

Universidade Federal de Ouro Preto

Escola de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição
PPGSN

Dissertação

**Atividade antioxidante
e anti-inflamatória de
extratos vegetais com
potencial fitoterápico**

Thainá Gomes Peixoto

Ouro Preto



UFOP

2021

Thainá Gomes Peixoto

Atividade antioxidante e anti-inflamatória de extratos vegetais com potencial fitoterápico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Saúde e Nutrição, da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Saúde e Nutrição
Linha de Pesquisa: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Guimarães Drummond e Silva

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Barbosa de Queiroz

Ouro Preto – Minas Gerais

2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P377a Peixoto, Thainá Gomes.

Atividade antioxidante e anti-inflamatória de extratos vegetais com potencial fitoterápico. [manuscrito] / Thainá Gomes Peixoto. - 2021. 68 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Guimarães Drummond e Silva.
Coorientadora: Profa. Dra. Karina Barbosa de Queiroz.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Saúde e Nutrição.

1. Inflamação. 2. Antioxidantes. 3. Plantas medicinais. I. Queiroz, Karina Barbosa de. II. Silva, Fernanda Guimarães Drummond e. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 613.2

Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB6/2247



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE NUTRICAÇÃO
COORDENACAO DO PROGRAMA DE POS-GRADUACAO
EM SAUDE E NUTRICAÇÃO



FOLHA DE APROVAÇÃO

Thainá Gomes Peixoto

Atividade antioxidante e antiinflamatória de extratos vegetais com potencial fitoterápico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 28 de junho de 2021.

Membros da banca

Dra. Fernanda Guimarães Drummond e Silva - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Karina Barbosa de Queiroz (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Tássia Batista Pessato (Universidade Federal do Triângulo Mineiro)
Dra. Melina Oliveira de Souza (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Erica Aguiar Moraes (Universidade Federal do Espírito Santo)

Fernanda Guimarães Drummond e Silva, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 14 de janeiro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Guimaraes Drummond e Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/01/2022, às 14:44, 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 http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0269074** e o código CRC **2EA83100**.

DEDICATÓRIA

(In memoriam)

À minha querida Tia Ilda que, infelizmente, como milhares de brasileiros, foi vítima, também, do negacionismo. Nada mais justo que ciência seja dedicada a você! Obrigada por tanto amor devotado a mim em tantos anos de cuidado e carinho!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Alessandra e Maurício que, como sempre, não mediram esforços para que esse sonho se realizasse. Obrigada por todo apoio e por sempre acreditarem em mim!

À minha família, que sempre torceu pelas minhas vitórias! Em especial, agradeço a Ana Laura, Amanda e Vinício que, juntamente aos meus pais, tornaram esses dois anos um lugar de aceitação e acolhimento, o que muito contribuiu para que esse trabalho se tornasse real. Obrigada por tanto amor!

À Bianca, por compartilhar a vida comigo! Obrigada por toda escuta, paciência e companheirismo. Lhe amo!

À minha orientadora, Fernanda Guimarães Drummond e Silva, que compartilhou essa jornada comigo da maneira mais leve possível. Obrigada por todas as oportunidades e ensinamentos! Desejo vida longa a essa parceria!

À minha coorientadora, Karina Barbosa de Queiroz, por contribuir com meu aprendizado e com meu desenvolvimento como pesquisadora.

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao Programa de Pós Graduação em Saúde e Nutrição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aproveito para agradecer aos professores e técnicos de todos os laboratórios que abriram as portas para que esse trabalho pudesse ser realizado. Em especial, ao Professor Dr. Luís Carlos Crocco Afonso, que permitiu a realização de grande parte ao disponibilizar o Laboratório de Imunoparasitologia (LIP).

Por fim, agradeço a todos que lutam pela ciência e defendem a Universidade Pública! Seguimos!

RESUMO

A obesidade é acompanhada de inflamação sistêmica crônica de baixo grau e estresse oxidativo, estando associada ao desenvolvimento de doenças crônicas, como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. O aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), somado a outras modificações sofridas pelos adipócitos, estimula as citocinas pró-inflamatórias via fator nuclear kappa B (NF- κ B), principal via de transcrição de diversos genes inflamatórios. É de grande interesse que terapias coadjuvantes eficazes contra o estresse oxidativo e a inflamação associados à obesidade, como a identificação de compostos naturais capazes de aumentar o poder antioxidante e anti-inflamatório do organismo, sejam estudados. Objetivou-se estudar e comparar os efeitos protetores de fitoterápicos, podendo contribuir com informações sobre o potencial de ação dessas espécies em relação a capacidade antioxidante *in vitro* e anti-inflamatória em cultura de células das espécies *Curcubita moschata* (CMO e CMV), *Juniperus chinensis* (JC), *Peucedanum ostruthium* (PO), *Pinellia ternata* (PTO e PTV) Breit., *Rubus coreanus* (RC), *Rubus chingii* Hu (RCH), *Solanum tuberosum* (STV e ST) e *Viola mandshurica* (VM). A atividade antioxidante foi determinada pelo teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu, método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*). A atividade anti-inflamatória foi avaliada por meio da produção de óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10), induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em células de macrófagos de murinos RAW 264.7. A produção de NO foi avaliada por meio do teste do reagente de Griess, e IL-10 e TNF- α por kit ELISA. Os extratos PTO, RCH, RC, PTV e VM obtiveram as maiores capacidades redutoras e as maiores capacidades antioxidantes pelo método FRAP, sendo PTO o maior valor FRAP. O extrato RCH apresentou o maior valor ORAC, seguida pela RC e VM. Dessa forma, é provável que o extrato PTO possua como mecanismo preferencial para atuação como antioxidante a doação de elétrons. O extrato RCH, RC e VM parecem atuar como antioxidante por doação de elétrons e transferência de íons hidrogênio. Todos os extratos apresentaram atividade anti-inflamatória, seja pela redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, NO e TNF- α , e/ou pelo aumento da citocina anti-inflamatória, IL-10. Os extratos RC e JC diminuíram a produção de NO em todas as concentrações estudadas, de forma dose-dependente, com reduções de até 68,63% e 64,91%, respectivamente, em relação a amostra não tratada. Da mesma forma, o tratamento com a PTO resultou no aumento, de forma dose depende, em até 6x da IL-10, em relação a amostra não

tratada. Os fitoterápicos em questão apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória, com especial destaque ao extrato de *Rubus coreanus*, que uniu os dois efeitos aqui objetivados.

Palavras chave: Inflamação, antioxidantes, plantas medicinais

ABSTRACT

Obesity is accompanied by low-grade chronic systemic inflammation and oxidative stress, being associated with the development of chronic diseases such as type 2 diabetes mellitus (DM2), cardiovascular diseases and some types of cancer. The increase in reactive oxygen species (ROS), added to other changes undergone by adipocytes, stimulates pro-inflammatory cytokines via nuclear factor kappa B (NF- κ B), the main transcription pathway for several inflammatory genes. It is of great interest that effective adjuvant therapies against obesity-associated oxidative stress and inflammation, such as the identification of natural compounds capable of increasing the body's antioxidant and anti-inflammatory power, be studied. The aim of this study was to study and compare the protective effects of herbal medicines which may contribute with information about the action potential of these species in relation to the *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory capacity in cell cultures of the species *Curcubita moschata* (CMO e CMV), *Juniperus chinensis* (JC), *Peucedanum ostruthium* (PO), *Pinellia ternata* (PTO e PTV) Breit., *Rubus coreanus* (RC), *Rubus chingii* Hu (RCH), *Solanum tuberosum* (STV e ST) e *Viola mandshurica* (VM). The antioxidant activity was determined by the total reducing capacity of the Folin-Ciocalteu reagent, FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) and ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) method. The anti-inflammatory activity was evaluated through the production of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 10 (IL-10), induced by lipopolysaccharide (LPS) in RAW murine macrophage cells 264.7. NO production was evaluated using the Griess reagent test, and IL-10 and TNF- α using an ELISA kit. The PTO, RCH, RC, PTV and VM extracts had the highest reducing capacities and the highest antioxidant capacities by the FRAP method, with PTO being the highest FRAP value. The RCH extract had the highest ORAC value, followed by RC and VM. Thus, it is likely that the PTO extract has electron donation as its preferred mechanism for acting as an antioxidant. The extract RCH, RC and VM seem to act as an antioxidant by donating electrons and transferring hydrogen ions. All extracts showed anti-inflammatory activity, either by reducing the production of pro-inflammatory cytokines, NO and TNF- α , and/or by increasing the anti-inflammatory cytokine, IL-10. The RC and JC extracts decreased NO production at all concentrations studied, in a dose-dependent manner, with reductions of up to 68.63% and 64.91%, respectively, in relation to the untreated sample. Likewise, treatment with PTO resulted in an increase, in a dose-dependent manner, in up to 6x of IL-10, in relation to the untreated sample. The herbal medicines in question have antioxidant and anti-inflammatory

activity, with special emphasis on the *Rubus coreanus* extract, which united the two effects aimed here.

Keywords: Inflammation, antioxidants, herbal medicines

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Perfis cromatográficos dos extratos vegetais. Os perfis cromatográficos dos extratos aquosos estão representados da seguinte maneira: (A) *Curcubita moschata* (CMO), (B) *Curcubita moschata* (CMV), (C) *Juniperus chinensis* (JC), (D) *Peucedanum ostruthium* (PO), (E) *Pinellia ternata* Breit (PTO), (F) *Pinellia ternata* Breit (PTV), (G) *Rubus coreanus* (RC), (H) *Rubus chingii* Hu (RCH), (I) *Solanum tuberosum* (STV), (J) *Solanum tuberosum* (ST) e (K) *Viola mandshurica* (VM). O eixo X indica o tempo de retenção do pico cromatográfico. O eixo Y indica a área de pico (mAU). As setas indicam os picos cromatográficos de maior intensidade em cada extrato aquoso.

Figura 2. Teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu. A diferença entre os extratos aquosos foi avaliada por one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão. A coluna do extrato aquoso representado pela letra 'a' apresenta o maior valor do experimento. As letras subsequentes representam uma ordem decrescente de valores (a – h). Colunas com letras distintas entre si representam diferenças entre os extratos aquosos representados. O eixo X indica a sigla dos extratos aquosos; o eixo Y indica os valores obtidos no experimento. **CMO e CMV** - *Curcubita moschata*; **JC** - *Juniperus chinensis*, **PO** - *Peucedanum ostruthium*, **PTO e PTV** - *Pinellia ternata* Breit., **RC** - *Rubus coreanus*, **RCH** - *Rubus chingii* Hu, **STV e ST** - *Solanum tuberosum*, **VM** - *Viola mandshurica*, **EAG** – equivalente de ácido gálico, **FCRS** - *Folin-Ciocalteu reacting substances*. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 3. Atividade antioxidante por FRAP dos extratos aquosos. A diferença entre os extratos aquosos foi avaliada por one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão. A coluna do extrato aquoso representado pela letra 'a' apresenta o maior valor do experimento. As letras subsequentes representam uma ordem decrescente de valores (a – h). Colunas com letras distintas entre si representam diferenças entre os extratos aquosos representados. O eixo X indica a sigla dos extratos aquosos; o eixo Y indica os valores obtidos no experimento. **CMO e CMV** - *Curcubita moschata*; **JC** - *Juniperus chinensis*, **PO** - *Peucedanum ostruthium*, **PTO e PTV** - *Pinellia ternata* Breit., **RC** - *Rubus coreanus*, **RCH** - *Rubus chingii* Hu, **STV e ST** - *Solanum tuberosum*, **VM** - *Viola mandshurica*, **TE** – trolox equivalente. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 4. Atividade antioxidante por ORAC dos extratos aquosos. A diferença entre os extratos aquosos foi avaliada por one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão. A coluna do extrato aquoso representado pela letra 'a' apresenta o maior valor do experimento. As letras subsequentes representam uma ordem decrescente de valores (a – h). Colunas com letras distintas entre si representam diferenças entre os extratos aquosos representados. O eixo X indica a sigla dos extratos aquosos; o eixo Y indica os valores obtidos no experimento. **CMO e CMV** - Curcubita moschata; **JC** - Juniperus chinensis, **PO** - Peucedanum ostruthium, **PTO e PTV** - Pinellia ternata Breit., **RC** - Rubus coreanus, **RCH** - Rubus chingii Hu, **STV e ST** - Solanum tuberosum, **VM** - Viola mandshurica, **TE** – trolox equivalente. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 5. Viabilidade celular de RAW 264.7 pelo reagente MTT. A porcentagem de células RAW 264.7 viáveis foi calculada em relação ao grupo de células não tratadas (100% de viabilidade), adotando 80% de viabilidade como ponto de corte. Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão. O eixo X indica as concentrações testadas dos extratos aquosos; o eixo Y indica a porcentagem da viabilidade celular. **CMO e CMV** - Curcubita moschata; **JC** - Juniperus chinensis, **PO** - Peucedanum ostruthium, **PTO e PTV** - Pinellia ternata Breit., **RC** - Rubus coreanus, **RCH** - Rubus chingii Hu, **STV e ST** - Solanum tuberosum, **VM** - Viola mandshurica. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 6. Produção de NO em células RAW 264.7. A diferença entre os extratos aquosos foi avaliada por one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*. Diferenças significativas foram consideradas $*p < 0,05$, em relação ao **LPS** (Controle). Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão. O eixo X indica as concentrações testadas dos extratos aquosos; o eixo Y indica a concentração de NO. **CMO e CMV** - Curcubita moschata; **JC** - Juniperus chinensis, **PO** - Peucedanum ostruthium, **PTO e PTV** - Pinellia ternata Breit., **RC** - Rubus coreanus, **RCH** - Rubus chingii Hu, **STV e ST** - Solanum tuberosum, **VM** - Viola mandshurica, **NO** – óxido nítrico, **LPS** - lipopolissacarídeo. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 7. Produção de IL-10 e TNF- α em células RAW 264.7. A diferença entre os extratos aquosos foi avaliada por one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*. Diferenças significativas foram consideradas $*p < 0,05$, em relação ao **LPS** (Controle). Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão. O eixo X indica as concentrações testadas dos extratos aquosos; o eixo Y indica a concentração das citocinas. **(A)** Concentração IL-10. **(B)**

Concentração TNF- α . **CMO e CMV** - Curcubita moschata; **JC** - Juniperus chinensis, **PO** - Peucedanum ostruthium, **PTO e PTV** - Pinellia ternata Breit., **RC** - Rubus coreanus, **RCH** - Rubus chingii Hu, **STV e ST** - Solanum tuberosum, **VM** - Viola mandshurica, **IL-10** – interleucina-10, **TNF- α** – fator de necrose tumoral alfa, **LPS** - lipopolissacarídeo. Fonte: elaborado pelo autor.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nome científico das espécies, sigla adotada para os extratos vegetais derivados, fabricante e padronização dos ativos	37
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK - Proteína quinase ativada por AMP

CAT - Catalase

C. moschata - *Cucurbita moschata*

COX-2 - Ciclo-oxigenase-2

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

GLP-1 - Peptídeo semelhante a glucagon 1

GPX - Glutaciona peroxidase

CLAE - FR - Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

IL-6 - Interleucina-6

IL-10 - Interleucina-10

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

J. chinensis - *Juniperus chinensis*

KEAP1 - Proteína-1 do tipo kelch

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos

MAPKp38 - Proteína quinase ativada por mitogéno P38

MCP-1/CCL2 - Proteína quimiotática-1 de monócitos

MIP-1 α /CCL3 - Proteína inflamatória de macrófagos 1-alfa

NO - Óxido nítrico

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

Nrf2 - Fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2

PAI-1 - Inibidor do ativador do plasminogênio 1

PGE2 - Prostaglandina E2

P. ostruthium - *Peucedanum ostruthium*

P. ternata - *Pinellia ternata* Breit.

R. chinguii Hu - *Rubus chingii* Hu

R. coreanus - *Rubus coreanus*

SOD - Superóxido dismutase

SNS - Sistema Nervoso Simpático

S. tuberosum - *Solanum tuberosum*

TAB - Tecido Adiposo Branco

TLRs - Receptores Semelhantes a Toll

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

V. mandshurica - *Viola mandshurica*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. OBESIDADE: DEFINIÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA	19
2.1.1. Inflamação crônica subclínica como componente da obesidade.....	22
2.1.2. Estresse oxidativo na obesidade	24
2.2. FITOTERAPIA E COMPOSTOS FENÓLICOS	26
2.2.1. Atividade antioxidante dos compostos fenólicos	29
2.2.2. Atividade anti-inflamatória dos compostos fenólicos	30
2.3. FITOTERÁPICOS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO	32
2.3.1. <i>Cucurbita moschata</i>	32
2.3.2. <i>Juniperus chinensis</i>	32
2.3.3. <i>Peucedanum ostruthium</i>	32
2.3.4. <i>Pinellia ternata</i> Breit.	33
2.3.5. <i>Rubus chingii</i> Hu e <i>Rubus coreanus</i>	33
2.3.6. <i>Solanum tuberosum</i>	34
2.3.7. <i>Viola mandshurica</i>	34
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo Geral	35
3.2. Objetivos Específicos	35
4. METODOLOGIA.....	36
4.1. Material.....	36
4.2. Obtenção dos extratos aquosos.....	36
4.3. Caracterização do perfil de compostos fenólicos dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR).....	38
4.4. Determinação da Atividade Antioxidante	38

4.4.1. Teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu.....	38
4.4.2. Poder antioxidante de redução do ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power) – FRAP	39
5.4.3. Determinação da Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio - ORAC	39
4.5. Determinação da Atividade Anti-inflamatória	40
4.5.1. Cultura de células	40
4.5.2. Ensaio da viabilidade celular	40
4.5.3. Produção de mediadores inflamatórios.....	41
4.5.4. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)	41
4.5.5. Determinação de citocinas inflamatórias	41
4.6. Análise Estatística.....	42
5.0. RESULTADOS	43
5.1. Caracterização do perfil de compostos fenólicos dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR).....	43
5.2. Atividade Antioxidante.....	47
5.2.1. Teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu.....	47
5.2.2. Poder antioxidante de redução do ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power) – FRAP	48
5.2.3. Determinação da Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio - ORAC	49
5.3. Atividade Anti-inflamatória.....	50
5.3.1. Produção de óxido nítrico (NO)	51
5.3.2. Produção de interleucina-10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)	52
6.0. DISCUSSÃO.....	54
7.0. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é um importante problema de saúde e fator de risco para doenças crônicas, como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer. O desenvolvimento dessas comorbidades está associado a um estado de inflamação de baixo grau e estresse oxidativo (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017), gerado pelo excesso de nutrientes (LEFRANC et al., 2018; KOCH, 2019). O aumento na necessidade de armazenamento no tecido adiposo durante a obesidade promove alterações na secreção de citocinas e atração de células imunes, como os macrófagos M1, além do aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (ZHANG et al., 2016; LEFRANC et al., 2018). O principal fator de transcrição de diversos genes inflamatórios é o fator nuclear kappa B (NF-κB) (NEHA et al., 2019), que pode ser estimulado por ácidos graxos saturados que se ligam ao receptor TLR-4, por ERO (SIRIWARDHANA et al., 2013; RANI et al., 2016) e, ainda, por lipopolissacarídeo (LPS) (MARIMOUTOU et al., 2015).

Terapias coadjuvantes voltadas para diminuição ou inibição da inflamação, diminuição das espécies reativas ou aumento das defesas antioxidantes, podendo auxiliar no desenrolar da condição e reduzir as comorbidades associadas a obesidade, são de grande interesse. Dentro desse contexto, podemos citar os fitoterápicos. A fitoterapia utiliza plantas, como as ricas em compostos fenólicos, como matéria prima para obtenção de produtos, como extratos padronizados, para auxiliar no tratamento de comorbidades ou como agentes promotores da saúde (FALZON et al., 2017).

A fitoterapia faz parte das práticas integrativas e complementares (PICS) do Sistema Único de Saúde (SUS), devendo ser utilizada como complementar ou alternativa à medicina tradicional (BRASIL, 2015). Entre as vantagens de utilização do uso de fitoterápicos, podemos citar o custo que, normalmente, é menor do que com medicamentos tradicionais (TRAUDI et al., 2010), o sinergismo entre compostos bioativos de uma mesma espécie vegetal, que atua como potencializador de efeitos e redutor da dose terapêutica necessária e da toxicidade (BRGLEZ MOJZER et al., 2016), além do maior consumo de compostos bioativos por meio dos fitoterápicos que pelos alimentos, pois nesses produtos todos os compostos estão presentes de forma concentrada.

Com mais de 8.000 estruturas conhecidas, os compostos fenólicos são uma das principais classes de ativos dos fitoterápicos e podem apresentar ações antioxidantes, anti-inflamatórias, anticâncer, anti-obesidade, anti-neurodegenerativo e de prevenção de doenças cardiovasculares em humanos (BRGLEZ MOJZER et al., 2016; KOCH, 2019). Esses podem agir impedindo que a via do NF-κB se desenrole, suprimindo diretamente citocinas

inflamatórias ou estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias (YAHFOUFI et al., 2018). Como antioxidantes, podem aumentar as defesas biológicas ou atuar na eliminação direta de radicais livres (NEHA et al., 2019).

Entretanto, devido aos tipos e subtipos, a atuação dos compostos fenólicos como anti-inflamatórios e antioxidantes têm diferentes alvos de ação. Além disso, o sinergismo entre compostos bioativos também altera a atuação (BRGLEZ MOJZER et al., 2016). O amplo leque de opções de plantas faz com que muitas não tenham seu potencial avaliado de maneira extensa, tornando-as campo para novos estudos. Estudos também tendem a avaliar compostos fenólicos de maneira isolada (LEE et al., 2015; LEE et al., 2017) e considerando apenas alguns marcadores (ROZEMA et al., 2012; DARWISH et al., 2019), não aproveitando todo o potencial dos fitoterápicos.

Dentro desse contexto, estão incluídas as plantas *Curcubita moschata*, *Juniperus chinensis*, *Solanum tuberosum*, *Peucedanum ostruthium*, *Pinellia ternata* Breit., *Rubus chingii* Hu, *Rubus coreanus* e *Viola mandshurica*, que derivam fitoterápicos utilizados tradicionalmente na medicina chinesa, entretanto, são estudados em escassez, principalmente em relação a atividade antioxidante e anti-inflamatória, com poucos dados recentes. Além disso, esses fitoterápicos não são bem explorados e utilizados no Brasil.

A hipótese desse estudo é de que os fitoterápicos, na forma farmacêutica de extratos padronizados, aqui avaliados possuem capacidade antioxidante e anti-inflamatória. Dessa forma, objetivou-se estudar e comparar os efeitos protetores desses fitoterápicos, podendo contribuir com informações sobre o potencial de ação dessas espécies em relação a capacidade antioxidante e anti-inflamatória, e ser um acréscimo importante para possíveis terapias coadjuvantes voltadas para a obesidade, além de conhecer os possíveis mecanismos pelos quais os polifenóis desses extratos possuem ação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. OBESIDADE: DEFINIÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

A obesidade, considerada uma epidemia pelo aumento da prevalência mundial (NCD-RisC, 2016) está associada ao desenvolvimento de doenças crônicas e comorbidades metabólicas, como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares, como hipertensão, e alguns tipos de câncer (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). Em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos apresentavam excesso de peso, sendo mais de 650 milhões obesos, o que representa 13% da população adulta do mundo. Antes considerado problema de saúde de países desenvolvidos, o aumento da prevalência da obesidade tem afetado também países em desenvolvimento (WHO, 2020). Em 2018, a prevalência de obesidade em pessoas de 18 anos ou mais, no Brasil, atingiu 19,8% (BRASIL, 2019), sendo maior que a média mundial.

O sobrepeso e a obesidade são definidos como uma desproporção entre a massa corpórea e a altura acompanhada do acúmulo excessivo de gordura corporal (WHO, 2020). De maneira geral, o acúmulo de gordura corporal é resultado de gasto energético menor que a ingestão calórica, levando a um balanço energético positivo, que é armazenado na forma de gordura (OUSSAADA et al., 2019). A ingestão alimentar desencadeia diversos sinais, que são modulados pelo sistema nervoso simpático (SNS), hormônios e neuropeptídeos, o que torna a gênese da obesidade algo complexo (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017).

O hipotálamo é a chave para o controle da ingestão alimentar e do gasto energético. Dois grupos distintos de neurônios localizados no núcleo arqueado são responsáveis por mediar o comportamento alimentar: neurônios que expressam pró-opiomelanocortina (POMC), definidos como anorexígeno, que inibem o apetite, e neurônios orexígenos, que liberam os neurotransmissores neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada à agouti (AgRP), capazes de estimular o apetite (VALDEARCOS et al., 2015).

Os neurônios POMC liberam o hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α -MSH), que por sua vez se liga ao receptor de melanocortina 3 e 4 (Mc3r e Mc4r). O AgRP atua como antagonista dos receptores de α -MSH, impedindo sua ação. O NPY possui receptor próprio e é potente estimulador do apetite (VALDEARCOS et al., 2015). Diversos fatores podem alterar o equilíbrio entre esses neurônios, provocando uma desregulação nos sinais que estes promovem. Por exemplo, indivíduos obesos podem ter genes responsáveis pelo Mc4r modificados, alterando a capacidade de inibição do apetite

(GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). A serotonina estimula α -MSH e inibe NPY/AgRP, diminuindo a ingestão de alimentos quando sinalizada (OUSSAADA et al., 2019).

Além dos neurônios POMC, NPY e AgRP, diversos hormônios e neuropeptídeos periféricos regulam a ingestão alimentar, tendo ação local e por estimulação dos neurônios. A ingestão de alimentos libera gastrina, colecistoquinina (CCK), peptídeo inibidor gástrico (GIP), grelina, leptina gástrica, peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1), peptídeo YY (PYY) e oxintomodulina (OXM). A CCK e GIP, por exemplo, inibem a motilidade gástrica, induzindo saciedade e reduzindo a ingestão alimentar. A leptina gástrica e o GLP-1 possuem ação nas vias neuronais para induzir saciedade, enquanto a grelina atua na indução das vias responsáveis por induzir o apetite. Em situações pré-prandiais, as concentrações de grelina estão elevadas no estômago, o que estimula o neurônio NPY/AgRP, aumentando sua expressão e seus transmissores. Os hormônios GLP-1, PYY, CCK e OXM, portanto, estão diminuídos em situação pré-prandial e aumentados em situações pós-prandial, atuando na estimulação dos neurônios anorexígenos no hipotálamo e inibição dos orexígenos (CAMILLERI, 2015). Em indivíduos obesos, a atividade retardada ou reduzida desses hormônios parece favorecer o maior consumo alimentar (OUSSAADA et al., 2019).

Em condições metabolicamente adequadas, o período pós-prandial apresenta sinais anorexígenos advindos da leptina e da insulina. A leptina é secretada pelo tecido adiposo e está relacionada com a quantidade de gordura corporal, sendo diretamente proporcional. No hipotálamo, estimula o neurônio POMC, aumentando a liberação de α -MSH, e diminuindo a ingestão calórica (CAMILLERI, 2015; OUSSAADA et al., 2019). A insulina exerce no hipotálamo a mesma ação da leptina, reduzindo a ingestão calórica. Ambos estimulam o neurônio POMC e inibem o neurônio AgRP/NPY, diminuindo a ingestão calórica e aumentando o gasto energético (JAIS et al., 2017).

Durante o jejum, a expressão de AgRP é aumentada, enquanto a expressão de POMC é reduzida. Isso porque os níveis de insulina e leptina estão reduzidos nessas condições. O aumento na estimulação do neurônio NPY/AgRP provoca inibição do neurônio POMC, reduzindo a circulação de α -MSH (CAMILLERI, 2015). Dessa forma, o aumento na estimulação da fome e diminuição do gasto energético (JAIS et al., 2017).

Em indivíduos obesos, há resistência à leptina e insulina, o que interrompe o feedback e leva ao aumento na ingestão de alimentos e supressão do gasto energético (OUSSAADA et al., 2019). Essa resistência é resultado da inflamação desencadeada no hipotálamo devido a circulação excessiva de nutrientes (VALDEARCOS et al., 2015; LE THUC et al., 2017).

Ácidos graxos saturados de cadeia longa são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, se acumulando especificamente no hipotálamo e atrapalhando a sinalização anorexígena da leptina e da insulina. Além disso, os ácidos graxos saturados também promovem a produção de citocinas inflamatórias no hipotálamo (LE THUC et al., 2017).

Estes são capazes de estimular cascatas inflamatórias por sinalização do Toll-like receptor - 4 (TLR-4) que, por sua vez, estimula o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) (JAIS et al., 2017; LE THUC et al., 2017). A cascata de sinalização a jusante leva a fosforilação do complexo IKK, e posteriormente de $IKK\alpha$, que libera o fator nuclear kappa B (NF- κ B) para sua translocação nuclear, onde seu dímero p50 liga-se as partes promotoras dos genes alvo. Esses genes são responsáveis pela transcrição de citocinas inflamatórias, além do gene supressor da sinalização de citocina 3 (SOCS3), um inibidor neuronal da sinalização de insulina. Com a exposição, a SOCS3 é positivamente regulada no neurônio AgRP, aumentando a ingestão alimentar, desregulação energética e resistência à insulina e leptina. A ativação específica no cérebro de $IKK\beta$ resulta em aumento na ingestão alimentar, ganho de peso corporal e impede a sinalização de insulina e leptina (JAIS et al., 2017).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), citocina inflamatória produzida pela via do NF- κ B, atua como um dos fatores de estimulação da via, dessa forma, o TNF- α promove uma auto estimulação. Além da via do NF- κ B, a ligação de TNF- α ao seu receptor promove a sinalização de c-Jun N-terminal quinase (JNK), pertencente à família da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (JAIS et al., 2017). Dessa forma, TNF- α estimula a resistência à insulina e leptina por ativação adicional do NF- κ B.

O TLR-4 também ativa a via da MAPK, com consequente sinalização dependente de p38 e JNK. A ativação de JNK, seja pelo TLR4 ou pelo TNF- α , promove resistência à insulina por fosforilar o receptor de insulina em resíduos de serina, impedindo a correta sinalização do GLUT-4, além de hiperfagia em neurônios AgRP (VALDEARCOS et al., 2015; JAIS et al., 2017). O estresse do retículo endoplasmático e o estresse oxidativo também aparecem como mediador da inflamação hipotalâmica. Isso ocorre, pois, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) aumenta com a oxidação dos nutrientes, o que impede sinalização adequada no hipotálamo e pode induzir a autofagia dos neurônios (JAIS et al., 2017; LE THUC et al., 2017).

Além das alterações do controle da fome, o hipotálamo inflamado está associado a liberação prejudicada de insulina pelas células β pancreáticas, desenvolvimento de disfunção renovascular, levando à hipertensão, diminuição da termogênese, esteatose e resistência à insulina no fígado (VALDEARCOS et al., 2015).

2.1.1. Inflamação crônica subclínica como componente da obesidade

A obesidade induz um estado de inflamação sistêmica crônica de baixo grau (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017), que vem posteriormente a inflamação hipotalâmica citada no tópico anterior (VALDEARCOS et al., 2015; JAIS et al., 2017). Assim como na inflamação hipotalâmica, o principal fator desencadeador da inflamação do tecido adiposo é o excesso de nutrientes, provocando respostas inflamatórias no tecido, estresse oxidativo e resistência à insulina (LEFRANC et al., 2018; KOCH, 2019).

O tecido adiposo é reconhecido pelas funções de isolamento térmico e de armazenamento do excedente energético. Após a descoberta da produção de leptina pelo tecido adiposo branco (TAB), este também passou a ser reconhecido por sua função endócrina, mediada pelas adipocinas (ADAMCZAK et al., 2013). O TAB é composto por adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos, células nervosas, células musculares, linfócitos B e T, macrófagos e neutrófilos. As células imunes e os adipócitos secretam hormônios, espécies reativas de oxigênio e adipocinas, que influenciam nas respostas de diversos órgãos, resultando em efeitos no metabolismo energético, na sensibilidade à insulina, no metabolismo de glicose e lipídeos e na resposta imune (LEFRANC et al., 2018).

As principais adipocinas produzidas pelo tecido adiposo são a adiponectina, leptina, resistina e visfatina, e são importantes no desenvolvimento de resistência à insulina e inflamação na obesidade (TILG et al., 2006; COELHO et al., 2013). Ainda podemos citar o inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1), onde a produção no tecido adiposo está diretamente ligada ao tamanho dos adipócitos e a quantidade de gordura presente no tecido. É regulada positivamente por citocinas, como o TNF- α , e pode alterar o equilíbrio entre a fibrinólise e fibrinogênese, contribuindo para a remodelação da arquitetura vascular e do processo aterosclerótico (COELHO et al., 2013).

A adiponectina é secretada exclusivamente pelo tecido adiposo e é inversamente associada com a quantidade de tecido adiposo. Estimula a via da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), prevenindo o acúmulo lipídico hepático, aumentando a proliferação de adipócitos, com consequente melhora na sensibilidade à insulina. Ainda estimula a oxidação de ácidos graxos e captação de glicose no músculo esquelético (BARAZZONI et al., 2018). O TNF- α e a interleucina-6 (IL-6) suprimem a sua transcrição (TILG et al., 2006). A leptina, já citada, diminui a ingestão calórica por ação no hipotálamo (CAMILLERI, 2015; OUSSAADA et al., 2019).

Com o maior requerimento por armazenamento de substrato no tecido adiposo, é necessário que ocorra aumento de tamanho, ocorrendo de duas maneiras distintas para atender a demanda (ADAMCZAK et al., 2013). Por hipertrofia dos adipócitos já existentes, ou por hiperplasia, com formação de novos adipócitos. A hiperplasia do tecido adiposo é geralmente saudável devido ao seu caráter adaptativo, com manutenção adequada da vascularização e a secreção de adipocinas. A hipertrofia dos adipócitos, por sua vez, leva a hipóxia do tecido devido a expansão e atrito entre as células (GHABEN et al., 2019).

A hipertrofia dos adipócitos está ligada a elevada lipólise, aumento na secreção de adipocinas inflamatórias e secreção reduzida de adipocinas anti-inflamatórias, além do tamanho dos adipócitos estar ligada a maior resistência à insulina. A hipóxia no tecido também provoca aumento na expressão de genes pró-fibróticos, levando a fibrose do tecido. Além da alteração no perfil de secreção de adipocinas pelos adipócitos, estes, ainda, podem sofrer necrose, levando à infiltração por células imunes e inflamação do tecido dessa maneira (GHABEN et al., 2019). A inflamação presente na obesidade envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, proteína de quimioatração de monócitos (MCP-1) e PAI-1, além de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), pelo tecido adiposo (ZHANG et al., 2016; LEFRANC et al., 2018).

A infiltração dos monócitos, seja após necrose de adipócitos ou por atração pela MCP-1, é acompanhada de indução de tipo M1 nos macrófagos. Indivíduos eutróficos possuem, em maioria, macrófagos M2 no tecido adiposo, que são anti-inflamatórios, expressando interleucina-10 (IL-10) e um inibidor de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de NO. Os macrófagos M1, por sua vez, são mais ativos e pró-inflamatórios; expressam TNF- α , IL-6 e iNOS, estando associados a resistência insulínica sistêmica (SUN et al., 2011). O fenótipo M1 dos macrófagos tem papel essencial na inflamação do tecido adiposo, sendo estes os principais produtores de TNF (KALUPAHANA et al., 2012). Os macrófagos M1 podem ser estimulados, também, por lipopolissacarídeo (LPS) (SIRIWARDHANA et al., 2013).

Um dos mecanismos de transformação dos macrófagos é por ativação do receptor TLR-4 pelos ácidos graxos saturados, que desencadeiam o processo inflamatório do tecido (SIRIWARDHANA et al., 2013). Isto acontece pois o TLR-4 estimula a via do NF- κ B e o fator de transcrição AP-1, levando ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1, e dando origem ao fenótipo M1 dos macrófagos (KALUPAHANA et al., 2012). Além disso, há aumento na fosforilação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), levando a maior diferenciação de adipócitos, e consequente aumento na secreção de

citocinas pró-inflamatórias (SIRIWARDHANA et al., 2013). O NF- κ B é um fator de transcrição redox sensível podendo, portanto, ser estimulado por espécies reativas de oxigênio que, como citado, são produzidos também durante a inflamação (RANI et al., 2016).

A inflamação do tecido adiposo, caracterizada pela lipólise excessiva, aumento nas citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, também promovem alterações sistêmicas. A disfunção do tecido adiposo leva a circulação exagerada de nutrientes pelo organismo, provocando modificações metabólicas em outros órgãos (GHABEN et al., 2019). Especificamente, os ácidos graxos livres e as citocinas inflamatórias ativam a via JNK nos adipócitos, fígado e músculo, promovendo resistência à insulina nos três tecidos (COELHO et al., 2013; JAIS et al., 2017). A citocina TNF- α e IL-6 afetam a sinalização do receptor de insulina, impedindo a captação de glicose (KALUPAHANA et al., 2012).

2.1.2. Estresse oxidativo na obesidade

As reações redox, nas quais ocorrem transferência de elétrons entre moléculas, estão associadas a condições patológicas quando não balanceadas. Esse desequilíbrio progride com geração de ambiente pró-oxidativo, promovendo danos a biomoléculas, tecidos e desenvolvimento de doenças metabólicas (RANI et al., 2016). Os radicais livres são espécies químicas contendo um ou mais elétrons desemparelhados, podendo englobar oxigênio, nitrogênio, carbono e enxofre, sendo a principal definida como espécies reativas de oxigênio (ERO) (RUSKOVSKA et al., 2019).

As ERO são moléculas altamente reativas que participam de vias de sinalização e metabolismo de adipócitos no tecido adiposo, em níveis fisiológicos (LEFRANC et al., 2018). Continuamente gerado pela mitocôndria, ERO são mantidas sob níveis fisiológicos por mecanismos antioxidantes endógenos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (RIGOULET et al., 2011).

O estresse oxidativo, portanto, é definido como um desequilíbrio entre a produção e degradação de ERO (RANI et al., 2016), podendo ser causada por aumento na produção de ERO ou por incapacidade das defesas antioxidantes (LEFRANC et al., 2018). Reações enzimáticas, poluentes, radiação e o metabolismo mitocondrial, o principal destes, são os principais geradores de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio (RANI et al., 2016; LEFRANC et al., 2018). As principais EROs são o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), principal espécie gerada pela cadeia transportadora de elétrons na

mitocôndria, o radical hidroxila (OH^\cdot) e entre o radical peroxinitrito (OONO^\cdot), como principal espécie reativa do nitrogênio (ERN) (LEFRANC et al., 2018).

Os fatores que causam estresse oxidativo no tecido adiposo são a hiperglicemia, o acúmulo de gordura, a hiperleptinemia, inflamação crônica, disfunção tecidual e baixo teor de antioxidantes (SAVINI et al., 2013).

A inflamação citada no tópico anterior promove o aumento das EROs que, sendo prolongado, leva ao estresse oxidativo do tecido adiposo (RANI et al., 2016). O estresse oxidativo, por sua vez, promove dano oxidativo do DNA, desencadeando disfunção mitocondrial, resultando em um círculo vicioso causando acúmulo de lipídios e resistência à insulina (LEFRANC et al., 2018). O excesso de substrato leva a maior produção de elétrons, que reduzem o oxigênio e formam radicais livres, desencadeando uma superprodução de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria. O estresse oxidativo pode, ainda, ter contribuição da NADPH oxidase (NOX) (BARAZZONI et al., 2018; LEFRANC et al., 2018). A lipotoxicidade, por meio da desregulação de adipocinas, também altera os processos de fissão e fusão das mitocôndrias, processo chamado de disfunção mitocondrial. Mitocôndrias disfuncionais não oxidam ácidos graxos adequadamente, resultando no aumento na produção de ERO e alteração na homeostase da glicose (MANNA et al., 2015; LEFRANC et al., 2018).

O excesso de substrato e a incapacidade de metabolização, leva a observação de um estado de hiperglicemia na obesidade. Esse excesso de glicose sobrecarrega a via glicolítica, aumentando a produção de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) e FADH₂ (dinucleótido de flavina e adenina). O aumento do funcionamento da cadeia transportadora de elétrons provoca um vazamento de elétrons, com formação de ânion superóxido (MANNA et al., 2015).

O superóxido altera a via glicolítica, desviando diversos metabólitos. O primeiro é o desvio da glicose para a via do poliol; frutose-6-fosfato para via da hexosamina; fosfato triose produz o principal precursor para os produtos finais de glicação avançada (AGE) e fosfato de dihidroxiacetona é convertido em diacilglicol (DAG), que ativa a via da Proteína quinase C (PKC) (SAVINI et al., 2013). A via do poliol ativa vários genes de estresse, assim como a da hexosamina, que ainda induz estresse no retículo endoplasmático. Tanto os AGEs quanto a PKC estimulam a produção de ERO por ativação de NOX e NF- κ B (MANNA et al., 2015).

O aumento das enzimas NOX induz a produção de radicais superóxidos, enquanto os AGE liga-se a receptores específicos da superfície celular causando a modificação de sinalização, com posterior produção de ERO. A ativação de NF- κ B conduz a transcrição de

moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias, iNOS e microRNAs envolvidos na adipogênese, inflamação e estresse oxidativo (SAVINI et al., 2013; MANNA et al., 2015)

Os ácidos graxos livres aumentam a atividade de NOX e diminuem a expressão das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx); a leptina induz a produção de H₂O₂ (MANNA et al., 2015), também estimula a proliferação e ativação de monócitos e produção de IL-6 e TNF- α (SAVINI et al., 2013).

A disfunção do tecido adiposo também promove aumento de ERO, com a infiltração de macrófagos. O fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2 (Nrf2), fator de transcrição que se liga a região promotora de genes que codificam antioxidantes endógenos, também é afetado. Os adipócitos sofrem uma delação específica ao fator, o que impede a ativação das defesas antioxidantes (SAVINI et al., 2013).

O estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial também contribuem para desenvolvimento de resistência à insulina e DM2 (LEFRANC et al., 2018). Após a ligação da insulina com seu receptor (IR), este sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina. Isto resulta na ativação da quinase do receptor e consequente fosforilação em tirosina de uma família de substratos do receptor de insulina (IRS). A produção elevada de ERO ativam a quinase c-jun-N-terminar (JNK), que fosforila o IRS em resíduos de serina, atenuando a sinalização. Na DM2, a glicotoxicidade e lipotoxicidade aparecem como causas da disfunção de células β no pâncreas (MANNA et al., 2015).

Como podemos concluir, a inflamação e o estresse oxidativo estão diretamente interligados, não podendo saber qual ocorre primeiro. A título de resumo, começamos com a inflamação do tecido, aumentando as EROs, que podem ativar NF- κ B, estimulando a produção de mais citocinas inflamatórias. Essas citocinas promovem fosforilação inadequada dos receptores de insulina, instaurando a hiperglicemia que, entre outros, leva a ativação de NF- κ B, produzindo mais citocinas inflamatórias e iNOS e, conseqüentemente, NO, aumentando o estresse oxidativo.

2.2. FITOTERAPIA E COMPOSTOS FENÓLICOS

Fitoterápicos são produtos obtidos de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade terapêutica, podendo ser composto por ativo de apenas uma espécie vegetal ou por mais de uma espécie. Diferem das drogas vegetais, que são obtidas de plantas inteiras ou as partes, secas e utilizadas de maneira íntegra ou fragmentadas (BRASIL, 2021).

A fitoterapia utiliza plantas, como as ricas em compostos fenólicos, para auxiliar no tratamento de comorbidades ou como agentes promotores da saúde. O uso tradicional de fitoterápicos geralmente preserva a composição original e integridade da planta de origem (FALZON et al., 2017). Entre as formas farmacêuticas utilizadas estão os extratos padronizados, que são extratos ajustados a um conteúdo definido de um ou mais constituintes responsáveis pela atividade terapêutica (BRASIL, 2021).

Uma nutrição inadequada, seja por excesso ou por baixo consumo, está associada com o desenvolvimento de diversas doenças metabólicas. O consumo de determinados alimentos parece prevenir o desenvolvimento dessas (BRGLEZ MOJZER et al., 2016; KOCH, 2019). A ação preventiva pode ser pela presença de composto bioativos, como os compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides, principais ativos encontrados em fitoterápicos (FRAGA et al., 2019).

Os alcaloides são compostos de baixo peso molecular que contêm um ou mais átomos de nitrogênio. Para as plantas, atuam como defesa contra insetos, afetando o sistema nervoso destes. Para os humanos, os alcaloides são os responsáveis pela nicotina, cafeína, cocaína, opiáceos e anfetamina (KENNEDY, 2019).

Os terpenos são compostos formados por isopreno e são classificados de acordo com o número de isoprenos na estrutura. Possuem mais 35.000 compostos e são voláteis. São os responsáveis pelas emissões gasosas das plantas e uma minoria desenvolveu o uso destes para desempenhar função biológica. Representantes podem ser encontrados no alecrim, erva-cidreira, sálvia e hortelã-pimenta. Parecem ter atuação principal no sistema nervoso (KENNEDY, 2019). Os compostos fenólicos são uma das principais classes de ativos dos fitoterápicos e podem apresentar ações antioxidantes, anti-inflamatórios, anticâncer, anti-obesidade, anti-neurodegenerativo e de prevenção de doenças cardiovasculares em humanos (BRGLEZ MOJZER et al., 2016; KOCH, 2019), e se destacam, também, pela abundância em representantes e pela presença em diversos alimentos (KOCH, 2019).

Os compostos fenólicos possuem 8.000 estruturas atualmente conhecidas, sendo 500 destes presentes em alimentos vegetais e considerados polifenóis dietéticos. Os polifenóis são sintetizados a partir da combinação de derivados da fenilalanina e do ácido acético em duas vias bioquímicas, a do chiquimato e do acetato (KOCH, 2019). Nas plantas, eles oferecem proteção contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, raios ultravioleta, patógenos, parasitas e predadores. Além disso, também contribuem para as propriedades organolépticas (BRGLEZ MOJZER et al., 2016).

Os compostos fenólicos possuem diversos tipos e subtipos, mas todos possuem como característica comum a presença de um grupo fenólico, ou seja, pelo menos um anel aromático ligado a uma hidroxila, o que os confere capacidade antioxidante (KOCH, 2019). As principais classes dos polifenóis são os flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas e taninos. Os curcuminoides também merecem destaque (BRGLEZ MOJZER et al., 2016).

Os flavonoides são o grupo mais presente na dieta entre os polifenóis. Sua estrutura química é formada de um esqueleto de difenil propano, formando um esqueleto C6-C3-C6 (anel A, B e C), onde as subclasses diferem no estado de oxidação do anel central (KALILI et al., 2011). Exemplos mais comuns dessa classe são a quercetina, kaempferol, miricetina e hesperidina (KOCH, 2019).

Os ácidos fenólicos são o segundo maior grupo dos polifenóis, e ainda são os precursores de outro grupo, o dos taninos, estando presentes no espinafre, brócolis, couve, frutas vermelhas, café, chá, sucos cítricos e vinho. Acontecem como complexos covalentes insolúveis, ligados a polímeros de parede celular (BRGLEZ MOJZER et al., 2016). Possuem apenas um anel aromático e estão presentes em 30% dos compostos fenólicos encontrados na dieta (ZHANG et al., 2016). São divididos em dois grupos, os derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os primeiros são representados pelo ácido elágico e ácido gálico e estão presentes nos alimentos na forma de glicosídeos. Os derivados do ácido hidroxicinâmico são mais comuns, como o ácido cafeico, e estão presentes nos alimentos na forma de ésteres simples com ácido quínico ou glicose (SHAHIDI et al., 2015).

Os taninos são compostos de médio a alto peso molecular, formados por oligômeros e polímeros de outros polifenóis. São representados pela procianidinas B1 e elagitaninos (BRGLEZ MOJZER et al., 2016). São subdivididos em dois grupos principais: taninos hidrolisáveis, que possuem glicose ou poliol com ácido gálico ou ácido elágico, e taninos condensados (proantocianidinas), que são derivados de flavonoides (KALILI et al., 2011). Os taninos hidrolisáveis são hidrolisados por ácidos fracos e decompostos por altas temperaturas, enquanto os condensados não são prontamente hidrolisados. Estes são encontrados nos alimentos na forma de dímeros, trímeros, tetrâmeros e estruturas oligoméricas com vários graus de polimerização (SMERIGLIO et al., 2017).

Os estilbenos possuem o resveratrol como principal representante, encontrado em uvas e vinhos. Apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante e anticâncer, porém, são pouco biodisponíveis (SHAHIDI et al., 2015; BRGLEZ MOJZER et al., 2016). As lignanas são compostos que possuem uma estrutura 2,3- dibenzilbutano e o principal representante é o Secoisolariciresinol, encontrado na linhaça. Possuem alta atividade antioxidante (BRGLEZ

MOJZER et al., 2016). Os curcuminoides são representados pela curcumina, presente na cúrcuma e mostarda, e apresentam propriedade anti-inflamatória e antioxidante (BRGLEZ MOJZER et al., 2016).

2.2.1. Atividade antioxidante dos compostos fenólicos

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que atrase ou previna a oxidação de um substrato oxidável em concentrações baixas em relação a este (HALLIWELL et al., 1995). Os antioxidantes previnem doenças relacionadas ao estresse oxidativo, neutralizando efeitos de espécies reativas de oxigênio, conservando as funções celulares (NEHA et al., 2019).

Os antioxidantes de origem endógena, produzidos pelo organismo, podem ser enzimáticos, como a glutathione redutase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), ou não enzimáticos, como o ácido úrico, ácido lipoico, bilirrubina, glutathione e melatonina (MARITIM et al., 2003; NEHA et al., 2019). Os de origem exógena, como as vitaminas C e E, os carotenoides e compostos fenólicos, são adquiridos pela dieta (NEHA et al., 2019).

Os primeiros antioxidantes a serem estudados foram, justamente, o ácido ascórbico e o tocoferol. O ácido ascórbico precisa ser adquirido pela dieta e age como agente redutor, neutralizando espécies reativas como o peróxido de hidrogênio. O tocoferol, nome dado a vitamina E e todas as suas formas, por sua vez, age protegendo as membranas celulares contra espécies reativas produzidas durante a peroxidação lipídica (LOBO et al., 2010).

Os compostos fenólicos são amplamente estudados em relação às suas atividades antioxidantes. As vias de ação são diversas, como eliminação direta do ERO, inibição de enzimas e quelação de elementos traço que podem ser utilizados na geração de radicais livres e aumento da produção de antioxidantes endógenos (KOCH, 2019). Os polifenóis podem estar associados a glicosídeos, acilglicosídeos, ou agliconas, sendo mais absorvidos e melhores antioxidantes na terceira forma (ZHANG et al., 2016).

A produção de antioxidantes endógenos é estimulada, entre outras, pela via do Nrf2. Este, em condições normais, é inibido pela proteína Keap1 (do inglês - Kelch-like ECH-associated Protein 1) que o marca por ubiquitinação para que seja degradado por proteassoma, mantendo-o em níveis baixos (RUSKOVSKA et al., 2019).

Na presença de estresse oxidativo, como aumento de ERO, o Keap1 é oxidado, o que libera a translocação do Nrf2 para o núcleo, onde liga-se ao ARE (do inglês - Antioxidant

Response Element), iniciando a transcrição de genes envolvidos nas defesas antioxidantes, como os antioxidantes enzimáticos (ZHANG et al., 2016).

Alguns compostos fenólicos são capazes de oxidar o Keap1 e algumas proteínas quinases, como a proteína quinase C (PKC), parecem fosforilar o Nrf2, permitindo que ele se solte do Keap1 (RUSKOVSKA et al., 2019). Os polifenóis, principalmente flavonoides, como a quercetina, podem estimular a via do Nrf2 por interação com o receptor de hidrocarboneto de aril (AhR), ativando a via e conseqüentemente a produção de antioxidantes (ZHANG et al., 2016).

Os flavonoides inibem enzimas envolvidas na geração de ERO, como glutatona S-transferase e NOX, atuam como agente protetor de outros antioxidantes, como a vitamina C e E e eliminam radicais livres (KOCH, 2019). Os ácidos fenólicos possuem atividade antioxidante como queladores e eliminadores de radicais livres, com especial ação sob radical peróxil e hidroxil, ânion superóxido e peroxinitrito. Os taninos, por eliminação de radicais livres, quelação de metais, inibição de enzimas pró-oxidativas e peroxidação lipídica. As lignanas apresentam alta atividade antioxidante e inibem a peroxidação lipídica (BRGLEZ MOJZER et al., 2016).

Citando especificamente alguns compostos fenólicos, a quercetina possui forte capacidade de quelação de ferro e estabilização deste (KOCH, 2019) e consegue reduzir o estresse oxidativo gerado por peróxido de hidrogênio (BRGLEZ MOJZER et al., 2016). Epicatequina e rutina, também flavonoides, são eliminadores de ERO e da peroxidação lipídica (KOCH, 2019).

2.2.2. Atividade anti-inflamatória dos compostos fenólicos

Uma dieta rica em vegetais, legumes e frutas parece diminuir a inflamação observada na obesidade por serem alimentos ricos em compostos bioativos, como ácidos graxos poli-insaturados, fibras alimentares e compostos fenólicos (SIRIWARDHANA et al., 2013; WANG et al., 2014).

Os compostos fenólicos, principais ativos das plantas estudadas neste trabalho, apresentam atividade anti-inflamatória reduzindo os níveis de citocinas inflamatórias ou por aumento de citocinas anti-inflamatórias (SIRIWARDHANA et al., 2013; YAHFOUFI et al., 2018). Alguns compostos fenólicos possuem ação nas células imunes (YAHFOUFI et al., 2018) e, por fim, influenciam na inflamação pela atuação como antioxidante (ZHANG et al., 2016).

A atividade anti-inflamatória por ação na via do NF- κ B pode ser por inibição de IKK, não permitindo a translocação do fator, por bloqueio das subunidades p50 e p65 e impedindo ou dificultando a ligação do NF- κ B ao DNA. Os compostos fenólicos também podem atuar na modulação da via MAPK e seus dependentes (YAHFOUFI et al., 2018).

Os flavonoides atuam por inibição de proteínas, como a PKC, e do NF- κ B (MALEKI et al., 2019). A quercetina, além de forte atividade antioxidante, também possui ação anti-inflamatória. Se apresenta como forte supressor da transcrição de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), inclusive por inibição de NF- κ B. Promove inibição de óxido nítrico (NO) e expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) sem afetar a expressão do RNAm deste (BRGLEZ MOJZER et al., 2016). Sua ação no NF- κ B pode ser por impedir a translocação nuclear das subunidades p50 e p65 e por inibir a fosforilação do IKK, não permitindo a liberação do NF- κ B para o núcleo. Ainda parece estimular a produção de adiponectina e IL-10 (YAHFOUFI et al., 2018).

A curcumina, principal representante dos curcuminoides, reduz a expressão de TNF- α e IL-1, além de moléculas de adesão. Inibe NF- κ B e a expressão de TLR-4 (YAHFOUFI et al., 2018), além de MAPK (SIRIWARDHANA et al., 2013). Também parece ser capaz de inibir a migração de monócitos para o tecido adiposo inflamado, diminuindo, conseqüentemente, a produção de citocinas (WANG et al., 2014).

O ácido cafeico, dos ácidos fenólicos, foi capaz de suprimir a ativação de TLR-4 e NF- κ B em macrófagos estimulados com LPS. O epigallocatequina-3-galato (EGCG) diminui TNF- α e IL-6, inibe expressão de iNOS e produção de NO em macrófagos (YAHFOUFI et al., 2018). O resveratrol, um estilbeno, pode reduzir a expressão de TNF- α , IL-6, COX-2 e inibe a sinalização de NF- κ B (SAVINI et al., 2013; WANG et al., 2014). Pode, também, ativar a via AMPK, anti-inflamatória (WANG et al., 2014).

Por fim, as EROs podem causar lesão tecidual e iniciar um processo inflamatório ou, como já citado, ativarem a via NF- κ B, principal gerador de citocinas inflamatórias. Dessa forma, as ações antioxidantes clássicas dos polifenóis também influenciam no controle do processo inflamatório (YAHFOUFI et al., 2018).

2.3. FITOTERÁPICOS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO

2.3.1. *Cucurbita moschata*

Conhecida popularmente como abóbora, a *C.moschata* é rica em polissacarídeos, vitaminas e carotenos. As sementes eram utilizadas, inicialmente, para tratamento de infecções intestinais. Atualmente, a abóbora parece promover efeitos antidiabéticos, com redução da glicose sanguínea e aumento dos níveis séricos de insulina (HOSSAIN et al., 2018).

Um lignana (*Dehydrodiconiferyl alcohol*), quercetina e rutina, pertencentes aos flavonoides, foram isoladas de amostras de *C.moschata* (LEE et al., 2015; MEN et al., 2021), o que pode indicar efeitos positivos explanados sobre esses compostos fenólicos. Entretanto, os estudos são escassos. Utilizando a lignana isolada, a mesma foi capaz reduzir a produção de TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2 e ERRO *in vitro*, através da inibição de NF- κ B (LEE et al., 2015).

2.3.2. *Juniperus chinensis*

A *Juniperus chinensis* é uma árvore ornamental da família das Cupressaceae, nativa do noroeste da Ásia. Na medicina oriental, a *J.chinensis* é utilizada para tratamento da infecção urinária, urticária, disenteria, hemorragia, artrite reumática, problemas de pele, convulsões e hepatite, utilizando-se diferentes partes da planta. Os compostos fenólicos presentes na *J.chinensis* foram encontrados no cerne e incluem a quercetina, naringenina, taxifolina, aromadendrina e isoquercitrina, todos flavonoides (LIM et al., 2002; KIM et al., 2008).

A ação antioxidante da *J.chinensis* foi vista *in vitro*, porém em um único teste de captura de radical livre (LIM et al., 2002; DARWISH et al., 2019). Dessa forma, as informações sobre as atividades biológicas da *J.chinensis* são escassas, mas podem ser animadoras considerando que os isolados já realizados identificaram diversos flavonoides (LIM et al., 2002; KIM et al., 2008).

2.3.3. *Peucedanum ostruthium*

Conhecida como Imperatória, a *P.ostruthium* é comumente utilizada na Áustria e Itália para tratar problemas gastrointestinais, cardiovasculares e respiratórios. Pertence à família

Apiaceae e suas folhas, rizoma e raízes podem ser aproveitados (JOA et al., 2011; PALMIOLI et al., 2019). Estudos demonstrando efeitos benéficos da Imperatória para doenças como Alzheimer (PALMIOLI et al., 2019) e doenças cardiovasculares (JOA et al., 2011) já foram realizados.

Em um estudo que utilizou extratos etanólicos das folhas e das raízes, a *P.ostruthium* foi eficaz em inibir a via NF- κ B (VOGL et al., 2013). Os responsáveis por essa inibição foram identificados como diferentes cumarinas (ZWIRCHMAYR et al., 2020).

2.3.4. *Pinellia ternata* Breit.

Utilizada na medicina chinesa como antiemético, agente mucolítico e antiasmático, a *Pinellia ternata* Breit. também é conhecida pelo nome popular de *bàn xià*. Pertence à família Araceae e a parte utilizada, normalmente, é o rizoma (TANG et al., 1992; ROZEMA et al., 2012). Além das ações definidas pela medicina chinesa, seu uso tem sido estudado pelos efeitos anti-obesidade (KIM et al., 2006).

O extrato aquoso de *P.ternata* demonstrou resultados positivos em inibir o NF- κ B, demonstrando atividade anti-inflamatória (KIM et al., 2006; ROZEMA et al., 2012).

2.3.5. *Rubus chingii* Hu e *Rubus coreanus*

O *R.chingii* Hu é uma planta chinesa da família Rosaceae que produz frutos conhecidos no oriente como “Fu-pen-zi” e raspberry (HE et al., 2018). A fruta é a parte utilizada, normalmente, por apresentar ação anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora. Seu potencial antioxidante é bem explorado, onde o *R.chingii* Hu apresenta bons resultados devido à presença de ácidos fenólicos e flavonoides, como o ácido ent-16 α , 17-dihydroxy-kauran-19-oico (DHK), ácido tormêntico, ácido oleanólico, β -daucosterol, o ácido vanílico, tilirosídeo e kaempferol (DING, 2011; ZHANG et al., 2017; HE et al., 2018).

A *R.coreanus*, pertencente a mesma família, possui nome popular de Black raspberry e é tradicionalmente utilizada para impotência, espermatorreia, enurese, asma e doenças alérgicas. Estudo *in vitro* observou ação anti-inflamatória por redução de NO e PGE2 (YANG et al., 2008) e de NF- κ B (LEE et al., 2014).

2.3.6. *Solanum tuberosum*

As batatas, pertencentes à família Solanaceae, são ricas em antocianinas, especialmente as batatas de cor (LEE et al., 2016). A presença desses flavonoides indica que podem apresentar forte atividade antioxidante e anti-inflamatória. Estudo *in vitro* com três diferentes antocianinas encontradas na batata, reportam atividade antioxidante, inibição da produção de ERO e expressão de TNF- α , IL-6 e NF- κ B (LEE et al., 2017).

2.3.7. *Viola mandshurica*

A *Viola mandshurica* é uma planta perene da família Violaceae, encontrada na China, Coréia e Japão. É utilizada tradicionalmente como diurético, expectorante e anti-inflamatório para bronquite, eczema e erupções cutâneas. Além do uso tradicional, a *V.mandshurica* é potencialmente antidiabética, anti-asmática, antioxidante e neuroprotetora (SUNG et al., 2017).

Os estudos que avaliam as propriedades da *V.mandshurica* são escassos. Avaliando efeitos anti-inflamatórios em doença respiratória *in vivo*, a planta demonstrou redução dos níveis inflamatórios (LEE, et al., 2010). Um estudos realizado com a *Viola tricolor*, planta da mesma espécie, teve identificado diferentes flavonoides (VUKICS et al., 2008), o que pode indicar efeitos por esses compostos fenólicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Comparar a atividade antioxidante e anti-inflamatória de fitoterápicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter a caracterização do perfil cromatográfico de compostos fenólicos dos extratos das plantas *Curcubita moschata* (CMO e CMV), *Juniperus chinensis* (JC), *Peucedanum ostruthium* (PO), *Pinellia ternata* Breit. (PTO e PTV), *Rubus coreanus* (RC), *Rubus chingii* Hu (RCH), *Solanum tuberosum* (STV e ST), e *Viola mandshurica* (VM).
- Determinar a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos.
- Estudar o potencial anti-inflamatório dos extratos vegetais em cultura de células da linhagem RAW 264-7.

4. METODOLOGIA

4.1. Material

Os extratos secos padronizados de *Curcubita moschata*, *Juniperus chinensis*, *Peucedanum ostruthium*, *Pinellia ternata* Breit., *Rubus chingii* Hu, *Rubus coreanus*, *Solanum tuberosum* e *Viola mandshurica* foram obtidos e cedidos pela empresa Florien Fitoativos (Piracicaba, Brasil).

As células de macrófagos RAW 264.7 foram gentilmente cedidas pela professora Juliana Alves Macedo, da Universidade Estadual de Campinas. Os reagentes Folin-Ciocalteu, ácido gálico, Trolox, TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina), AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride), meio de cultura RPMI1640 1- (4,5- dimetiliazol- 2-il) - 3,5- difenilformazan (MTT) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St Louis, Mo). Lipopolissacarídeo (LPS) e soro fetal bovino da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Ma). Os Kits ELISA foram comprados da BD Biosciences Pharmingen (San Diego, Cal). Foram utilizados, também, reagentes de grau analítico.

4.2. Obtenção dos extratos aquosos

As oito espécies tiveram seus respectivos extratos secos padronizados denominados com siglas para facilitar a identificação. Para a espécie *Curcubita moschata*, avaliamos dois extratos de origem distintas, com a mesma padronização e siglas CMO e CMV. A espécie *Solanum tuberosum* também está representada por dois extratos, que são da mesma origem, mas com padronizações distintas e as siglas adotadas foram STV e ST. A espécie *Pinellia ternata* possui dois extratos de origem e padronização diferentes, sendo abreviadas para PTO e PTV. As demais espécies são representadas por apenas um extrato seco padronizado (Tabela 1).

Tabela 1 – Nome científico das espécies, sigla adotada para os extratos vegetais derivados, fabricante e padronização dos ativos

Nome científico	Sigla	Fabricante	Padronização dos ativos
<i>Curcubita moschata</i>	CMO	Organic Herb	10:01
<i>Curcubita moschata</i>	CMV	VNI	10:01
<i>Juniperus chinensis</i>	JC	Organic Herb	40% quercetina
<i>Peucedanum ostruthium</i>	PO	VNI	5% saponinas
<i>Pinellia ternata</i>	PTO	Organic Herb	15% taninos
<i>Pinellia ternata</i>	PTV	VNI	5% taninos 5% inosina
<i>Rubus coreanus</i>	RC	Organic Herb	5% ácido elágico
<i>Rubus chingii</i> Hu	RCH	VNI	5% ácido elágico
<i>Solanum tuberosum</i>	STV	VNI	5% flavonoides 5% saponinas
<i>Solanum tuberosum</i>	ST	VNI	5% flavonoides
<i>Viola mandshurica</i>	VM	VNI	5% saponinas

Fonte: elaborado pelo autor.

Foram obtidos extratos aquosos na concentração de 5 mg/mL para análises antioxidantes. Os extratos aquosos na concentração de 20 mg/mL foram utilizados para realização dos testes anti-inflamatórios e para cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. Os extratos secos padronizados foram diluídos em água, sendo 125 mg em 25 mL para a primeira concentração citada e 500 mg em 25 mL para a segunda concentração citada. Todos os extratos secos deram origem a três extratos aquosos. Por fim, foram agitados na incubadora shaker (Solab, Piracicaba, Brasil) por 30 min, a temperatura de 24°C e rotação de 9.000 x g.

Após os 30 min, os extratos foram filtrados em filtro de papel, em balão volumétrico de 25 mL. Ao final, o volume foi completado até 25 mL no balão volumétrico, acondicionado no tubo do tipo Falcon e armazenados a – 20 °C. Para a segunda concentração, de 20 mg/mL, os extratos também foram esterilizados por filtração em membrana (0,22µm; Millipore).

Todos os extratos aquosos foram produzidos no Laboratório Multiusuário BioNut, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Os extratos aquosos utilizados para a avaliação da atividade anti-inflamatória e para análise em cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa foram esterilizados no Laboratório de Imunoparasitologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

4.3. Caracterização do perfil de compostos fenólicos dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)

A análise cromatográfica foi realizada em um sistema quaternário equipado com injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) Shimadzu, LC-20A Prominence (Quioto, Japão), com objetivo de identificar picos cromatográficos. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna C18 de 4,6 x 250 mm, 5,0 μm . A velocidade do fluxo foi de 1 mL/min e o volume de injeção 50 μL . A fase móvel foi constituída pelo solvente A (Ácido Trifluoroacético - TFA 0,04% em água) e solvente B (TFA 0,03% em acetonitrila). A eluição foi realizada a 30 °C, com gradiente variando de 10% B aos 0 min, 40% B aos 30 min, 90% B aos 45 min, 10% B aos 55 min e 10% B aos 65 min. A detecção dos analitos foi realizada nos seguintes comprimentos de onda (λ) 280 nm, 320 nm, 350 nm e 360 nm. O anel aromático presente nos compostos fenólicos absorve a 280 nm, e compostos com presença de anéis B e C absorvem, também, nos outros comprimentos citados (LEI et al., 2019; NAM et al., 2015).

4.4. Determinação da Atividade Antioxidante

4.4.1. Teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu

O ensaio de teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu, se baseia na capacidade dos compostos em doar elétrons, em meio alcalino (MAGALHÃES et al., 2008). Entretanto, o reagente não é específico para compostos fenólicos, o que pode causar interferências caso a amostra em questão possua outros compostos com capacidade de redução, como ácido ascórbico, aminoácidos ou açúcares (MAGALHÃES et al., 2008; KUPINA et al., 2018). Dessa forma, consideramos que os resultados obtidos representam a capacidade redutora total dos extratos.

Este teste baseia-se na transferência de elétrons, em meio alcalino, do composto para o molibdênio, modificando a cor do reagente para azul, levando ao aumento da absorbância. Consiste em um teste não competitivo e não específico para compostos fenólicos, já que o molibdênio pode ser reduzido por outros compostos (MAGALHÃES et al., 2008). O teste foi realizado em triplicata para cada extrato aquoso. Em eppendorf, foi adicionado 450 μL de água destilada, 50 μL de cada extrato e 50 μL do reagente Folin Ciocalteu. Para a curva padrão de ácido gálico foram adicionados 450 μL de água destilada, 50 μL de cada padrão (50; 100; 200; 300; 400; 500 e 600 $\mu\text{g/mL}$) e 50 μL do reagente Folin Ciocalteu. A mistura foi agitada em vórtex e deixada em repouso por 5 min. Posteriormente, adicionou-se 500 μL de

carbonato de sódio 7% (Na_2CO_3) e 200 μL de água destilada. Respeitou-se repouso de 90 min no escuro. Foram transferidos 200 μL de cada eppendorf para uma microplaca e a leitura foi realizada a 765 nm no equipamento Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT). A equação da reta do padrão foi $y = 0,0017x - 0,0977$, com $R^2 = 0,966$. O teor de substâncias redutoras foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico EAG/g de amostra.

4.4.2. Poder antioxidante de redução do ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power) – FRAP

Este ensaio baseia-se no método de transferência de elétrons, testando a capacidade antioxidante de uma amostra através do poder de redução do Fe^{+3} (tripiridiltriazina -TPTZ) em Fe^{+2} , com aumento da absorbância. Consiste em um teste não competitivo e incapaz de identificar compostos que atuem por transferência de íons hidrogênio (MAGALHÃES et al., 2008). O teste foi realizado em triplicata para cada extrato aquoso. Para cada 30 mL de reagente FRAP, foi adicionado 2,5 mL de Solução de Cloreto férrico 20 mM (FeCl_3), 2,5 mL de solução de TPTZ 10 mM e 25 mL de tampão de acetato de sódio 0,3 M. Em ambiente escuro, foi transferido 30 μL de cada extrato no eppendorf, com acréscimo de 90 μL de água destilada e 900 μL do reagente FRAP. Para a curva padrão de Trolox, foi transferido 30 μL de cada padrão (100; 200; 400; 800; 1200 e 1600 μM) no eppendorf, com acréscimo de 90 μL de água destilada e 900 μL do reagente FRAP. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos e mantida em banho-maria a 37 °C, por 30 min. Na microplaca, foi pipetado 200 μL , realizando a leitura a 595 nm no equipamento Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT). A equação da reta do padrão foi $y = 0,0006x + 0,0716$, com $R^2 = 0,9987$. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de Trolox TE/g de amostra.

4.4.3. Determinação da Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio - ORAC

O ensaio de ORAC é baseado na transferência de íons hidrogênio, onde o mecanismo se relaciona com os mecanismos fisiológicos, sendo um teste competitivo. O antioxidante compete com um radical peroxil sob uma substância que simula uma biomolécula (MAGALHÃES *et al.*, 2008). O ensaio foi realizado seguindo a metodologia descrita por Dávalos et al., (2004). Para o ensaio, foram adicionados 20 μL de extrato, 120 μL de fluoresceína em tampão fosfato de potássio (pH 7,4) na concentração final de 0,378 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (preparada a partir de uma solução estoque de 3,87 mg/mL) e 60 μL de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido (AAPH) em tampão (concentração final de 108 mg/mL). Para

o branco, o extrato foi substituído por tampão fosfato de potássio. Como padrão foi utilizado Trolox em tampão fosfato de potássio (25; 50; 100; 300; 500; 700 μM). Após a adição de todos os reagentes na placa, foi feita a leitura da fluorescência, a cada 1 minuto, por 80 min. Foram utilizados os seguintes filtros de emissão 520 nm e excitação 485 nm. A temperatura do equipamento foi de 37 °C.

As leituras da fluorescência foram utilizadas no cálculo da AUC (sigla em inglês para área abaixo da curva), para as amostras, diferentes concentrações de Trolox e o branco de acordo com a equação 3. Os valores da AUC do padrão e das amostras foram subtraídos do valor de AUC do branco. A equação da reta do padrão foi $y = 0,0552x + 8,2236$, com $R^2 = 0,9667$. Os valores de AUC das amostras foram substituídos na equação da reta obtida pela curva padrão de Trolox e os valores expressos em μmol Trolox equivalente (TE)/ g de amostra.

$$\text{AUC} = 1 + f_2/f_1 + f_3/f_1 + f_4/f_1 + f_n/f_1$$

Onde:

f_1 = leitura da fluorescência no tempo 1

f_2 = leitura da fluorescência no tempo 2

f_n = leitura da fluorescência no tempo 80

4.5. Determinação da Atividade Anti-inflamatória

4.5.1. Cultura de células

Células de linhagem de macrófago de murino (RAW 264.7) foram utilizadas para realizar o ensaio de viabilidade e para avaliar a produção de mediadores inflamatórios. A linhagem foi cultivada em meio RPMI 1640 completo, suplementado com soro fetal bovino 10% e penicilina a 37°C em CO_2 5%.

4.5.2. Ensaio da viabilidade celular

As células RAW 264.7 foram semeadas em uma placa de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço e incubadas por 24 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e as células foram incubadas com os extratos aquosos das plantas (2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL), em meio RPMI completo e com 10 μL de ((3-[-4,5- dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium brometo) (MTT) (2,5 mg/mL) em solução salina tamponada com fosfato (PBS), permanecendo por 4 horas a 37 °C. Os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan formados pela redução de MTT foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi lida a 540

nm em leitor de placas SpectraMax 340PC (Marshall Scientific, Hampton, NH) (SILVA, 2016). A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao grupo de células não tratadas (100% de viabilidade), adotando 80% de viabilidade como ponto de corte.

4.5.3. Produção de mediadores inflamatórios

Os macrófagos foram semeados em uma placa de cultura de 24 poços, a uma densidade de 4×10^5 células/poço e incubadas por 24 horas a 37 °C. Após a remoção dos sobrenadantes, as células foram tratadas com os extratos aquosos, em concentração final de 1,5; 0,75 e 0,375 mg/mL e, após uma hora, adicionadas de LPS (1 µg/mL) para estimular a inflamação, e incubadas por 24 horas (SILVA, 2016). Para controle, as células foram cultivadas em meio de cultura, sem adição de extrato ou estímulo inflamatório; em meio de cultura com adição dos extratos aquosos (1,5; 0,75 e 0,375 mg/mL) e sem estímulo inflamatório; e em meio de cultura sem adição de extrato e com adição do estímulo inflamatório; além do grupo teste, com adição de extratos aquosos e estímulo inflamatório. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata. Os sobrenadantes foram removidos e armazenados a -80°C para posterior determinação de marcadores inflamatórios.

4.5.4. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada utilizando-se o reagente de Griess (sulfanilamida 1%, ácido fosfórico 2,5% e nafiletilediamina 0,1%) no sobrenadante das células. Em uma placa de 96 poços, acrescentou-se 50 µL do mesmo. Em seguida, acrescentou-se 50 µL do reagente. Foram realizadas duas leituras independentes, em quadruplicatas. A absorbância foi lida a 540 nm em leitor de placas SpectraMax 340PC (Marshall Scientific, Hampton, NH) (SILVA, 2016). A concentração de nitrito nas amostras foi determinada por comparação com uma curva padrão de nitrito de sódio (250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9 e 0 µM). A concentração da produção de NO foi calculada levando em consideração o controle de células RAW 264.7 não tratadas e estimuladas com LPS, de dois experimentos distintos.

4.5.5. Determinação de citocinas inflamatórias

Os níveis do fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucina-10 (IL-10) foram medidos com a utilização de kit ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) em

sobrenadantes de macrófagos estimulados por LPS e tratados com os extratos aquosos, de experimento único, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). A absorbância foi lida a 450 nm em leitor de placas SpectraMax 340PC (Marshall Scientific, Hampton, NH). A concentração da produção das citocinas foi calculada levando em consideração o controle de células RAW 264.7 não tratadas e estimuladas com LPS, de um único experimento.

4.6. Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa *Graphpad Prism 6* (GraphPad Software, San Diego, CA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino-Pearson e apresentaram distribuição normal. A diferença estatística foi determinada por oneway ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para comparação múltipla ou Bonferroni para comparação com controle. As variáveis foram descritas por média e desvio padrão. O valor de p foi fixado em 5% ($p < 0,05$), com o intuito de obter uma confiabilidade de 95% entre as comparações.

5.0. RESULTADOS

5.1. Caracterização do perfil de compostos fenólicos dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR)

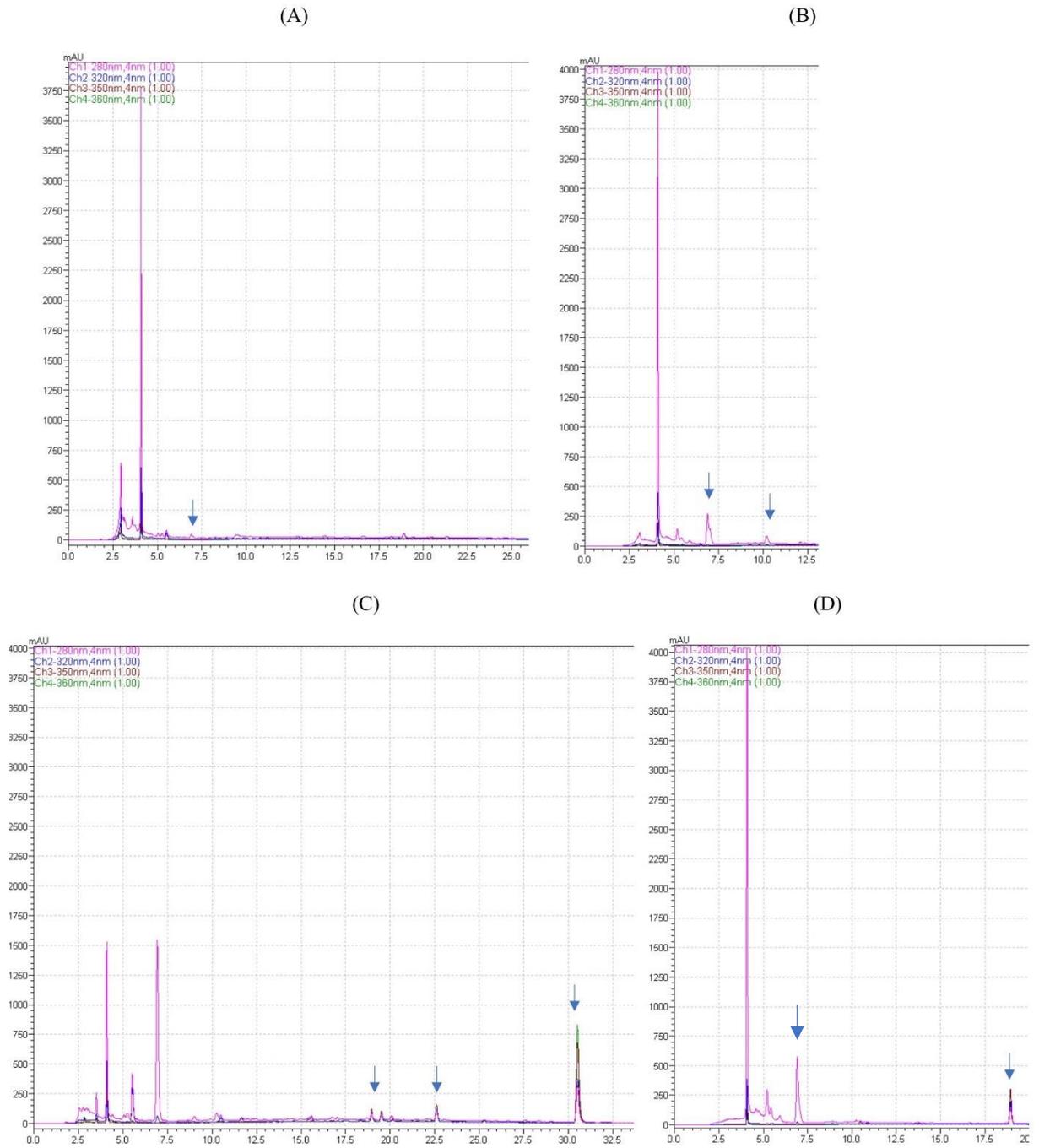
O perfil cromatográfico de CMO (Figura 1A) e CMV (Figura 1B) apresenta picos mais intensos a 280 nm, quando comparado aos outros comprimentos de onda, sugerindo que a principal classe de compostos ativos presentes nestes extratos é de natureza fenólica. O extrato ST (Figura 1J) também apresenta perfil cromatográfico semelhante. Ambos apresentam perfis cromatográficos com poucos picos e com áreas de pico reduzidas quando comparado as demais amostras.

O extrato JC (Figura 1C) apresenta perfil cromatográfico com picos predominantemente a 280 nm, com exceção de um pico no minuto 30, com leitura a 280, 320, 350 e 360 nm, o que sugere a presença de um composto fenólico de estrutura complexa. Perfil cromatográfico parecido é observado nos extratos PO (Figura 1D), STV (Figura 1I) e VM (Figura 1K).

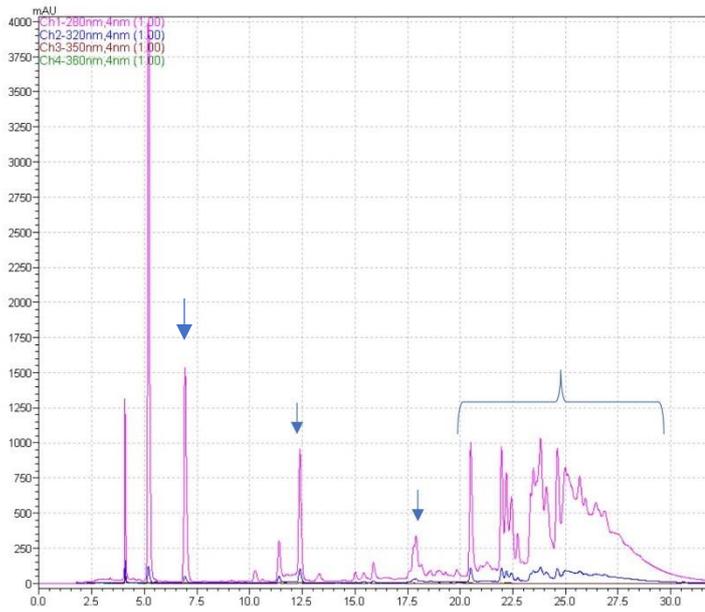
A presença de picos cromatográficos no início do tempo de retenção sugere a presença de compostos com baixo peso molecular e de menor hidrofobicidade, como ácidos fenólicos, enquanto picos cromatográficos aparecendo ao final sugere perfil de compostos com maior massa molecular e ou maior hidrofobicidade, como flavonoides e taninos.

Os extratos PTO (Figura 1E) e PTV (Figura 1F) apresentam perfil cromatográfico com picos predominantes a 280 nm e em diferentes tempos de retenção. Esse perfil sugere a presença de diferentes compostos fenólicos, com diferentes massas moleculares e hidrofobicidades. No comparativo dos dois perfis, é possível notar a presença de picos semelhantes e com mesmo tempo de retenção nos dois extratos, porém, a área de pico (mAU) do extrato PTO é maior quando comparado a PTV.

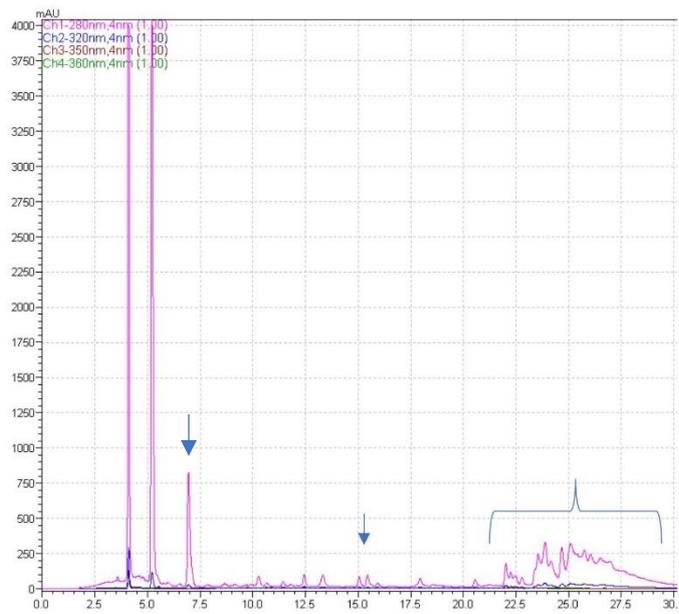
Os extratos RC (Figura 1G) e RCH (Figura 1H) apresentaram perfil cromatográfico com picos diversos ao longo do tempo de retenção, a 280 nm e 320 nm, o que sugere a presença de diferentes compostos fenólicos e estruturas. Pode-se notar que o extrato RC apresenta perfil com quantidade de picos maior quando comparado a RCH, o que indica maior variedade de compostos, enquanto RCH, por sua vez, apresenta picos com área superior aos vistos no perfil de RC, sugerindo a presença de compostos em quantidade maior.

Figura 1 - Perfis cromatográficos dos extratos vegetais

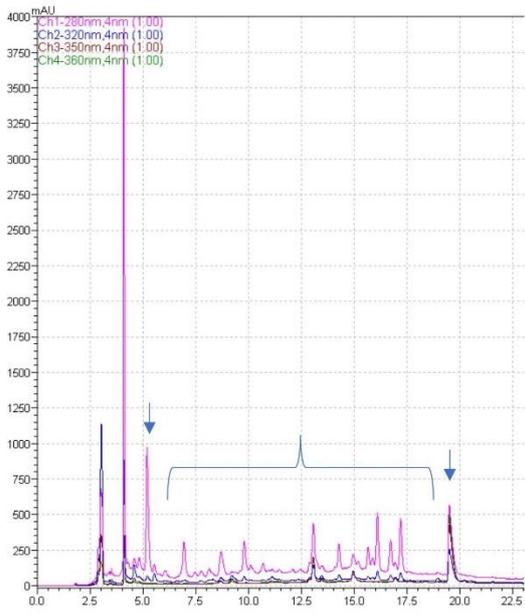
(E)



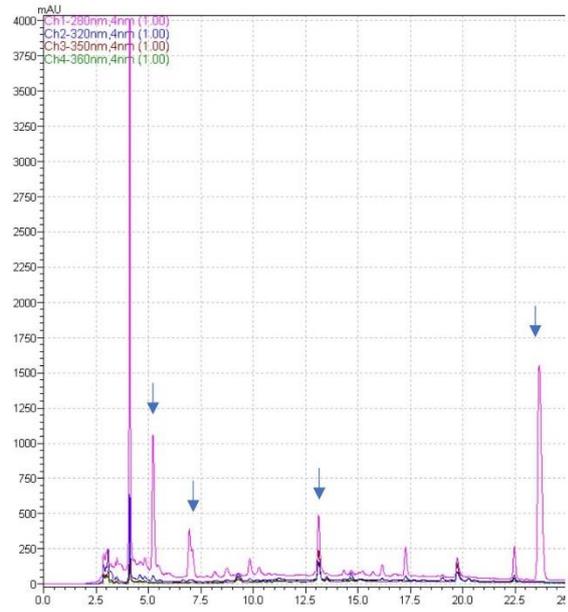
(F)



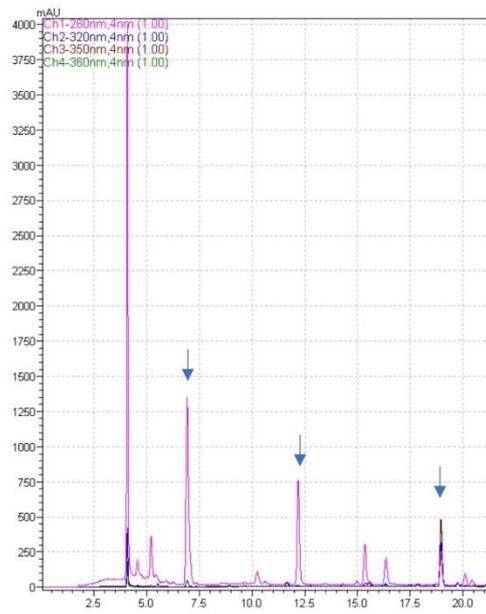
(G)



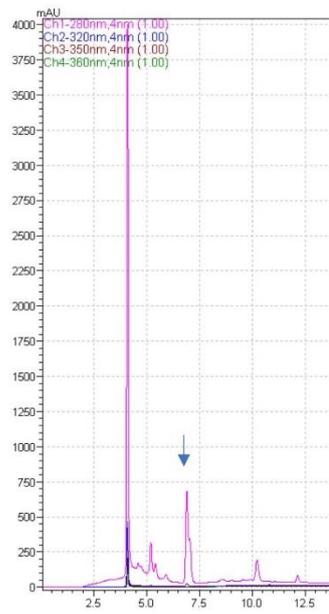
(H)

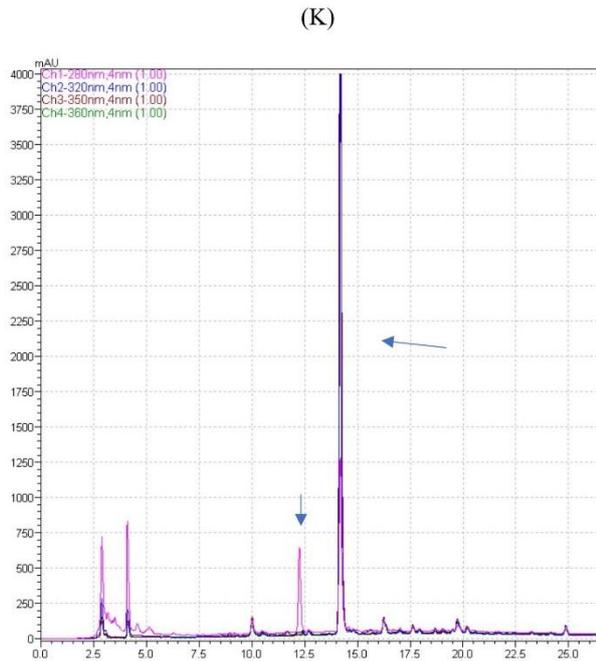


(I)



(J)





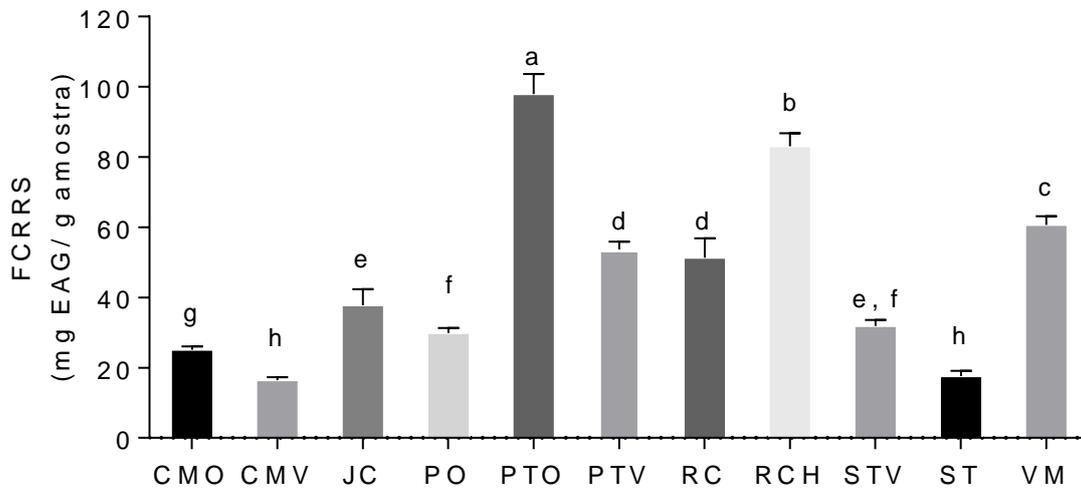
Os perfis cromatográficos dos extratos aquosos estão representados da seguinte maneira: (A) *Curcubita moschata* (CMO), (B) *Curcubita moschata* (CMV), (C) *Juniperus chinensis* (JC), (D) *Peucedanum ostruthium* (PO), (E) *Pinellia ternata* Breit (PTO), (F) *Pinellia ternata* Breit (PTV), (G) *Rubus coreanus* (RC), (H) *Rubus chingii* Hu (RCH), (I) *Solanum tuberosum* (STV), (J) *Solanum tuberosum* (ST) e (K) *Viola mandshurica* (VM). O eixo X indica o tempo de retenção do pico cromatográfico. O eixo Y indica a área de pico (mAU). As setas indicam os picos cromatográficos de maior intensidade em cada extrato aquoso. Fonte: elaborado pelo autor.

5.2. Atividade Antioxidante

5.2.1. Teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu

O extrato com maior capacidade redutora total (Figura 2) foi a PTO (97,90 mg EAG/g amostra), sendo diferente das demais, assim como RCH (83,03 mg EAG/g amostra), o segundo extrato com maior capacidade redutora total. São seguidos dos extratos VM (60,64 mg EAG/g amostra), PTV (53,67 mg EAG/g amostra) e RC (51,35 mg EAG/g amostra). Os extratos com menor teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu foram a CMV (16,48 mg EAG/g amostra) e ST (17,62 mg EAG/g amostra).

Considerando extratos da mesma espécie, a CMO apresentou capacidade redutora 34,47% maior que a CMV, de mesma padronização. O extrato STV apresentou capacidade 44,68% maior que a ST, assim como o extrato PTO, com valor 45,17% maior que a PTV, de padronização diferente. O extrato RCH, padronizado com o mesmo ácido fenólico da RC, apresentou capacidade redutora total 38,15% maior que este.

Figura 2 - Teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu

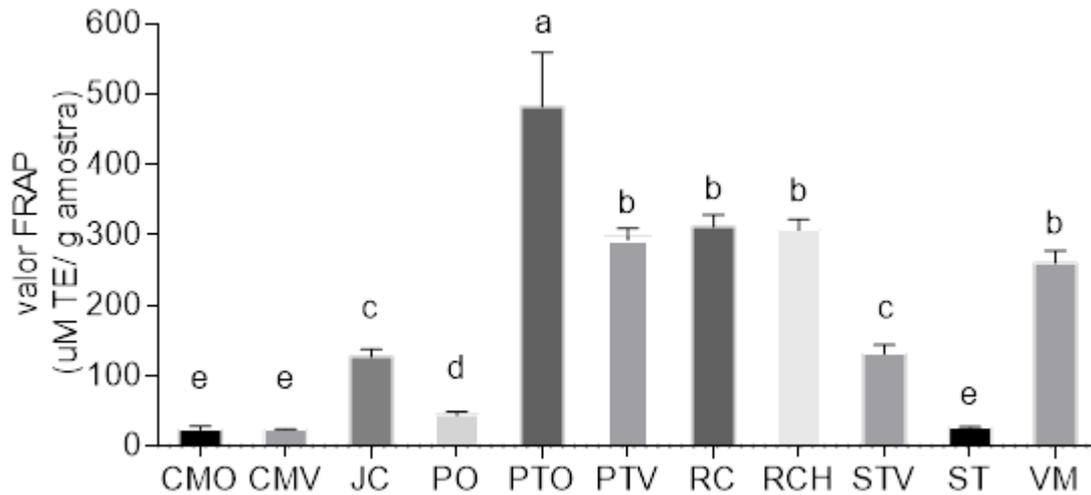
A diferença entre os extratos aquosos foi avaliada por one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão. A coluna do extrato aquoso representado pela letra 'a' apresenta o maior valor do experimento. As letras subsequentes representam uma ordem decrescente de valores (a – h). Colunas com letras distintas entre si representam diferenças entre os extratos aquosos representados. O eixo X indica a sigla dos extratos aquosos; o eixo Y indica os valores obtidos no experimento. **CMO e CMV** - *Curcubita moschata*; **JC** - *Juniperus chinensis*, **PO** - *Peucedanum ostruthium*, **PTO e PTV** - *Pinellia ternata* Breit., **RC** - *Rubus coreanus*, **RCH** - *Rubus chingii* Hu, **STV e ST** - *Solanum tuberosum*, **VM** - *Viola mandshurica*, **EAG** – equivalente de ácido gálico, **FCRS** - *Folin-Ciocalteu reacting substances*. Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.2. Poder antioxidante de redução do ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power) – FRAP

O método FRAP, assim como o Teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu, é baseado na transferência de elétrons, porém, o método FRAP é mais específico para compostos fenólicos quando comparado ao método do reagente Folin-Ciocalteu. Os extratos com maiores capacidades antioxidantes pelo método FRAP são as mesmas com maiores capacidades redutoras totais.

O extrato PTO apresentou a maior atividade antioxidante pelo método FRAP (482,18 μ M TE/g amostra), sendo diferente das demais. Os extratos RC (311,25 μ M TE/g amostra), RCH (307,10 μ M TE/g amostra), PTV (293,17 μ M TE/g amostra) e VM (260,20 μ M TE/g amostra) apresentaram a segunda maior atividade antioxidante, não diferindo entre si. Ainda, extratos diferentes da mesma espécie apresentaram atividade antioxidante semelhante, com exceção de STV e ST, com diferença de 80,7% nos valores.

Figura 3 - Atividade antioxidante por FRAP dos extratos aquosos

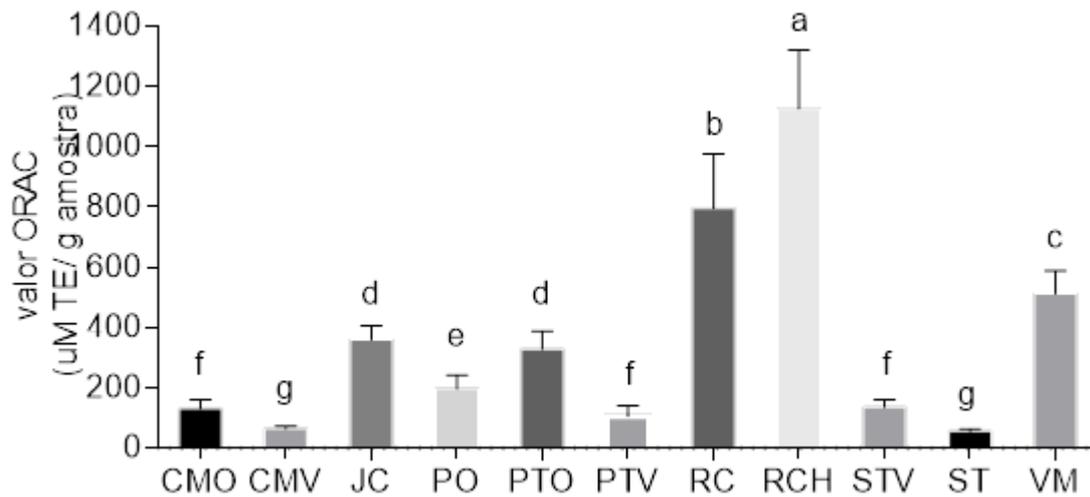


A diferença entre os extratos aquosos foi avaliada por one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão. A coluna do extrato aquoso representado pela letra 'a' apresenta o maior valor do experimento. As letras subsequentes representam uma ordem decrescente de valores (a - h). Colunas com letras distintas entre si representam diferenças entre os extratos aquosos representados. O eixo X indica a sigla dos extratos aquosos; o eixo Y indica os valores obtidos no experimento. **CMO e CMV** - *Curcubita moschata*; **JC** - *Juniperus chinensis*, **PO** - *Peucedanum ostruthium*, **PTO e PTV** - *Pinellia ternata* Breit., **RC** - *Rubus coreanus*, **RCH** - *Rubus chingii* Hu, **STV e ST** - *Solanum tuberosum*, **VM** - *Viola mandshurica*, **TE** - trolox equivalente. Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.3. Determinação da Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio - ORAC

Diferindo dos dois métodos anteriores, o ORAC é baseado na doação de íons H^+ . Os extratos RCH (1126,41 μM TE/g amostra), RC (794,68 μM TE/g amostra) e VM (511,27 μM TE/g amostra) apresentaram os maiores valores ORAC, também apresentando valores altos, quando comparado as demais, no método FRAP e na capacidade redutora total. Os extratos PTO e PTV, que apresentaram valores altos nos outros métodos, não tiveram o mesmo comportamento no ORAC.

Assim como no Teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu, os extratos da mesma espécie CMO e CMV, tiveram diferença de 50,93%; RCH e RC com diferença de 29,48%; PTO e PTV com diferença de 67,66%; STV e ST com diferença de 59,4%.

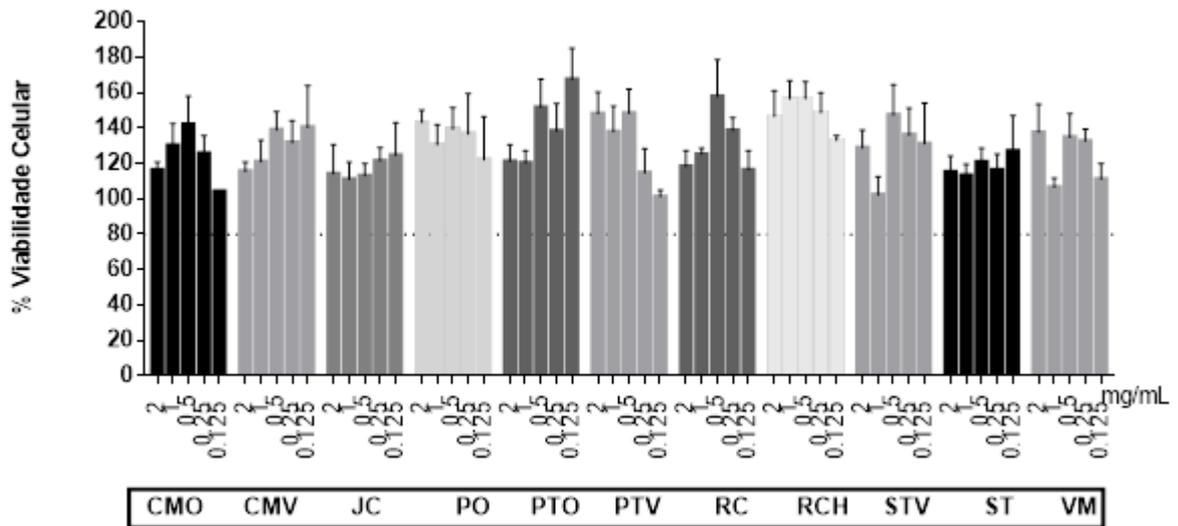
Figura 4 - Atividade antioxidante por ORAC dos extratos aquosos

A diferença entre os extratos aquosos foi avaliada por one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão. A coluna do extrato aquoso representado pela letra 'a' apresenta o maior valor do experimento. As letras subsequentes representam uma ordem decrescente de valores (a – h). Colunas com letras distintas entre si representam diferenças entre os extratos aquosos representados. O eixo X indica a sigla dos extratos aquosos; o eixo Y indica os valores obtidos no experimento. **CMO e CMV** - Curcubita moschata; **JC** - Juniperus chinensis, **PO** - Peucedanum ostruthium, **PTO e PTV** - Pinellia ternata Breit., **RC** - Rubus coreanus, **RCH** - Rubus chingii Hu, **STV e ST** - Solanum tuberosum, **VM** - Viola mandshurica, **TE** – trolox equivalente. Fonte: elaborado pelo autor.

5.3. Atividade Anti-inflamatória

Os extratos aquosos na concentração de 0,125 mg/mL a 2 mg/mL não tiveram efeitos citotóxicos nas células RAW 264.7. Assim, essas concentrações serviram como base para os ensaios celulares subsequentes, onde as concentrações finais nos poços foram de 1,5 mg/mL, 0,75 mg/mL e 0,375 mg/mL.

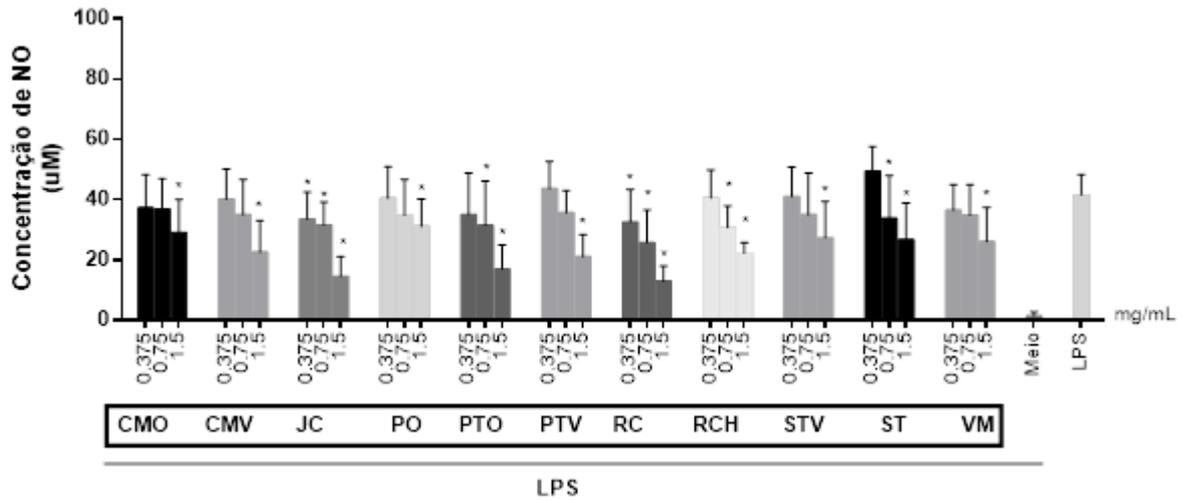
Figura 5 - Viabilidade celular de RAW 264.7 pelo reagente MTT



A porcentagem de células RAW 264.7 viáveis foi calculada em relação ao grupo de células não tratadas (100% de viabilidade), adotando 80% de viabilidade como ponto de corte. Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão. O eixo X indica as concentrações testadas dos extratos aquosos; o eixo Y indica a porcentagem da viabilidade celular. **CMO e CMV** - *Curcubita moschata*; **JC** - *Juniperus chinensis*, **PO** - *Peucedanum ostruthium*, **PTO e PTV** - *Pinellia ternata* Breit., **RC** - *Rubus coreanus*, **RCH** - *Rubus chingii* Hu, **STV e ST** - *Solanum tuberosum*, **VM** - *Viola mandshurica*. Fonte: elaborado pelo autor.

5.3.1. Produção de óxido nítrico (NO)

Todas as células tratadas com os extratos foram capazes de reduzir a produção do mediador inflamatório na maior concentração (1,5 mg/mL). Os extratos RC e JC foram capazes de reduzir em até 68,63% a capacidade de produção de NO pelas células RAW 264.7 inflamadas com LPS, valor duas vezes superior ao dos extratos CMO e PO, com menor redução (29,83% e 25,03%, respectivamente). Os extratos RC e JC reduziram a produção de NO em todas as concentrações de forma dose dependente, enquanto que os extratos ST, PTO e RCH reduziram nas concentrações de 1,5 mg/mL e 0,75 mg/mL e os extratos CMO, CMV, PO, STV, PTV e VM, reduziram somente na concentração mais elevada, de 1,5 mg/mL (Figura 6).

Figura 6 - Produção de NO em células RAW 264.7

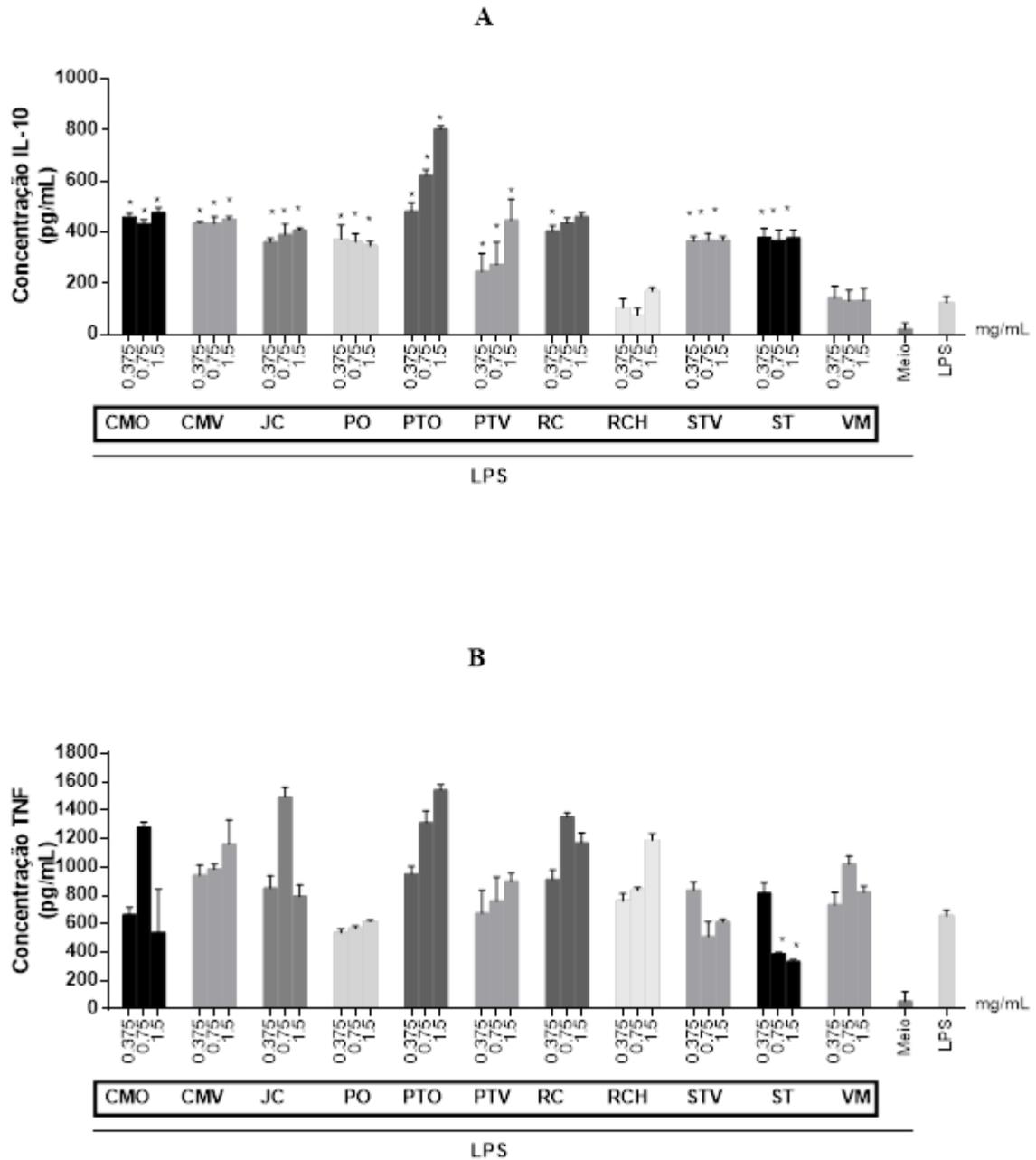
A diferença entre os extratos aquosos foi avaliada por one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*. Diferenças significativas foram consideradas $*p < 0,05$, em relação ao **LPS** (Controle). Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão. O eixo X indica as concentrações testadas dos extratos aquosos; o eixo Y indica a concentração de NO. **CMO e CMV** - *Curcubita moschata*; **JC** - *Juniperus chinensis*, **PO** - *Peucedanum ostruthium*, **PTO e PTV** - *Pinellia ternata* Breit., **RC** - *Rubus coreanus*, **RCH** - *Rubus chingii* Hu, **STV e ST** - *Solanum tuberosum*, **VM** - *Viola mandshurica*, **NO** – óxido nítrico, **LPS** - lipopolissacarídeo. Fonte: elaborado pelo autor.

5.3.2. Produção de interleucina-10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

Os efeitos dos extratos aquosos na produção de TNF- α e IL-10 foram avaliados em sobrenadante de células RAW 264.7 estimuladas por LPS. A Figura 7A mostra que todos os extratos aquosos, em todas as concentrações testadas, estimularam a produção de IL-10, com exceção dos extratos RCH e VM, que não estimularam a produção em nenhuma concentração utilizada. O extrato PTO apresentou o maior estímulo a produção de IL-10, aumentando em até 4x a produção desta citocina anti-inflamatória na menor concentração testada.

A Figura 7B apresenta os resultados em relação ao TNF- α . De maneira geral, com exceção do extrato ST, que reduziu o TNF- α de maneira dose dependente, nenhum extrato reduziu significativamente a produção de TNF- α .

Figura 7 - Produção de IL-10 e TNF- α em células RAW 264.7



A diferença entre os extratos aquosos foi avaliada por one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*. Diferenças significativas foram consideradas $*p < 0,05$, em relação ao **LPS** (Controle). Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão. O eixo X indica as concentrações testadas dos extratos aquosos; o eixo Y indica a concentração das citocinas. **(A)** Concentração IL-10. **(B)** Concentração TNF- α . **CMO e CMV** - *Curcubita moschata*; **JC** - *Juniperus chinensis*, **PO** - *Peucedanum ostruthium*, **PTO e PTV** - *Pinellia ternata* Breit., **RC** - *Rubus coreanus*, **RCH** - *Rubus chingii* Hu, **STV e ST** - *Solanum tuberosum*, **VM** - *Viola mandshurica*, **IL-10** – interleucina-10, **TNF- α** – fator de necrose tumoral alfa, **LPS** - lipopolissacarídeo. Fonte: elaborado pelo autor.

6.0. DISCUSSÃO

O teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu, método não específico para compostos fenólicos (MAGALHÃES et al., 2008; KUPINA et al., 2018), teve o extrato PTO (Figura 2) com a maior capacidade redutora total, sendo 45,17% maior que PTV, extrato derivado da mesma espécie que PTO. O perfil cromatográfico de PTO (Figura 1E) e PTV (Figura 1F), sugere a presença de compostos fenólicos de menor peso molecular e hidrofiliidade, com picos cromatográficos no início do tempo de retenção. Os taninos, por sua vez, padrão dos extratos PTO e PTV, são compostos fenólicos de médio e alto peso molecular resultantes da união entre outros polifenóis (BRGLEZ MOJZER et al., 2016), e parecem ser representados nos picos cromatográficos com tempos de retenção entre 22 e 28 min nos dois extratos. O extrato PTV está padronizada com 5% de taninos, ao contrário dos 15% da PTO, tendo picos menos intensos no tempo de retenção citado. Dessa forma, a diferença na quantidade do composto padronizado e no perfil cromatográfico dos dois extratos pode explicar o porquê a diferença na capacidade redutora total dos dois extratos (Figura 2).

O segundo extrato com maior capacidade redutora total, a RCH, extrato da planta *Rubus chingii* Hu, está padronizada com 5% de ácido elágico, assim como a RC, *Rubus coreanus*, planta da mesma família, e o quarto extrato com maior capacidade redutora total. Ambos extratos fazem parte da família das *berries*, frutas vermelhas ou negras, e são conhecidas por apresentarem, justamente, altos conteúdos de ácidos fenólicos (SHAHIDI et al., 2015).

O extrato RCH apresentou capacidade redutora total 38,15% maior que a RC (Figura 2). A diferença na capacidade redutora das amostras pode ser explicada pela presença de outros compostos fenólicos nos extratos, que atuam como antioxidantes preferencialmente por transferência de elétrons, além do ácido elágico. Inicialmente, os extratos RC (Figura 1G) e RCH (Figura 1H), apresentaram um pico cromatográfico semelhante com detecção a 280 nm, podendo ser correspondente ao ácido elágico. em questão pode ser o ácido elágico. Isto porque o ácido elágico pertence à família dos ácidos fenólicos, que são compostos de baixo peso molecular e mais polares em relação aos compostos fenólicos de outras classes, tendendo a eluir mais rapidamente, quando a fase móvel tem caráter mais hidrofílico (STALIKAS, 2010; LEI et al., 2019).

Além do ácido elágico, RCH possui no perfil cromatográfico um pico no minuto 23 que indica a presença de um composto majoritário, provavelmente, um flavonoide mais apolar. Por sua vez, RC apresenta no perfil cromatográfico diversos picos com detecção a 280 nm e 320 nm, podendo indicar a presença de diferentes ácidos fenólicos e flavonoides, com

diferentes polaridades e, conseqüentemente, diferentes atividades (LEI et al., 2019). Dessa forma, RCH apresenta menos picos cromatográficos quando comparado a RC, o que sugere menor variação de compostos. Entretanto, o pico apresentando no minuto 23 no perfil cromatográfico de RCH apresenta a maior área de pico visto entre os dois extratos, o que pode indicar que o composto em questão está presente em alta concentração e influenciou na diferença da capacidade redutora total dos extratos.

Além dos extratos já citados, que apresentaram os valores mais altos de capacidade redutora total, o extrato VM, derivada da planta *Viola mandshurica*, foi a terceira com maior capacidade redutora total. Padronizada com 5% de saponinas, um composto bioativo da família dos terpenos (KENNEDY, 2019), apresentou perfil cromatográfico (Figura 1K) com picos de pequena a média área quando comparados a um pico de alta intensidade no minuto 14, a 280 e 320 nm. A presença destes picos indica a presença de compostos fenólicos neste extrato, como flavonoides, devido a absorção nos comprimentos de onda citados. A capacidade redutora total do extrato pode ter sido influenciada também pelas saponinas, que parecem desempenhar atividade antioxidante (BISWAS et al., 2019), uma vez que o método antioxidante pelo reagente Folin-Ciocalteu não é específico para compostos fenólicos.

Os extratos PTO, RC, RCH, PTV e VM, em ordem decrescente, assim como no teor de substâncias redutoras totais do reagente Folin-Ciocalteu, obtiveram as maiores capacidades antioxidantes pelo método FRAP, sendo do extrato PTO o maior valor (Figura 3). Pelo método antioxidante ORAC, o extrato RCH apresentou o maior valor ORAC, seguido por RC e VM (Figura 4).

Os testes antioxidantes FRAP e ORAC podem ser utilizados em combinação para distinguir os mecanismos dos antioxidantes (SHAHIDI et al., 2015). Isto porque o ensaio de FRAP é um método não competitivo, não-radical, que mede a habilidade do antioxidante reduzir o íon ferro, por meio da transferência de elétrons, enquanto que o ORAC é um método competitivo, em que o antioxidante compete com o radical peroxil pelo substrato, doando um H⁺ para sua neutralização, simulando condições fisiológicas. Dessa forma, o ORAC mede a capacidade do antioxidante em quebrar a cadeia do radical.

Dessa forma, estes resultados sugerem que PTO e PTV possuem como mecanismo antioxidante preferencial a transferência de elétrons. Os taninos, compostos fenólicos presentes nos extratos, são capazes de eliminar radicais como hidroxil, superóxido e peroxil, embora não seja definido se por transferência de elétrons ou doação de H⁺. O mecanismo parece ser complexo, envolvendo uma etapa de eliminação rápida e lenta (SHAHIDI et al., 2015). Portanto, os taninos presentes nos dois extratos parecem atuar como antioxidantes por

transferência de elétrons, já que a atividade antioxidante de ambos foi bem desempenhada nos métodos desse tipo, enquanto no método baseado na doação de H^+ o desempenho não se manteve. Estudos que avaliaram a atividade antioxidante da espécie, fizeram com compostos isolados e indicam atividade antioxidante como visto no presente estudo (WU et al., 2015; LIU et al., 2017). Porém, não há como comparar os mecanismos, já que não houve avaliação do extrato de *P.ternata*.

Por outro lado, RCH, RC e VM desempenharam atividade antioxidante atuando pôr transferência de elétrons e doação de íons de H^+ . A atuação por meio de dois métodos que avaliam mecanismos distintos, somadas a possível presença de diferentes compostos como sugerido pelos picos pertencentes ao perfil cromatográfico desses extratos (Figura 1G, 1H e 1K), indica que os extratos RCH, RC e VM possuem compostos fenólicos diversos com mecanismos antioxidantes distintos.

Os extratos RC e RCH são padronizados com ácido elágico, pertencente a uma família de compostos fenólicos que parecem atuar, predominantemente, como antioxidantes eliminando radicais por meio da doação de átomos de hidrogênio (SHAHIDI et al., 2015). Além do ácido elágico, o perfil cromatográfico de ambos sugere a presença de flavonoides, assim como no extrato VM, o que pode explicar a atuação antioxidante por mecanismos diferentes.

A presença de flavonoides pode influenciar nos valores FRAP e ORAC, pois, devido as variações estruturais dos diversos subtipos desse grupo, com vários níveis de hidroxilação e metoxilação, estes podem apresentar mecanismos distintos. Essas diferenças estruturais afetam a capacidade antioxidante, que depende do potencial quelante de metal, que está associado as posições das hidroxilas; a presença de doadores de hidrogênio e elétron capazes de reduzir radicais; e a capacidade do flavonoide em deslocar o elétron desemparelhado. Por isso, podem apresentar atividade antioxidante por prevenção ou quebrando a cadeia do radical (PISOSCHI et al., 2015; SHAHIDI et al., 2015).

Para avaliação da atividade anti-inflamatória, os efeitos dos extratos aquosos na produção do óxido nítrico e das citocinas inflamatórias foram induzidos, de maneira satisfatória, por LPS em células RAW 264.7. LPS é uma endotoxina encontrada na membrana de bactérias Gram negativa, capaz de estimular o receptor Toll-like (TLR-4), que promove a ativação do NF- κ B, resultando no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (MARIMOUTOU et al., 2015).

Estimulado pelo LPS, o NF- κ B transloca-se até o núcleo do macrófago e ativa a transcrição de diversos genes envolvidos na resposta inflamatória, como o da óxido nítrico

sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de NO, e de citocinas inflamatórias, como o TNF- α (MANNA et al., 2015; JAIS et al., 2017).

Em relação ao óxido nítrico, todos os extratos foram capazes de reduzir a produção de NO (Figura 6) na maior concentração testada, além de grande parte ter estimulado a produção de IL-10 (Figura 7A) em todas as concentrações estudadas. Os resultados obtidos em relação ao TNF- α , por sua vez, não apresentaram a mesma tendência de inibição na produção vista para o NO (Figura 7B).

A atividade anti-inflamatória ocorre por inibição de citocinas inflamatórias, indiretamente pela inibição de ERO, que ativam NF- κ B, ou por estimulação de citocinas anti-inflamatórias (YAHFOUFI et al., 2018). O estímulo à produção de citocina anti-inflamatória por todos os extratos, em todas as concentrações estudadas, com exceção de RCH e VM, somada à redução de NO, indica a atuação dos extratos estudados como anti-inflamatórios através dos seus ativos, os compostos fenólicos.

Os extratos RC e JC reduziram a produção de NO de maneira dose dependente (Figura 6). O extrato RC, padronizada com ácido elágico e composta, provavelmente, de vários outros ácidos fenólicos e flavonoides, como sugere o perfil cromatográfico (Figura 1G), produziu a maior redução de NO. Os flavonoides atuam como anti-inflamatórios através da regulação de I κ B e NF- κ B, com impacto na ativação dos mesmos e consequente transcrição de citocinas (MALEKI et al., 2019). O ácido elágico, o composto ativo padronizado no extrato, também pode ter atuado na redução de NO, assim como visto em atuação de maneira isolada (BENSAAD et al., 2017). Utilizando extratos da espécie, *R. coreanus*, um estudo avaliou o potencial anti-inflamatório e também observou redução de NO, além de inibição de NF- κ B (SEO et al., 2019).

O extrato RC também foi um dos extratos com maior valor no teste antioxidante ORAC, demonstrando alta capacidade antioxidante por eliminação de radicais livres. Além do LPS, o NF- κ B, ainda, pode ser estimulado por ERO (RANI et al., 2016). Desse modo, a atividade de eliminação de ERO pelo extrato RC pode diminuir a ativação de NF- κ B e, consequentemente, das citocinas inflamatórias.

O extrato JC, segundo extrato com maiores reduções de NO, está padronizada com quercetina, flavonoide amplamente distribuída na dieta, com diversas funções biológicas. Em sua estrutura há dois anéis benzênicos ligados a uma cadeia central de três carbonos e diversos grupos hidroxila. Tanto a atividade antioxidante quanto a inflamatória parecem estar ligadas a hidroxila presente no anel B, com par de elétrons (TANG et al., 2019). Diversos estudos demonstram a capacidade da quercetina em suprimir o NF- κ B, com bloqueio na translocação

das subunidades, o que afeta diretamente a produção de citocinas pró-inflamatórias e precursores, como iNOS e, conseqüentemente, NO (YAHFOUFI et al., 2018; TANG et al., 2019). Os estudos relacionados a *J. chinensis* são escassos, sendo observado atividade anti-inflamatória da espécie em um estudo com metodologias que diferem das utilizadas no presente estudo (DARWISH et al., 2020).

Os extratos PTO e PTV, derivados da mesma espécie, apresentaram resultados de forma dose-dependente na produção de IL-10. O extrato PTO, na menor concentração, de 0,375 mg/mL, foi o maior valor entre os extratos, sendo menor apenas que as concentrações mais elevadas da própria PTO (Figura 7A). As respostas de maneira dose dependente são importantes para a menor utilização de extrato com preservação da atividade. Estes resultados sugerem que o mecanismo anti-inflamatório preferencial dos extratos é por meio do estímulo a citocinas anti-inflamatórias. Como os dois extratos são derivados da mesma espécie e estão padronizadas com taninos, sugere-se que a ação seja gerada por estes. Os achados na literatura apresentam resultados positivos em relação a atividade anti-inflamatória de taninos isolados (BENSAAD et al., 2017) ou de outras espécies que contenham taninos na composição (XIAO et al., 2017), entretanto, em relação a *P. ternata*, os estudos que avaliam atividade anti-inflamatória são escassos (MAO et al., 2020).

Os extratos VM e RCH não estimularam a produção de IL-10 em nenhuma concentração estudada. Em relação ao extrato VM, padronizado com saponinas, a capacidade anti-inflamatória foi observada anteriormente em um estudo, porém, em modelo de doença respiratória e avaliação de citocinas não avaliadas no presente estudo (LEE et al., 2010). Saponinas presentes na soja apresentaram poder de inibição de NO por meio da inibição de NF- κ B em macrófagos RAW 264.7 (ZHA et al., 2011). Portanto, o resultado obtido no presente estudo sugere que a *V. mandshurica* contém compostos bioativos que atuam como anti-inflamatórias por inibição citocina inflamatória, e não por estimular produção citocina anti-inflamatória. O extrato RCH, derivada da espécie *Rubus chingii* Hu, em outro estudo, que isolou diversos componentes presentes e os avaliou, obteve resultados condizentes com o do presente estudo em relação a NO e, ainda, sugere a ação de um composto encontrado por modulação da via MAPK, proteína quinase atividade por mitógenos (ZHANG et al., 2015b, 2015a). Estes estudos não avaliam a produção de IL-10, o que impede a comparação de dados, dessa forma, outros mecanismos precisam ser avaliados para indicar que as espécies que derivam os extratos VM e RCH não possuem ação anti-inflamatória por estímulo à produção de citocina anti-inflamatória.

Os resultados encontrados para a atividade anti-inflamatória das espécies avaliadas reforçam a independência dos composto fenólicos em relação a suas funções biológicas, não atuando como anti-inflamatórios apenas por sua atividade antioxidante, mas por regulação de vias e citocinas envolvidas na inflamação (HUSSAIN et al., 2016).

Apesar dos resultados encontrados para os extratos aqui estudadas, estudos *in vitro* apresentam limitações e polifenóis podem sofrer algumas modificações químicas durante a digestão e absorção, o que alteraria os resultados em modelo *in vivo* (BOUAYED et al., 2011). Outro ponto é a falta de identificação precisa do composto fenólico majoritário o que impossibilita uma discussão mais rica. Além disso, mais estudos são necessários para indicar os mecanismos de ação dos efeitos encontrados, assim como identificar se os achados são relevantes para a saúde humana. Por fim, considerando que o método antioxidante ORAC é o que mais se assemelha às condições fisiológicas, a redução de NO e o estímulo à produção de IL-10, o extrato que uniu os dois efeitos aqui estudados foi o extrato de *Rubus coreanus*.

7.0. CONCLUSÃO

Os extratos com maior teor de compostos redutores pelo reagente de Folin-Ciocalteu foram a PTO, RCH, VM, PTV e RC, assim como foram, também, os extratos com maior atividade antioxidante pelo método FRAP. Pelo método ORAC, o extrato RCH apresentou o maior valor ORAC, seguida pela RC. Esses extratos, entre as estudadas, a presença de diferentes compostos, em diferentes intensidades, o que indica atividade antioxidante *in vitro* por mecanismos distintos. Todos os extratos apresentaram atividade anti-inflamatória em cultura de células RAW 264.7, reforçando que esta capacidade não necessariamente é consequência da capacidade antioxidante.

Nossos resultados indicam que os fitoterápicos em questão apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória, em especial o extrato de *Rubus coreanus*, pois, considerando que o método ORAC é o que mais se assemelha às condições fisiológicas, a redução de NO e o estímulo à produção de IL-10, o extrato em questão uniu os dois efeitos aqui objetivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMCZAK, Marcin; WIECEK, Andrzej. The Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **Seminars in Nephrology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 2–13, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2012.12.008>
- BARAZZONI, Rocco *et al.* Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. **Eating and weight disorders : EWD**, Germany, v. 23, n. 2, p. 149–157, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40519-018-0481-6>
- BENSAAD, Lamees A *et al.* Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from Punica granatum. **BMC complementary and alternative medicine**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 47, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1555-0>
- BISWAS, Tanya; DWIVEDI, Upendra N. Plant triterpenoid saponins: biosynthesis, in vitro production, and pharmacological relevance. **Protoplasma**, Austria, v. 256, n. 6, p. 1463–1486, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01411-0>
- BOUAYED, Jaouad; HOFFMANN, Lucien; BOHN, Torsten. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 128, n. 1, p. 14–21, 2011. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.052>
- BRASIL. **VIGITEL Brasil**. Brasília: [s. n.], 2019.
- BRGLEZ MOJZER, Eva *et al.* Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 901, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
- CAMILLERI, Michael. Peripheral mechanisms in appetite regulation. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 148, n. 6, p. 1219–1233, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.016>
- COELHO, Marisa; OLIVEIRA, Teresa; FERNANDES, Ruben. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives of medical science : AMS**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 191–200, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5114/aoms.2013.33181>
- DARWISH, Reham S *et al.* Efficacy-directed discrimination of the essential oils of three Juniperus species based on their in-vitro antimicrobial and anti-inflammatory activities. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 259, p. 112971, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112971>
- DARWISH, Reham S *et al.* Peroxidase inhibitory and antioxidant constituents from Juniperus L. species guided by HPTLC-bioautography and molecular docking studies. **Natural product research**, England, p. 1–5, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1700249>
- DÁVALOS, Alberto; GÓMEZ-CORDOVÉS, Carmen; BARTOLOMÉ, Begoña. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC–Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 48–54, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
- DING, Hsiou-Yu. Extracts and constituents of Rubus chingii with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 3941–3949, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms12063941>
- FALZON, Charles C; BALABANOVA, Anna. Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. **Primary care**, United States, v. 44, n. 2, p. 217–227, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.02.001>
- FRAGA, César G *et al.* The effects of polyphenols and other bioactives on human

health. **Food & function**, England, v. 10, n. 2, p. 514–528, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>

GHABEN, Alexandra L; SCHERER, Philipp E. Adipogenesis and metabolic health. **Nature reviews. Molecular cell biology**, England, v. 20, n. 4, p. 242–258, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>

GONZÁLEZ-MUNIESA, Pedro *et al.* Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 3, p. 17034, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>

HALLIWELL, B *et al.* The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 601–617, 1995. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00024-V](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00024-V)

HE, Fangting *et al.* Multi-technical analysis on the antioxidative capacity and total phenol contents of 94 traditional Chinese dietary medicinal herbs. **Food science & nutrition**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 1358–1369, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fsn3.689>

HOSSAIN, Md Akil *et al.* Enhancement of Lipid Metabolism and Hepatic Stability in Fat-Induced Obese Mice by Fermented Cucurbita moschata Extract. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, [s. l.], v. 2018, p. 3908453, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/3908453>

HUSSAIN, Tarique *et al.* Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? **Oxidative medicine and cellular longevity**, [s. l.], v. 2016, p. 7432797, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>

JAIS, Alexander; BRÜNING, Jens C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 127, n. 1, p. 24–32, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI88878>

JOA, Helge *et al.* Identification of ostruthin from Peucedanum ostruthium rhizomes as an inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. **Journal of natural products**, [s. l.], v. 74, n. 6, p. 1513–1516, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np200072a>

KALILI, Kathithileni M; DE VILLIERS, André. Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. **Journal of separation science**, Germany, v. 34, n. 8, p. 854–876, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jssc.201000811>

KALUPAHANA, Nishan S; MOUSTAID-MOUSSA, Naima; CLAYCOMBE, Kate J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 26–34, 2012. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.011>

KENNEDY, David O. Phytochemicals for Improving Aspects of Cognitive Function and Psychological State Potentially Relevant to Sports Performance. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, [s. l.], v. 49, n. Suppl 1, p. 39–58, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40279-018-1007-0>

KIM, Seung-Jin *et al.* Anti-obesity Effects of *Juniperus chinensis* Extract Are Associated with Increased AMP-Activated Protein Kinase Expression and Phosphorylation in the Visceral Adipose Tissue of Rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 1415–1421, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.31.1415>

KIM, Yoo-Jeong *et al.* Anti-obesity Effect of *Pinellia ternata* Extract in Zucker Rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 1278–1281, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1278>

KOCH, Wojciech. Dietary Polyphenols-Important Non-Nutrients in the Prevention of Chronic Noncommunicable Diseases. A Systematic Review. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1039, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11051039>

KUPINA, Steve *et al.* Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13. **Journal of AOAC International**, England, v. 101, n. 5, p. 1466–1472, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18->

0031

LE THUC, Ophélie *et al.* Hypothalamic Inflammation and Energy Balance Disruptions: Spotlight on Chemokines. **Frontiers in endocrinology**, [s. l.], v. 8, p. 197, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00197>

LEE, Hwi-Ho *et al.* p-Coumaroyl Anthocyanin Mixture Isolated from Tuber Epidermis of *Solanum tuberosum* Attenuates Reactive Oxygen Species and Pro-inflammatory Mediators by Suppressing NF- κ B and STAT1/3 Signaling in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages. **Biological & pharmaceutical bulletin**, Japan, v. 40, n. 11, p. 1894–1902, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00362>

LEE, Junghun; CHOI, Jinyong; KIM, Sunyoung. Effective suppression of pro-inflammatory molecules by DHCA via IKK-NF- κ B pathway, in vitro and in vivo. **British journal of pharmacology**, [s. l.], v. 172, n. 13, p. 3353–3369, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.13137>

LEE, Jung Eun *et al.* Anti-inflammatory effects of *Rubus coreanus* Miquel through inhibition of NF- κ B and MAP Kinase. **Nutrition research and practice**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 501–508, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4162/nrp.2014.8.5.501>

LEE, Mee-Young *et al.* Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of *Viola mandshurica* W. Becker (VM) ethanolic (EtOH) extract on airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 127, n. 1, p. 159–164, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.033>

LEE, Sang Hoon *et al.* Antioxidant Contents and Antioxidant Activities of White and Colored Potatoes (*Solanum tuberosum* L.). **Preventive nutrition and food science**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 110–116, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.2.110>

LEFRANC, Clara *et al.* Mitochondrial oxidative stress in obesity: role of the mineralocorticoid receptor. **The Journal of endocrinology**, England, v. 238, n. 3, p. R143–R159, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0163>

LEI, Zhentian *et al.* UHPLC-MS Analyses of Plant Flavonoids. **Current protocols in plant biology**, United States, v. 4, n. 1, p. e20085, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cppb.20085>

LIM, Jong Pil *et al.* Free radical scavengers from the heartwood of *Juniperus chinensis*. **Archives of Pharmacal Research**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 449–452, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02976600>

LIU, Yu-Jie *et al.* Extraction Optimization, Characterization, and Bioactivities of Polysaccharides from *Pinelliae Rhizoma Praeparatum Cum Alumine* Employing Ultrasound-Assisted Extraction. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 965, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules22060965>

LOBO, V *et al.* Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

MAGALHÃES, Luís M *et al.* Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 613, n. 1, p. 1–19, 2008. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047>

MALEKI, Soheila J; CRESPO, Jesus F; CABANILLAS, Beatriz. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food chemistry**, England, v. 299, p. 125124, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>

MANNA, Prasenjit; JAIN, Sushil K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. **Metabolic syndrome and related disorders**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 423–444, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/met.2015.0095>

MAO, Renjun; HE, Zhigui. *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit: A review of its

germplasm resources, genetic diversity and active components. **Journal of ethnopharmacology**, Ireland, v. 263, p. 113252, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113252>

MARIMOUTOU, Méry *et al.* Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1 preadipocytes against H₂O₂, TNF α and LPS inflammatory mediators by regulating the expression of superoxide dismut. **Journal of inflammation (London, England)**, [s. l.], v. 12, p. 10, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0055-6>

MARITIM, A C; SANDERS, R A; WATKINS III, J B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 24–38, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbt.10058>

MEN, Xiao *et al.* Physicochemical, nutritional and functional properties of *Cucurbita moschata*. **Food science and biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 171–183, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00835-2>

NAM, Tae-Gyu *et al.* Flavonoid analysis of buckwheat sprouts. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 170, p. 97–101, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.067>

NEHA, Kumari *et al.* Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 178, p. 687–704, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>

OUSSAADA, Sabrina M *et al.* The pathogenesis of obesity. **Metabolism - Clinical and Experimental**, [s. l.], v. 92, p. 26–36, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.12.012>

PALMIOLI, Alessandro *et al.* bioNMR-based identification of natural anti-A β compounds in *Peucedanum ostruthium*. **Bioorganic Chemistry**, [s. l.], v. 83, p. 76–86, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.016>

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, France, v. 97, p. 55–74, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

RANI, Vibha *et al.* Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life sciences**, Netherlands, v. 148, p. 183–193, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002>

RIGOLET, Michel; YOBOUE, Edgar D; DEVIN, Anne. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H₂O₂ signaling. **Antioxidants & redox signaling**, United States, v. 14, n. 3, p. 459–468, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3363>

ROZEMA, E *et al.* Selected Extracts of Chinese Herbal Medicines: Their Effect on NF- κ B, PPAR α and PPAR γ and the Respective Bioactive Compounds. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, [s. l.], v. 2012, p. 983023, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/983023>

RUSKOVSKA, T; MAKSIMOVA, V; MILENKOVIC, D. Polyphenols in human nutrition: from the in vitro antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability – an overview and perspective. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], p. 1–36, 2019. Disponível em: <https://doi.org/DOI:10.1017/S0007114519002733>

SAVINI, Isabella *et al.* Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 10497–10538, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms140510497>

SEO, Kyung Hye *et al.* Differences in anti-inflammatory effect of immature and mature of *Rubus coreanus* fruits on LPS-induced RAW 264.7 macrophages via NF- κ B signal

pathways. **BMC complementary and alternative medicine**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 89, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2496-6>

SHAHIDI, Fereidoon; AMBIGAIPALAN, Priyatharini. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 18, p. 820–897, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>

SHAHIDI, Fereidoon; ZHONG, Ying. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 18, p. 757–781, 2015. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>

SILVA, Fernanda Guimarães Drummond. **Capacidade antioxidante de hidrolisados proteicos e compostos fenólicos da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e moduladora da atividade inflamatória em modelo experimental de colite**. 165 f. 2016. - Universidade Estadual de Campinas, [s. l.], 2016.

SIRIWARDHANA, Nalin *et al.* Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 613–623, 2013. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.12.013>

SMERIGLIO, Antonella *et al.* Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British journal of pharmacology**, [s. l.], v. 174, n. 11, p. 1244–1262, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bph.13630>

STALIKAS, Constantine D. Phenolic acids and flavonoids: occurrence and analytical methods. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, United States, v. 610, p. 65–90, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8_5

SUN, Kai; KUSMINSKI, Christine M; SCHERER, Philipp E. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 121, n. 6, p. 2094–2101, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI45887>

SUNG, Yoon-Young *et al.* Anti-obesity activity, acute toxicity, and chemical constituents of aqueous and ethanol *Viola mandshurica* extracts. **BMC complementary and alternative medicine**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 297, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1810-4>

TANG, Jie *et al.* Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: In Vitro Assessment and a Theoretical Model. **BioMed research international**, [s. l.], v. 2019, p. 7039802, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/7039802>

TANG, Weici; EISENBRAND, Gerhard. *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. *In: [S. l.: s. n.]*, 1992. p. 777–780. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-73739-8_98

TILG, Herbert; MOSCHEN, Alexander R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 772–783, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri1937>

TRAUDI, Klein *et al.* Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [s. l.], v. 30, 2010.

VALDEARCOS, Martin; XU, Allison W; KOLIWAD, Suneil K. Hypothalamic inflammation in the control of metabolic function. **Annual review of physiology**, United States, v. 77, p. 131–160, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071656>

VOGL, Sylvia *et al.* Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine--an unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. **Journal of ethnopharmacology**, [s. l.], v. 149, n. 3, p. 750–771, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.007>

VUKICS, Viktoria *et al.* Major flavonoid components of heartsease (*Viola tricolor* L.) and their antioxidant activities. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Germany, v. 390,

n. 7, p. 1917–1925, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1885-3>

WANG, Shu *et al.* Novel insights of dietary polyphenols and obesity. **The Journal of nutritional biochemistry**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 1–18, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.001>

WHO, World Health Organization. **Obesity and overweight**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 8 fev. 2019.

WU, Ying-Ying *et al.* A new cyclolignan glycoside from the tubers of *Pinellia ternata*. **Journal of Asian natural products research**, England, v. 17, n. 11, p. 1097–1103, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10286020.2015.1041931>

XIAO, Xiaomei *et al.* Anti-inflammatory and antioxidative effects of *Camellia oleifera* Abel components. **Future medicinal chemistry**, England, v. 9, n. 17, p. 2069–2079, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0109>

YAHFOUFI, Nour *et al.* The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. **Nutrients**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1618, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10111618>

YANG, Hyun Mo *et al.* Antiinflammatory activities of *Rubus coreanus* depend on the degree of fruit ripening. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 102–107, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.2274>

ZHA, Long-ying *et al.* Anti-inflammatory effect of soyasaponins through suppressing nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by attenuation of NF- κ B-mediated nitric oxide synthase expression. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, England, v. 21, n. 8, p. 2415–2418, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.02.071>

ZHANG, Hua; TSAO, Rong. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 8, p. 33–42, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>

ZHANG, Tian-Tian *et al.* Bioactivities and extraction optimization of crude polysaccharides from the fruits and leaves of *Rubus chingii* Hu. **Carbohydrate polymers**, College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China., v. 130, p. 307–315, 2015a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.012>

ZHANG, Tian-Tian *et al.* Extraction of antioxidant and antiproliferative ingredients from fruits of *Rubus chingii* Hu by active tracking guidance. **MedChemComm**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1673–1680, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c7md00240h>

ZHANG, Tian-Tian *et al.* Flavonoid glycosides from *Rubus chingii* Hu fruits display anti-inflammatory activity through suppressing MAPKs activation in macrophages. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 18, p. 235–243, 2015b. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.006>

ZWIRCHMAYR, Julia *et al.* A Biochemometric Approach for the Identification of In Vitro Anti-Inflammatory Constituents in Masterwort. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 679, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom10050679>