD.

2.2 Determinação da carga lipídica intracelular

Para verificar o efeito do EAS sobre o conteúdo de lipídios intracelular, foi realizada a coloração com o corante *Oil Red O* (ORO), que apresenta afinidade por lipídios neutros, conferindo-lhes uma coloração avermelhada, visualizada por microscopia óptica. A análise quantitativa da coloração está representada na Figura 3. Conforme esperado, no grupo controle (C), a coloração observada foi pouco intensa. Em contraste, no grupo exposto aos ácidos graxos palmítico e oleico (FA), houve um aumento significativo na quantidade de gotículas lipídicas intracelulares em relação ao grupo C. Os grupos tratados com o extrato de *S. Crassifolia*, após acúmulo lipídico, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (EAS50 e EAS100), não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo FA, no entanto, apresentaram valores intermediários, semelhantes estatisticamente ao grupo controle, sugerindo uma possível

modulação do metabolismo de lipídios celular.

Em síntese, esses achados confirmam a eficiência da indução do acúmulo de lipídios induzido por ácidos graxos em células HepG2 e, portanto, do modelo *in vitro* proposto e indicam que o EAS pode apresentar potencial de modular o metabolismo de lipídios.

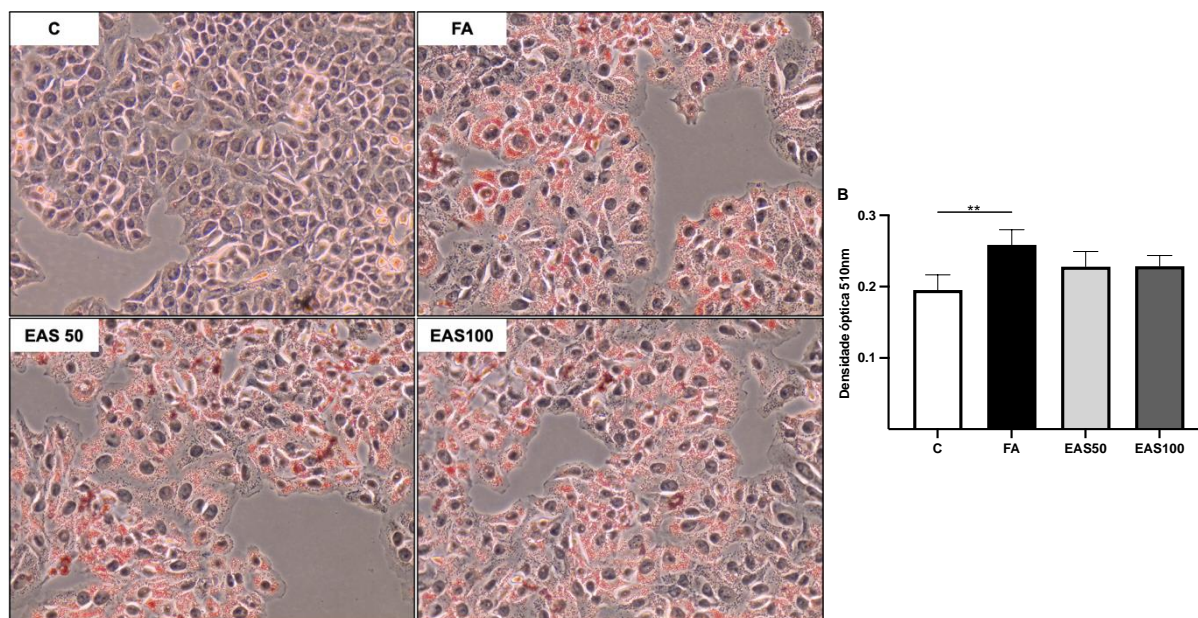


Figura 3: Efeito do tratamento com o extrato aquoso de *S. crassifolia* (EAS) sobre o conteúdo de lipídios intracelular em células HepG2 com acúmulo de lipídios induzido por ácidos graxos. Fotomicrografias representativas da coloração com *Oil red O* (ORO) e hematoxilina em células HepG2 com ampliação de 200x. (B) Quantificação da densidade óptica a 510nm após ensaio colorimétrico com ORO. Os dados foram expressos como média \pm DP. ** $p < 0,01$.

2.3 Determinação da viabilidade celular e citotoxicidade

Para determinar o efeito do EAS sobre a viabilidade celular após 24h de tratamento (Figura 4), foi realizada a coloração com sulforodamina B (SFB). Esse corante possui alta afinidade às proteínas, sendo a intensidade da cor proporcional às células viáveis aderidas nos poços. Foram testadas cinco diferentes concentrações do extrato na ausência (grupos controle; gráfico A) e presença de ácidos graxos (gráfico B). Apenas as concentrações acima de 125 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferenças significativas em relação com o controle. Já nas células tratadas com os ácidos graxos, as concentrações do EAS a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ diminuíram a viabilidade celular.

A citotoxicidade foi mensurada pela atividade da lactato desidrogenase (LDH) (gráfico C), uma enzima que é liberada no meio extracelular quando ocorre danos à membrana celular. Em comparação ao controle, os grupos FA e EAS100 foram significativamente maiores, indicando um maior dano celular. Já o grupo EAS50 apresentou uma redução significativa em

relação ao grupo FA e com valores semelhantes ao grupo controle, demonstrando que, nessa concentração, o extrato foi eficaz em reverter o dano causado pelos ácidos graxos.

Assim, foi possível determinar que na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, o EAS não altera significativamente a viabilidade celular ou apresenta citotoxicidade.

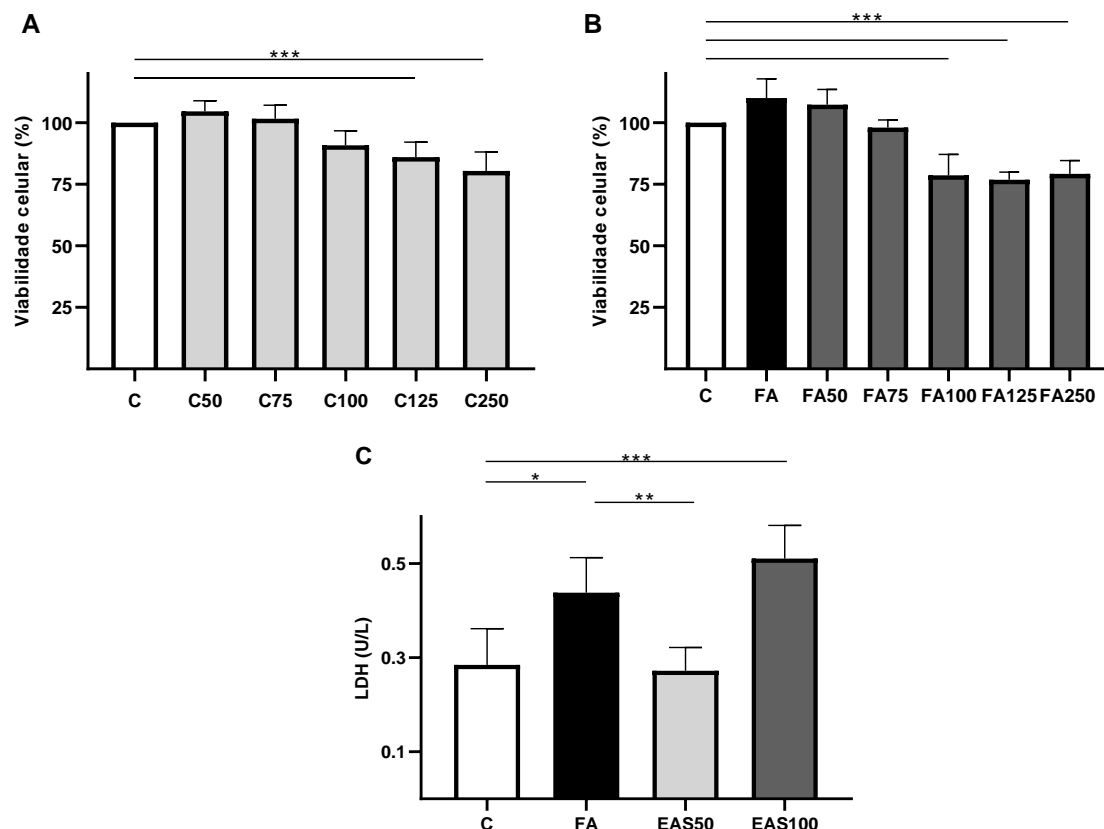


Figura 4: Efeito do tratamento com o extrato aquoso de *S. crassifolia* sobre a viabilidade celular e citotoxicidade (A) Determinação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico da Sulforodamina B nas células HepG2 sem indução do acúmulo de lipídios após tratamento com extrato por 24h. (B) Determinação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico da Sulforodamina B nas células HepG2 com indução do acúmulo de lipídios após tratamento com extrato por 24h. (C) Atividade da Lactato Desidrogenase (LDH) no sobrenadante celular após 24h de exposição ao extrato. Os dados são expressos como média \pm DP (n = 5). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.4 Quantificação dos marcadores do estresse oxidativo

Em um estudo prévio [15], foi demonstrado que a exposição aos ácidos graxos palmítico e oleico, na concentração de 2mM, compromete a homeostase do sistema redox celular. Assim, o EAS foi avaliado quanto à sua capacidade de modular o equilíbrio entre a produção de ROS e o sistema de defesa antioxidante.

Em relação ao conteúdo total de ROS (figura 5), o grupo FA não apresentou diferença quando comparado ao controle, no entanto, o grupo EAS50 apresentou uma redução

significativa em relação aos grupos C e FA.

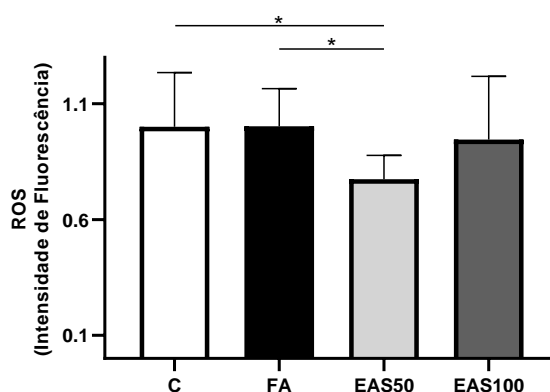


Figura 5: Conteúdo total de espécies reativas ao oxigênio (ROS) após 24 horas de tratamento com o extrato aquoso de *S. crassifolia* em células HepG2 com acúmulo de lipídios induzido por ácidos graxos. Os dados são expressos como média \pm DP (n = 10). * p < 0,05.

A glutatona é essencial para manter o equilíbrio redox das células, por ser o principal antioxidante celular. Os resultados (figura 6) mostram que o grupo EAS100, apresentou um aumento significativo nos níveis de glutatona total em comparação com os grupos C e FA. Não foram observadas diferenças na razão GSH/GSSG entre os tratamentos.

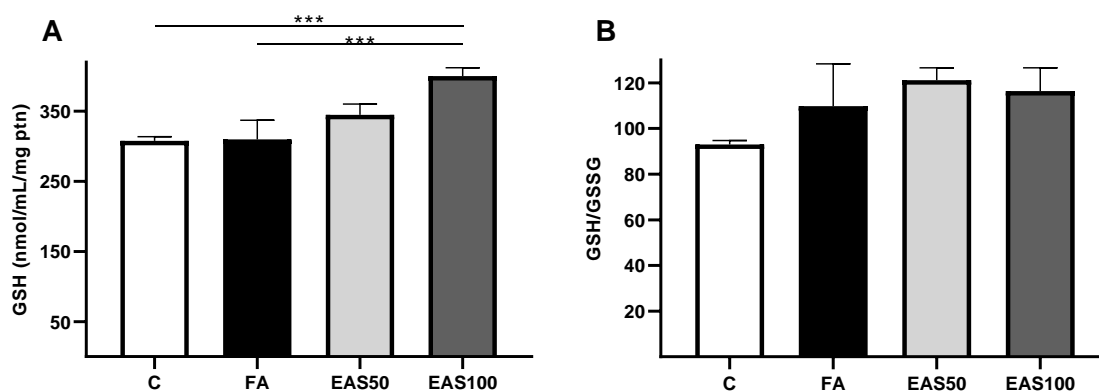


Figura 6: Efeito do tratamento com o extrato aquoso de *S. crassifolia* sobre o sistema glutatona em células HepG2 com acúmulo de lipídios induzido por ácidos graxos. (A) Conteúdo de glutatona total (GSH). (B) Relação entre a glutatona total e a glutatona oxidada (GSSG). Os dados são expressos como média \pm DP (n = 3). * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Por fim, foram analisadas as atividades das enzimas envolvidas na defesa antioxidante celular (Figura 7). Em relação à atividade das enzimas SOD (gráfico A) e catalase (gráfico B), foi observado um aumento significativo nos grupos FA e EAS50 em comparação com o controle. Por outro lado, o tratamento com o EAS na concentração de 100 μ g/mL, reduziu a atividade de ambas as enzimas quando comparado ao grupo FA, a níveis semelhantes aos do

grupo controle.

De maneira semelhante, a atividade da GST (gráfico C), uma enzima envolvida na detoxificação de substâncias xenobióticas e endógenas, também foi significativamente maior nos grupos FA e EAS50 em relação ao controle. No entanto, no grupo EAS100, observou-se uma redução significativa na atividade da GST quando comparada aos grupos C e FA.

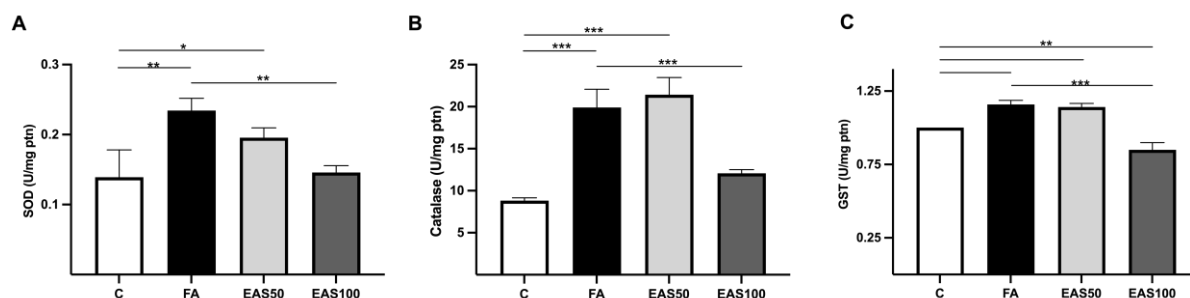


Figura 7: Efeito do tratamento com extrato aquoso de *S. crassifolia* sobre a atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante em células HepG2 com acúmulo de lipídios induzido por ácidos graxos. (A) Atividade de superóxido dismutase (SOD). (B) Atividade da catalase (C) Atividade de glutatona S-transferase (GST). Os dados são expressos como média \pm DP (n = 3). * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

3. DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigado o efeito do extrato aquoso das folhas de *Salacia crassifolia* sob um modelo *in vitro* da MASLD, doença com alta prevalência na população mundial. Sabe-se que um dos principais fatores envolvidos em sua progressão é o estresse oxidativo, cujos biomarcadores foram avaliados, juntos à investigação da composição de fitoquímicos, capacidade antioxidante e citotoxicidade do extrato. Até o momento, não há na literatura nenhum estudo com o extrato aquoso das folhas dessa espécie e por isso, este artigo foi essencial para elucidar sua composição fitoquímica e efeitos biológicos.

A caracterização fitoquímica de extratos de plantas medicinais é importante para a compreensão dos efeitos biológicos, uma vez que a combinação de metabólitos secundários, pode potencializar suas ações, devido a interações entre compostos e efeito sinérgico. Ademais, os dados obtidos podem subsidiar a bioprospecção de compostos e o desenvolvimento de novos produtos farmacológicos com potencial terapêutico, além de análogos semissintéticos que retêm capacidade antioxidante substancial, mas produzem efeitos adversos mínimos [16]. Dentro do gênero *Salacia* já foram descritas as composições de extratos de diferentes espécies, com uma variedade de solventes e moléculas identificáveis [17-19]. No entanto, até o presente momento são escassos os estudos que utilizaram a extração aquosa das folhas, mais representativa da forma de uso popular. Nesse estudo, a análise fitoquímica do EAS revelou uma diversidade de compostos, como polifenóis (catequina, epigallocatequina, quercetina,

miricetina, rutina e kaempferol), terpenos (vomifoliol e lasiantionosídeo) e ácidos orgânicos (ácidos málico e cítrico). Além disso, compostos como o ácido protocatecuico, lasiantionosídeo, quercetina O-glicosil-ramnosil-glicosídeo, quercetina xilosil-rutinosídeo, lariciresinol 4'-O- glicosídeo, vomifoliol glicosídeo formiato, rutina e kaempferol-glicosídeo-ramnosídeo, foram identificados pela primeira vez nas folhas da espécie, indicando seu potencial ainda inexplorado.

Por sua vez, a pristimerina, conhecido terpeno com atividade antitumoral e anti-inflamatória é descrito como um dos principais constituintes da *S. crassifolia*, tendo sido isolado de extratos obtidos das raízes e do extrato etanólico das folhas [13,11]. Entretanto, nesta pesquisa não foi identificado o composto, possivelmente devido às diferenças no método de obtenção do extrato. Por fim, esses achados reforçam a importância do estudo e ampliam as perspectivas de pesquisas desses compostos para fins terapêuticos.

A capacidade antioxidante do EAS foi analisada pelo método ORAC, técnica amplamente utilizada para quantificar a eficácia de compostos em neutralizar radicais peroxila, sendo considerada o "padrão-ouro" entre os ensaios antioxidantes *in vitro* [21]. Também é um método muito adaptável por utilizar diferentes radicais, padrões e tipos de amostras, além de considerar tanto o tempo de inibição quanto o grau de inibição da ação dos radicais causada por antioxidantes [22]. Baseada no Trolox, amplamente utilizado como padrão, pois seus valores são proporcionais à capacidade antioxidante de um composto, a quercetina isolada apresentou 4,7 mM ET/g de atividade [16]. Dados na literatura sobre a capacidade antioxidante de *S. crassifolia* ainda são escassos. Em um estudo anterior, foram analisados os extratos hidroalcoólicos da polpa, semente e casca do fruto de *S. crassifolia*, e os valores obtidos foram inferiores aos deste estudo, com a maior atividade antioxidante observada na semente [23]. Tais diferenças podem ser atribuídas às diferenças nos métodos de extração empregados e à variação na concentração de compostos antioxidantes em cada parte da planta.

O uso de linhagens celulares em pesquisas representa uma importante ferramenta devido a sua facilidade de cultivo, conhecimento do fenótipo e reprodutibilidade dos experimentos, além de contribuir para o princípio dos 3Rs, a redução no uso de animais de experimentação e ainda, evitar problemas éticos associados à utilização de tecidos animais e humanos [24]. Nesse contexto, células da linhagem HepG2 são muito utilizadas para estudos de metabolismo de compostos naturais e sintéticos e hepatotoxicidade, por apresentar comportamento semelhante aos hepatócitos humanos e expressar muitas funções hepáticas diferenciadas, como síntese e secreção de proteínas plasmáticas, metabolismo de colesterol e triglicerídeos, metabolismo e transporte de lipoproteínas [25, 26].

Diversas espécies do gênero *Salacia* demonstraram eficácia na atenuação do acúmulo de lipídios em estudos *in vitro* na linhagem T3-L1 e da obesidade em pesquisas *in vivo*, principalmente por meio da regulação do metabolismo lipídico. Esses efeitos foram associados à redução da esteatose, à inibição da expressão da proteína quinase fosforilada MAPK (pMAPK) e de fatores de transcrição relacionados à adipogênese, bem como à ativação da via AMPK [27-29]. Tais evidências sugerem que os compostos encontrados nos extratos de *Salacia* atuam na inibição da lipogênese e indução da lipólise. No entanto, até o momento, não foram encontrados na literatura estudos que avaliem o potencial de *S. crassifolia* no manejo da obesidade ou na aplicação à MASLD. Nesse contexto, o presente estudo é pioneiro ao propor essa associação. Apesar disso, o EAS não apresentou eficácia na redução do conteúdo lipídico intracelular na linhagem HepG2 nas concentrações testadas, indicando a necessidade de investigações adicionais para elucidar seus efeitos sobre o metabolismo lipídico.

De acordo com a norma ISO 10993-5 da Organização Internacional de Padronização [30], um extrato só é considerado citotóxico quando diminui a viabilidade celular para valores inferiores a 70%. Dessa forma, o EAS não demonstrou citotoxicidade significativa e na concentração de 50 µg/mL, reduziu a liberação de LDH para o sobrenadante a níveis semelhantes ao controle, sugerindo uma normalização da integridade celular. Resultados semelhantes foram observados por Carneiro *et al* [31], que relataram a ausência de citotoxicidade e genotoxicidade em testes em células da medula óssea de murinos. Por outro lado, estudos prévios demonstraram que a espécie apresentou eficácia na inibição do crescimento de linhagens tumorais, cepas bacterianas e vírus [11-13]. Tais variações nos efeitos biológicos podem estar relacionadas as diferenças na composição química entre os extratos, especialmente à presença e concentração de compostos fenólicos e terpenos.

Arruda *et al* [15], demonstraram que células HepG2 submetidas ao tratamento com os ácidos graxos palmítico e oleico na concentração de 2 mM, apresentaram aumento significativo do dano oxidativo em proteínas e lipídios. No entanto, neste estudo não foi observado aumento significativo nos níveis de ROS após o tratamento com os ácidos graxos. Esse resultado pode ser atribuído à curta meia-vida dessas espécies reativas, o que dificulta sua detecção em determinados contextos experimentais. Além disso, o ensaio de detecção de ROS, é um método de detecção de ponto final, refletindo apenas a concentração das espécies reativas no momento da análise. Nesse contexto, o tratamento com o EAS na concentração de 50µg/mL foi capaz de reduzir o nível de ROS, os mecanismos envolvidos podem estar relacionados ao efeito antioxidante direto do extrato evidenciado pelo ensaio ORAC e ainda por um aumento nas defesas antioxidantes celulares.

A glutathiona é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, encontrada em altas concentrações no fígado, especialmente no citosol e nas mitocôndrias [6], fundamental no sistema de defesa antioxidante celular, atuando na conjugação com diversas moléculas para neutralização de espécies reativas. Neste estudo, observou-se um aumento significativo dos níveis de GSH após o tratamento com 100 µg/mL do EAS. A GSH é sintetizada nas células pela enzima γ -glutamylcisteína sintetase (γ -GCS) e desempenha um papel fundamental na regulação celular em eventos que culminam em apoptose ou necrose, estando intimamente relacionada às respostas de citotoxicidade e ao estresse oxidativo [32].

Em estudo *in vivo* conduzido por Nam *et al* [33], a aplicação de SOD exógena demonstrou melhora na MASLD por meio da ativação da via AMPK (proteína quinase ativada por AMP). Esse efeito ocasionou um aumento da expressão da proteína PGC-1 α , responsável por regular a biogênese mitocondrial, e na redução da proteína fosforida FoxO1 (pFoxO1), a qual reduz a expressão de genes ligados a lipogênicos, modulando o metabolismo lipídico. Como consequência, observou-se uma resposta anti-inflamatória, antioxidante e antiapoptótica, sugerindo um potencial efeito protetor da SOD na fisiopatologia da MASLD. No presente estudo foi observado um aumento na atividade de SOD e também das enzimas catalase e GST, relacionada a detoxificação celular através da conjugação da GSH a uma variedade de compostos eletrofílicos endógenos e exógenos para formar compostos menos ativos quimicamente [34], evidenciando uma maior atividade do sistema de defesa antioxidante.

Evidências crescentes na literatura mostram que polifenóis, especialmente da classe dos flavonoides são relacionados a via de sinalização do Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), principal fator de transcrição envolvido na manutenção do balanço redox, mediada pelo elemento de resposta antioxidante (ARE), que por sua vez promove a regulação positiva da expressão da γ -GCS e das enzimas de fase II do sistema de defesa antioxidante endógeno, dentre elas SOD, CAT e GST, melhorando assim a resposta antioxidante celular, impedindo que ocorra a depleção da concentração intracelular de GSH e reduzindo os danos mediados pelo estresse oxidativo durante a progressão da MASLD [35,36]. Esses compostos, portanto, são considerados candidatos promissores na busca por novas estratégias terapêuticas para a doença. Em conjunto, os efeitos do EAS sobre os níveis de ROS, glutathiona e atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante celular, associados a sua composição fitoquímica, sugerem uma possível ativação da via NRF2/ARE.

Em suma, os resultados deste estudo indicam que o extrato aquoso das folhas de *S. crassifolia* possui diferentes metabólitos secundários, especialmente polifenóis, com alta atividade antioxidante sem apresentar efeito citotóxico em células HepG2. Embora o tratamento

com o EAS não tenha reduzido o conteúdo intracelular de lipídios pode-se pressupor que atenua a progressão da MASLD ao melhorar o estado redox celular. Esses achados reforçam a importância de estudos das espécies utilizadas na medicina tradicional, além de identificar pela primeira vez, novos compostos bioativos na espécie e fornecer subsídios para a bioprospecção. No entanto, ainda são necessários mais estudos que elucidem o papel desses compostos nos mecanismos moleculares envolvidos na MASLD. Tais estudos poderão confirmar o potencial terapêutico da espécie para distúrbios metabólicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras e preparo do extrato

As folhas de *S. crassifolia* foram coletadas na região de Patrocínio, MG (18°55'16.9"S 46°59'51.2"W). Foi realizado o cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen, sob o número A6A598B. A metodologia de extração aquosa das folhas foi desenvolvida com base nas informações de uso popular associado à medicina tradicional que consiste na infusão das folhas em água aquecida. Para tanto, as folhas foram congeladas, liofilizadas, trituradas e submetidas à infusão em água em banho-maria à 72°C, durante 10 minutos. Posteriormente, foi realizada a filtração a vácuo e o extrato bruto foi liofilizado e armazenado a 4 °C.

4.2 Análise do extrato por HPLC-ESI-MS/MS e determinação da capacidade antioxidante

O extrato aquoso da espécie foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem usando ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MS/MS). A amostra foi solubilizada em uma solução de água:metanol (7:3), filtrada em filtro de membrana de nylon de 0,22 µm e injetadas no cromatógrafo líquido (Agilent Infinity 1260), acoplado a um espectrômetro de massas Q-TOF de alta resolução (Agilent 6520 B) com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI). A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18 (2,1 x 50 mm, 2,7 µm), com uma fase móvel composta por (A) água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e (B) metanol. O gradiente de eluição iniciou com 10% B (0 min), atingindo 98% B entre 0 e 15 min, e 100% B de 15 a 17 min, com vazão de 400 µL min⁻¹. Os parâmetros de ionização utilizados foram: pressão do nebulizador de 58 psi, vazão de gás de secagem de 8 L min⁻¹ a 220 °C e voltagem capilar de 4,5 kVa. Análises de espectrometria de massas em tandem (MS/MS) foram realizadas com energias de colisão de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 eV. Os dados foram processados utilizando o software MassHunter®, que propôs fórmulas moleculares para os compostos com base em

valores de m/z. A anotação dos compostos foi realizada considerando valores de m/z de alta resolução, com margem de erro abaixo de 10 ppm, análise de fragmentos e comparação com a literatura. Além da literatura científica, a identificação dos compostos foi complementada pela consulta a bancos de dados como PubChem, HMDB e Metabolomics WorkBench.

A capacidade antioxidante do EAS foi determinada pelo Índice ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), a partir da adaptação de metodologias descritas na literatura [38-40]. Este método se baseia na medição do decaimento da fluorescência da fluoresceína mediante interação com o radical peroxil, o qual é gerado pela reação do AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)] com o oxigênio molecular.

Para a construção da curva de calibração, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8- ácido tetrametilcromano-2-carboxílico), um análogo da vitamina E, foi utilizado como antioxidante de referência. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, onde foram adicionados, a amostra diluída, tampão fosfato-salino (PBS) ou padrão, fluoresceína, seguidos por período de incubação de 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados o radical AAPH e a fluorescência lida a 485 nm (excitação) e 535 nm (emissão) por 1 hora, minuto a minuto em fluorímetro VICTOR™ X3. Os valores do índice ORAC foram calculados pela Área sob a curva (AUC) do padrão e da amostra. O valor ORAC final foi determinado a partir da equação de regressão entre a concentração de Trolox e a AUC líquida e expressas como equivalentes de Trolox (µM) por grama de extrato.

4.3 Cultura de células da linhagem celular HepG2, indução do acúmulo dos lipídios e tratamento com extrato

As células da linhagem HepG2, derivadas de um hepatoblastoma humano, foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro. A indução do acúmulo de lipídios foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Arruda *et al* [15]. Em um primeiro momento, as células foram incubadas durante 24 horas com meio DMEM *low glucose* (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico, em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, foram lavadas com PBS à 37°C e incubadas novamente com meio DMEM sem adição do SFB e antibiótico, por mais 24 horas. Após a privação de soro, as células foram incubadas com uma solução com os ácidos graxos oleico e palmítico na proporção de 2:1, com concentração final de 2,0mM em meio enriquecido com albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos a 4,5% por 24 horas. As células do grupo controle foram incubadas somente com a solução veículo.

Após a sobrecarga lipídica, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o extrato

aquoso (EAS), diluído em DMEM, nas concentrações finais de 50 e 100µg/mL (EAS50 e EAS100) por 24h.

4.4 Determinação da carga lipídica intracelular

Para a quantificação dos lipídios intracelulares, as células foram lavadas com PBS e em seguida fixadas com solução de paraformaldeído 4% tamponado. Após repetidas lavagens com água destilada, uma solução de corante *Oil Red O* (ORO) (0,5% em isopropanol) foi adicionada aos poços e mantida por 50 min. Posteriormente, a solução corante foi retirada e outras três lavagens foram feitas com água destilada e uma lavagem adicional com isopropanol 60% para minimização do *background* causado pelo corante. Para análise quantitativa, as células coradas foram incubadas com isopropanol para solubilização do ORO, cuja densidade óptica foi determinada a 510 nm. As células foram coradas com Hematoxilina de Meyer e as fotomicrografias foram então obtidas em microscópio óptico de contraste de fase invertido (EVOS™ XL Core) acoplado a câmera digital em ampliação de 200 vezes.

4.5 Determinação da viabilidade celular e citotoxicidade

O efeito do EAS na viabilidade celular foi determinado pelo método de coloração com sulforodamina B (SFB) [41]. As células foram semeadas em placas de 96 poços e após a indução do acúmulo de ácidos graxos, foram lavadas com PBS e incubadas com o extrato diluído em diferentes concentrações finais (0, 50, 75, 100, 125 e 250 µg/mL) em meio DMEM por 24h. Posteriormente, acrescentou-se solução gelada de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para fixação das células. As placas foram incubadas por uma hora à 4°C e em seguida, lavadas em água corrente. Após secagem, foi adicionado à solução de SFB a 0,04% diluída em água destilada em cada poço e incubado em temperatura ambiente por uma hora. Terminada a incubação, os poços foram lavados em solução de ácido acético a 1% para retirada do corante não ligado. Após secagem completa, adicionou-se solução tris base a 10mM para solubilização do corante ligado, os poços foram lidos em leitor de microplacas a 510nm.

Para a determinação da citotoxicidade e dano celular, a atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi mensurada por kit comercial (Invitrogen™). Para esse propósito, as células HepG2 foram tratadas com o EAS diluído em meio DMEM livre de vermelho de fenol, por 24 horas e o sobrenadante foi então coletado e utilizado no ensaio.

4.6 Quantificação dos biomarcadores do estresse oxidativo

Com o intuito de investigar os efeitos do EAS sobre o sistema de defesa antioxidante

celular, foram determinados o conteúdo de ROS total, os níveis de glutathiona total (GSH) e oxidada (GSSG), atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e da glutathiona S-transferase (GST).

O conteúdo de ROS total foi quantificado utilizando um kit comercial (Invitrogen™) que se baseia na desatilação da sonda por esterases intracelulares e em contato com as ROS, se oxida e emite fluorescência. Para a análise, a sonda Carboxy-H₂DCFDA foi adicionada aos poços de uma placa de 96 poços. Após 30 minutos de incubação à 37°C, ao abrigo da luz, a intensidade de fluorescência foi determinada em espectro de excitação 495 e emissão de 529nm.

Para avaliar os níveis de glutathiona total e oxidada, foi utilizado o ensaio cinético proposto por Rahman *et al* [42]. Brevemente, as células coletadas foram solubilizadas em tampão de extração (0,1% Triton-X e 0,6% de ácido sulfossalicílico em tampão de fosfato de potássio 0,1 M (KPE) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético 5 mM (EDTA)). Após três ciclos de congelamento-descongelamento, as células foram centrifugadas e o sobrenadante usado no ensaio. As amostras foram adicionadas a uma microplaca de 96 poços, seguidas pela adição da mistura de trabalho (KPE, DTNB e glutathiona redutase) e de NADPH (0,16 mg/mL) e leitura das absorbâncias a 405 nm a cada 30 segundos durante 5 minutos. Para a determinação de GSSG, foram adicionadas ao homogenato celular uma solução de 2-vinilpiridina (1:10) e trietanolamina (1:6) para correção do pH. Após 1 hora de incubação, as amostras foram analisadas conforme descrito acima. Sais de glutathiona oxidada e reduzida foram usados para a construção das curvas padrão.

Para a determinação da atividade da SOD, foi utilizado o método proposto por Madesh e Balasubramanian [43]. As células após coletadas, lisadas e centrifugadas, foram transferidas para uma microplaca de 96 poços, a qual acrescentou-se tampão fosfato 50mM com 1mM de EDTA, solução de MTT 1,25mM e pirogalol 10mM diluído em água acidificada com HCl 10mM. Após 5 minutos de incubação em estufa, à 37°C, acrescentou-se DMSO e foi realizada a leitura em comprimento de onda a 570nm.

A atividade da catalase foi determinada pelo método cinético proposto por Grilo, *et al* [44] que se baseia na decomposição do H₂O₂ pela enzima monitorada durante 2 minuto por espectrofotometria a 240 nm.

A atividade da GST, enzima envolvida na detoxificação de xenobióticos, foi determinada pelo método adaptado de Habig, *et al* [45]. Adicionou-se a amostra em placas UV de 96 poços e o mix de reação, contendo uma solução com CDNB (1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno) 20mM, glutathiona reduzida 40mM e tampão fosfato de potássio 100mM com 0,1% de Triton X-100. Por fim, foi realizada leitura cinética a cada minuto por 10 minutos a 340nm.

Todas as análises foram realizadas em triplicada. Os resultados foram normalizados pela concentração total de proteínas, determinada pelo método de Bradford [46] e expressos como unidade (U) por mg de proteínas.

4.7 Análise estatística

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade entre as variâncias, no teste de Brown-Forsythe, foram submetidos a análise de variância univariada ANOVA *one-way* seguida pelo teste de Tukey. Dados não paramétricos foram analisados pelo Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism* versão 8.4.3 (San Diego, Califórnia, EUA).

Contribuições dos autores

Conceitualização, JFdCG; metodologia, MJMGG, VMA e JFdCG; validação, JFdCG; investigação, MJMGG, VMA, AJAB, FMS, TCS, DGP e RPS; curadoria de dados, MJMGG, TAT e JFdCG; redação — preparação do rascunho original, MJMGG e JFdCG; redação — revisão e edição, MJMGG e JFdCG; visualização, MJMGG e JFdCG; supervisão, JFdCG; administração do projeto, JFdCG; aquisição de financiamento, JFdCG.

Financiamento

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ-01564-18 e APQ-02533-23).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse. Os financiadores não tiveram qualquer papel no desenho do estudo, na coleta, análise ou interpretação dos dados, na redação do manuscrito ou na decisão de publicar os resultados.

REFERÊNCIAS

1. Kuchay MS, Choudhary NS, Mishra S. Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD. *Diabetes Metab Syndr*. 2020 Nov-Dec;14(6):1875–87. doi: 10.1016/j.dsx.2020.09.026.
2. Le MH, Devaki P, Ha NB, Jun DW, Te HS, Cheung RC, *et al*. Global incidence of non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*.

- 2023;79(4):785–95. doi: 10.1016/j.jhep.2023.03.040.
3. Lopes GW, Canhada SL, dos Reis RCP, Diniz MFHS, Goulart AC, Faria LC, *et al.* Comparing diabetes prediction based on metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease: the ELSA-Brasil study. *Cad Saude Publica*. 2024 Nov 25;40(11):e00009924. doi: 10.1590/0102-311XEN009924.
 4. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(18):3313–27. doi: 10.1007/s00018-018-2860-6.
 5. Chen Z, Tian R, She Z, Cai J, Li H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. 2020 May 20;152:116–41. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025.
 6. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1-2):42-59. doi: 10.1016/j.mam.2008.05.005.
 7. Sumida Y, Niki E, Naito Y, Yoshikawa T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radic Res*. 2013 Nov;47(11):869–80. doi: 10.3109/10715762.2013.837577.
 8. De Zoysa MHN, Rathnayake H, Hewawasam RP, Wijayaratne WMDG. Determination of in vitro antimicrobial activity of five Sri Lankan medicinal plants against selected human pathogenic bacteria. *Int J Microbiol*. 2019;2019:7431439. doi: 10.1155/2019/7431439.
 9. Peixoto JC, Silva DB, Bolzani VS, da Silva MFDA, Lopes NP. Flavonoids from Brazilian Cerrado: biosynthesis, chemical and biological profile. *Molecules*. 2019;24(16):2891. doi:10.3390/molecules24162891.
 10. Rodriguez-Ramiro I, Vauzour D, Minihane AM. Polyphenols and non-alcoholic fatty liver disease: impact and mechanisms. *Proc Nutr Soc*. 2016;75(1):47–60. doi:10.1017/S0029665115004218.
 11. Rodrigues VG, Duarte LP, Silva RR, Silva GDF, Mercadante-Simões MO, Takahashi JA, Matildes BLG, Fonseca THS, Gomes MA, Vieira Filho SA. *Salacia crassifolia* (Celastraceae): chemical constituents and antimicrobial activity. *Quim Nova*. 2015;38(2):237-242. doi:10.5935/0100-4042.20150001.
 12. Espindola LS, Dusi RG, Demarque DP, Braz-Filho R, Yan P, Bokesch HR, Gustafson KR, Beutler JA. Cytotoxic triterpenes from *Salacia crassifolia* and metabolite profiling of *Celastraceae* species. *Molecules*. 2018 Jun 20;23(6):1494. doi: 10.3390/molecules23061494.
 13. Nizer WC, Ferraz AC, Moraes TFS, Lima WG, Dos Santos JP, Duarte LP, *et al.* Netzahualcoyonal from *Salacia multiflora* (Lam.) DC. (Celastraceae) roots as a bioactive compound against gram-positive pathogens. *Nat Prod Res*. 2022 Nov;36(22):5904–5909. doi: 10.1080/14786419.2021.2023865.
 14. Ferreira PG, Ferraz AC, Figueiredo JE, Lima CF, Rodrigues VG, Taranto AG, Ferreira JMS, Brandão GC, Vieira-Filho SA, Duarte LP, de Brito Magalhães CL, de Magalhães JC. Detection of the antiviral activity of epicatechin isolated from *Salacia crassifolia* (Celastraceae) against Mayaro virus based on protein C homology modelling and virtual screening. *Arch Virol*. 2018 Jun;163(6):1567–76. doi: 10.1007/s00705-018-3774-1.
 15. Arruda VM, Azevedo GT, Granato MJMG, Matos ACP, Araújo TG, Guerra JFdC. Oxidative Stress and Annexin A2 Differential Expression in Free Fatty Acids-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in HepG2 Cells. *Int J Mol Sci*. 2024;25(17):9591. doi:10.3390/ijms25179591.
 16. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002;13(10):572–84. doi: 10.1016/S0955-2863(02)00208-5.
 17. Watanabe M, Shimada T, Iiduka S, Iida N, Kojima K, Ishizaki J, Sai Y, Miyamoto K,

- Aburada M. Preventive effects of *Salacia reticulata* on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in monosodium glutamate treated mice. *J Trad Med*. 2011;28(2):73–82. doi:10.11339/jtm.28.73.
18. Jing Y-X, You H-M, Zhao J-W, Wang W, Jiang Y-T, Zuo A-X, Fan J-T, Zhang S-Y, Jiang Z-Y. Bioactive constituents from *Salacia cochinchinensis*. *J Asian Nat Prod Res*. 2020 Aug;22(8):738–45. doi: 10.1080/10286020.2019.1618279.
 19. Gomes NGM, Oliveira AP, Cunha D, Pereira DM, Valentão P, Pinto E, Araújo L, Andrade PB. Flavonoid Composition of *Salacia senegalensis* (Lam.) DC. Leaves, Evaluation of Antidermatophytic Effects, and Potential Amelioration of the Associated Inflammatory Response. *Molecules*. 2019 Jul 10;24(14):2530. doi: 10.3390/molecules24142530.
 20. Gao L, Duan L-K, Feng J-E, Jiang Y-T, Gao J, Fan J-T, Dai R, Jiang Z-Y. Four new triterpene glucosides from *Salacia cochinchinensis* Lour. *Nat Prod Res*. 2022 May;36(9):2292–9. doi: 10.1080/14786419.2020.1830393.
 21. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med*. 1999 Dec;27(11–12):1173–81. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00203-8.
 22. Prior RL. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct Foods*. 2015;18:797–810. doi: 10.1016/j.jff.2014.12.018.
 23. Schneider LC, Leão KV, Machado LL, Guimarães ARD. Caracterização física e química de frutos de bacupari, *Salacia crassifolia* (Mart. ex Schult.) G. Don, provenientes do município de Barreiras – BA. *Braz J Dev*. 2020;6(3):13942–53. doi:10.34117/bjdv6n3-311
 24. Arzumanyan VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 4;22(23):13135. doi: 10.3390/ijms222313135.
 25. Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. In: Vinken M, Rogiers V, eds. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. *Methods Mol Biol*. 2015;1250:77–93. doi:10.1007/978-1-4939-2074-7_5.
 26. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact*. 2007 Feb 28;165(2):106–16. doi: 10.1016/j.cbi.2006.11.004.
 27. Medagama AB. *Salacia reticulata* (Kothala himbutu) revisited; a missed opportunity to treat diabetes and obesity? *Nutr J*. 2015 Feb 27;14:21. doi: 10.1186/s12937-015-0013-4.
 28. Shimada T, Nakayama Y, Harasawa Y, Matsui H, Kobayashi H, Sai Y, *et al.* *Salacia reticulata* has therapeutic effects on obesity. *J Nat Med*. 2014 Oct;68(4):668–76. doi: 10.1007/s11418-014-0845-9.
 29. Jung J, Park J, Lee M, Kim J, Oh D, Jun W, Kim OK, Lee J. *Salacia reticulata* extract suppresses fat accumulation by regulating lipid metabolism. *Foods*. 2023;12(17):3149. doi:10.3390/foods12173149.
 30. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 3rd ed. Geneva: ISO; 2009. 42 p.
 31. Carneiro CC, Silva CR, Menezes ACS, Pérez CN, Chen-Chen L. Assessment of genotoxic, cytotoxic, and protective effects of *Salacia crassifolia* (Mart. ex Schult.) G. Don. stem bark fractions in mice. *Genet Mol Res*. 2013 Jul 3;12(3):2167–77. doi: 10.4238/2013.July.3.1.
 32. Vairetti M, Di Pasqua LG, Cagna M, Richelmi P, Ferrigno A, Berardo C. Changes in Glutathione Content in Liver Diseases: An Update. *Antioxidants*. 2021;10(3):364. doi:10.3390/antiox10030364.
 33. Nam H, Lim JH, Kim TW, Kim EN, Oum S-J, Bae SH, Park CW. Extracellular superoxide

- dismutase attenuates hepatic oxidative stress in nonalcoholic fatty liver disease through the adenosine monophosphate-activated protein kinase activation. *Antioxidants*. 2023;12(12):2040. doi:10.3390/antiox12122040.
34. Prisyazhnyuk V, Sydorchuk L, Sydorchuk R, Prysiazhniuk I, Bobkovych K, Buzdugan I, Dzuryak V, Prisyazhnyuk P. Glutathione-S-transferases genes—promising predictors of hepatic dysfunction. *World J Hepatol*. 2021 Jun 27;13(6):620–33. doi: 10.4254/wjh.v13.i6.620.
 35. Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sci*. 2006 Oct 19;79(21):2056–68. doi: 10.1016/j.lfs.2006.06.042.
 36. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005 Nov;16(10):577–86. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
 37. Sosa-Lochedino AL, Hapon MB, Gamarra-Luques C. A systematic review about the contribution of the genus *Tessaria* (*Asteraceae*) to cancer study and treatment. *Uniciencia*. 2022;36(1):467–83.
 38. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem*. 2002 Aug 21;50(16):4437–4444. doi: 10.1021/jf020212.
 39. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*. 2005 May 18;53(10):4290–4302. doi: 10.1021/jf050115k.
 40. Silva E, Souza J, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem*. 2007 Oct;101(3):1012–8. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.03.030.
 41. Orellana EA, Kasinski AL. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio Protoc*. 2016 Nov 5;6(21):e1984. doi: 10.21769/BioProtoc.1984.
 42. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 2006;1(2):3159–3165.
 43. Madesh, M., Balasubramanian, K.A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian J. Biochem. Biophys*. 1998, 35, 184–188.
 44. Grilo LF, Ribeiro T, Duarte D, Vale N, Pereira SA, Silva R, *et al*. Development of a 96-well based assay for kinetic determination of catalase enzymatic activity in biological samples. *Toxicol In Vitro*. 2020 Dec;69:104996. doi:10.1016/j.tiv.2020.104996.
 45. Habig, W.H., Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem*. 1974, 249, 7130–7139 PMID: 4436300.
 46. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*. 1976, 72, 248–254.

Título: O título do seu manuscrito deve ser conciso, específico e relevante. Deve identificar se o estudo relata dados de ensaios clínicos (em humanos ou animais) ou se é uma revisão sistemática, meta-análise ou estudo de replicação. Ao incluir nomes de genes ou proteínas, deve-se usar o nome abreviado, em vez do nome completo. Não inclua formas abreviadas ou curtas do título, como um título resumido ou cabeçalho.

Lista de Autores e Afiliações: Os nomes completos dos autores devem ser fornecidos. As iniciais de quaisquer nomes do meio podem ser adicionadas. O formato padrão PubMed/MEDLINE é usado para afiliações: informações completas de endereço, incluindo cidade, CEP, estado/província e país. Pelo menos um autor deve ser designado como autor correspondente. Os endereços de e-mail de todos os autores serão exibidos nos artigos publicados. É responsabilidade do autor correspondente garantir que o consentimento para a exibição dos endereços de e-mail seja obtido de todos os autores. Se um autor (que não seja o autor correspondente) não desejar que seus endereços de e-mail sejam exibidos dessa forma, o autor correspondente deverá indicar isso durante a revisão. Após a aceitação, nenhuma atualização dos nomes ou afiliações dos autores será permitida.

Resumo: O resumo deve ter no máximo 200 palavras. O resumo deve ser um único parágrafo e seguir o estilo de resumos estruturados, mas sem títulos: 1) Contexto: Coloque a questão abordada em um contexto amplo e destaque o propósito do estudo; 2) Métodos: Descreva brevemente os principais métodos ou tratamentos aplicados. Inclua quaisquer números de pré-registro relevantes e espécies e linhagens de quaisquer animais utilizados; 3) Resultados: Resuma as principais descobertas do artigo; e 4) Conclusão: Indique as principais conclusões ou interpretações. O resumo deve ser uma representação objetiva do artigo: não deve conter resultados que não sejam apresentados e fundamentados no texto principal e não deve exagerar as principais conclusões.

Palavras-chave: De três a dez palavras-chave pertinentes devem ser adicionadas após o resumo. Recomendamos que as palavras-chave sejam específicas para o artigo, mas razoavelmente comuns na área temática.

Seções do Manuscrito de Pesquisa

Introdução: A introdução deve situar brevemente o estudo em um contexto amplo e destacar sua importância. Deve definir o propósito do trabalho e sua importância, incluindo as hipóteses específicas que estão sendo testadas. O estado atual da área de pesquisa deve ser revisado cuidadosamente e as principais publicações citadas. Destaque hipóteses controversas e divergentes quando necessário. Por fim, mencione brevemente o objetivo principal do trabalho

e destaque as principais conclusões. Mantenha a introdução compreensível para cientistas que trabalham fora do tema do artigo.

Resultados: Forneça uma descrição concisa e precisa dos resultados experimentais, sua interpretação, bem como as conclusões experimentais que podem ser tiradas.

Discussão: Os autores devem discutir os resultados e como eles podem ser interpretados à luz de estudos anteriores e das hipóteses de trabalho. Os resultados e suas implicações devem ser discutidos no contexto mais amplo possível, e as limitações do trabalho devem ser destacadas. Direções futuras de pesquisa também podem ser mencionadas. Esta seção pode ser combinada com Resultados.

Materiais e Métodos: Devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir que outros reproduzam e desenvolvam os resultados publicados. Novos métodos e protocolos devem ser descritos em detalhes, enquanto métodos bem estabelecidos podem ser descritos brevemente e citados apropriadamente. Forneça o nome e a versão de qualquer software usado e deixe claro se o código de computador usado está disponível. Inclua quaisquer códigos de pré-registro.

Conclusões: Esta seção não é obrigatória, mas pode ser adicionada ao manuscrito se a discussão for extraordinariamente longa ou complexa.

Material de fundo

Contribuições dos Autores: Espera-se que cada autor tenha feito contribuições substanciais para a concepção ou design do trabalho; ou para a aquisição, análise ou interpretação de dados; ou para a criação de um novo software usado no trabalho; ou que tenha redigido o trabalho ou o revisado substancialmente; E que tenha aprovado a versão submetida (e a versão substancialmente editada pela equipe do periódico que envolva a contribuição do autor para o estudo); E que concorde em ser pessoalmente responsável pelas próprias contribuições do autor e por garantir que questões relacionadas à precisão ou integridade de qualquer parte do trabalho, mesmo aquelas nas quais o autor não esteve pessoalmente envolvido, sejam adequadamente investigadas, resolvidas e documentadas na literatura.

Para artigos de pesquisa com vários autores, um breve parágrafo especificando suas contribuições individuais deve ser fornecido. As seguintes declarações devem ser usadas: "Conceitualização, XX e YY; Metodologia, XX; Software, XX; Validação, XX, YY e ZZ; Análise Formal, XX; Investigação, XX; Recursos, XX; Curadoria de Dados, XX; Redação – Preparação do Rascunho Original, XX; Redação – Revisão e Edição, XX; Visualização, XX; Supervisão, XX; Administração do Projeto, XX; Aquisição de Financiamento, YY".

Financiamento: Todas as fontes de financiamento do estudo devem ser divulgadas. Indique claramente as bolsas que recebeu para apoiar o seu trabalho de pesquisa e se recebeu fundos

para cobrir os custos de publicação. Observe que alguns financiadores não reembolsarão as taxas de processamento de artigos (APC) se o financiador e o número da bolsa não estiverem identificados de forma clara e correta no artigo. As informações de financiamento podem ser inseridas separadamente no sistema de submissão pelos autores durante a submissão do seu manuscrito. Essas informações de financiamento, se disponíveis, serão depositadas no FundRef se o manuscrito for finalmente publicado.

Agradecimentos: Nesta seção, você pode reconhecer qualquer apoio fornecido que não esteja coberto pelas seções de contribuição ou financiamento do autor. Isso pode incluir suporte administrativo e técnico, ou doações em espécie (por exemplo, materiais usados em experimentos).

Conflitos de Interesse: Os autores devem identificar e declarar quaisquer circunstâncias ou interesses pessoais que possam ser percebidos como influenciadores da representação ou interpretação dos resultados de pesquisa relatados. Se não houver conflito de interesses, por favor, declare "Os autores declaram não haver conflito de interesses".

Referências: As referências devem ser numeradas em ordem de aparecimento no texto (incluindo legendas de tabelas e figuras) e listadas individualmente ao final do manuscrito. Recomendamos preparar as referências com um software de bibliografia, como EndNote , ReferenceManager ou Zotero, para evitar erros de digitação e referências duplicadas.

Citações e referências em arquivos suplementares são permitidas desde que também apareçam no texto principal e na lista de referências.

Todas as Figuras, Esquemas e Tabelas devem ser inseridas no texto principal próximas à primeira citação e devem ser numeradas seguindo o número de aparição (Figura 1, Esquema 1, Figura 2, Esquema 2, Tabela 1, etc.).

Todas as Figuras, Esquemas e Tabelas devem ter um título e uma legenda explicativos curtos. Todas as colunas da tabela devem ter um título explicativo. Para facilitar a edição de tabelas maiores, fontes menores podem ser usadas, mas não menos que 8 pt. Os autores devem usar a opção Tabela do Microsoft Word para criar tabelas.

As imagens de células e western blots devem ser grandes o suficiente para que as características relevantes sejam visualizadas.