

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Julianna Oliveira de Lucas Xavier

**Investigação dos efeitos inibitórios de *Eryngium foetidum*, (E)-2-dodecenal e arbutina
frente a mecanismos oxidativos e enzimas digestivas**

Juiz de Fora

2022

Julianna Oliveira de Lucas Xavier

**Investigação dos efeitos inibitórios de *Eryngium foetidum*, (E)-2-dodecenal e arbutina
frente a mecanismos oxidativos e enzimas digestivas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte das exigências para a obtenção do título de “Mestre em Ciências Farmacêuticas” com área de concentração: “Produtos Naturais e Sintéticos Ativos”.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa

Juiz de Fora

2022

Julianna Oliveira de Lucas Xavier

Investigação dos efeitos inibitórios de *Eryngium foetidum*, (E)-2-dodecenal e arbutina frente a mecanismos oxidativos e enzimas digestivas

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em
Ciências
Farmacêuticas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências
Farmacêuticas. Área
de concentração:
Produtos Naturais e
Sintéticos Ativos.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Simone Sacramento Valverde
FIOCRUZ

Profa. Dra. Ana Lúcia Santos de Matos Araújo
Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado eletronicamente por **Orlando Vieira de Sousa, Professor(a)**, em 21/02/2022, às 21:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Lucia Santos de Matos Araujo, Professor(a)**, em 22/02/2022, às 09:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **SIMONE SACRAMENTO VALVERDE, Usuário Externo**, em 04/03/2022, às 11:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0680632** e o código CRC **7E8B176D**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, por me proporcionar saúde e a sabedoria necessária para concluir esta etapa tão importante para a minha carreira profissional.

Aos meus pais amados, Ana e Júlio César, por todos os ensinamentos e por todo o empenho para que os meus sonhos se concretizem. Amo vocês!

Ao meu namorado Luiz Gustavo, pela paciência nos momentos de dificuldades e por todo o incentivo e apoio.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Santos de Matos Araújo, pela colaboração.

Ao Técnico Administrativo em Educação Éder Luis Tostes, por todo o suporte e assistência prestada.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que contribuíram para a minha formação.

Aos amigos que convivi, que certamente auxiliaram de alguma forma e tornaram essa jornada mais leve, até mesmo em momentos difíceis.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

O processo digestivo dos alimentos compreende um conjunto de transformações físicas e químicas com a participação de enzimas digestivas (tripsina, alfa-amilases, alfa-glicosidasas e lipases) cujos produtos nutricionais podem estar relacionados a mecanismos oxidativos e diferentes distúrbios metabólicos (obesidade, diabetes e dislipidemia). Assim, a busca por agentes inibidores dessas enzimas com ação antioxidante tem sido uma das estratégias para o tratamento desses distúrbios. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos inibitórios de extratos de *Eryngium foetidum*, (*E*)-2-dodecenal e arbutina frente a mecanismos oxidativos e enzimas digestivas. Os extratos das folhas frescas (EFF) e secas (EFS) de *E. foetidum* foram obtidos por percolação com etanol 100% e (*E*)-2-dodecenal e arbutina foram adquiridos comercialmente. Os teores de fenóis e flavonoides totais foram determinados por espectrofotometria. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de sequestro do radical DPPH•, poder de redução do ferro (FRAP) e co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico. O efeito inibitório frente as enzimas digestivas foi verificado com alfa-amilase pancreática, alfa-glicosidase e lipase pancreática. Os estudos de *docking* molecular foram realizados entre ligantes (*E*-2-dodecenal e arbutina) e enzimas digestivas. Os teores de fenóis totais foram de $107,2 \pm 0,73$ mgEAG/g (EFS) e $118,8 \pm 1,64$ mgEAG/g (EFF), enquanto os flavonoides foram de $7,5 \pm 0,18$ mgERU/g (EFS) e $77,6 \pm 0,65$ mgERU/g (EFF). Usando o método do DPPH•, EFF e arbutina apresentaram IC₅₀ de $61,54 \pm 0,35$ e $176,30 \pm 1,71$ µg/mL, respectivamente, enquanto no FRAP, esses valores foram de $545,30 \pm 15,01$ e $231,00 \pm 2,08$ µg/mL, respectivamente. EFF e arbutina com $52,69 \pm 2,84$ e $53,38 \pm 3,15\%$, respectivamente, inibiram a peroxidação lipídica. Com relação ao efeito inibitório, (*E*)-2-dodecenal ($42,86 \pm 0,00\%$) e arbutina ($53,33 \pm 0,95\%$) foram ativos contra a alfa-amilase pancreática. EFF ($79,94 \pm 0,81\%$) inibiu a alfa-glicosidase, enquanto (*E*)-2-dodecenal ($80,56 \pm 7,35\%$) foi ativo contra a lipase pancreática. O *docking* molecular revelou que o (*E*)-2-dodecenal e a arbutina interagiram com os sítios catalíticos das enzimas, o que pode justificar a capacidade inibitória. Portanto, os resultados indicam que as folhas de *E. foetidum*, assim como o (*E*)-2-dodecenal e a arbutina, apresentam potencial antioxidante e inibitório das enzimas digestivas, podendo ser agentes promissores para o tratamento de distúrbios metabólicos associados a processos oxidativos.

Palavras-chave: *Eryngium foetidum*. (*E*)-2-dodecenal. Arbutina. Inibidores de enzimas. Antioxidantes. *Docking* molecular.

ABSTRACT

The digestive process of food comprises a set of physical and chemical transformations with the participation of digestive enzymes (trypsin, alpha-amylases, alpha-glucosidases and lipases) whose nutritional products may be related to oxidative mechanisms and different metabolic disorders (obesity, diabetes and dyslipidemia). Thus, the search for inhibitors of these enzymes with antioxidant action has been one of the strategies for the treatment of these disorders. The aim of the present study was to investigate the inhibitory effects of extracts of *Eryngium foetidum*, (*E*)-2-dodecenal and arbutin on oxidative mechanisms and digestive enzymes. Fresh (FLE) and dried (DLE) leaf extracts of *E. foetidum* were obtained by percolation with 100% ethanol and (*E*)-2-dodecenal and arbutin were purchased commercially. Total phenols and flavonoids contents were determined by spectrophotometry. Antioxidant activity was evaluated by DPPH• radical scavenging, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and β -carotene/linoleic acid assays. The inhibitory effect against digestive enzymes was verified with pancreatic alpha-amylase, alpha-glucosidase and pancreatic lipase. Molecular docking studies were performed between ligands (*E*-2-dodecenal and arbutin) and digestive enzymes. Total phenols contents were of 107.2 ± 0.73 mgEGA/g (DLE) and 118.8 ± 1.64 mgEGA/g (FLE), while flavonoids were of 7.5 ± 0.18 mgERU/g (DLE) and 77.6 ± 0.65 mgERU/g (FLE). Using the DPPH• assay, FLE and arbutin presented IC₅₀ of 61.54 ± 0.35 and 176.30 ± 1.71 μ g/mL, respectively, while in FRAP, these values were of 545.30 ± 15.01 and 231.00 ± 2.08 μ g/mL, respectively. Regarding the inhibitory effect, (*E*)-2-dodecenal ($42.86 \pm 0.00\%$) and arbutin ($53.33 \pm 0.95\%$) were active against pancreatic alpha-amylase. FLE ($79.94 \pm 0.81\%$) inhibited alpha-glucosidase, while (*E*)-2-dodecenal ($80.56 \pm 7.35\%$) was active against pancreatic lipase. Molecular docking revealed that (*E*)-2-dodecenal and arbutin interacted with the catalytic sites of the enzymes, which may explain the inhibitory capacity. These results indicate that *E. foetidum* leaves, as well as (*E*)-2-dodecenal and arbutin, have antioxidant potential and inhibitory capacity against digestive enzymes, and may be promising agents for the treatment of metabolic disorders associated with oxidative processes.

Key-words: *Eryngium foetidum*. (*E*)-2-dodecenal. Arbutin. Enzyme inhibitors. Antioxidants. Molecular docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Diagrama das ligações glicosídicas de carboidratos polissacarídeos e dissacarídeos hidrolisados pela alfa-amilase e alfa-glicosidase.....	16
Figura 2	- Representação esquemática dos processos de digestão do amido e da absorção de glicose.....	17
Figura 3	- Diagrama das estruturas químicas do glicerol, ácido graxo e triacilglicerol.....	18
Figura 4	- Representação esquemática do processo de digestão do triacilglicerol.....	20
Figura 5	- Expansão do tecido adiposo e infiltração de células do sistema imunológico.....	23
Figura 6	- Peroxidação lipídica: mecanismo da reação.....	30
Figura 7	- Esquema simplificado da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e da atuação dos agentes antioxidantes.....	31
Figura 8	- Mecanismo da reação no método do sequestro do radical DPPH•.....	33
Figura 9	- Mecanismo da reação no método do poder de redução do ferro (FRAP).....	34
Figura 10	- Esquema de reação de única enzima e único substrato.....	36
Figura 11	- Equação de Michaelis-Menten.....	36
Figura 12	- Gráfico de Michaelis-Menten e gráfico de Lineweaver-Burk.....	37
Figura 13	- Morfologia foliar externa de <i>Eryngium foetidum</i>	44
Figura 14	- Estruturas químicas dos principais aldeídos encontrados no óleo essencial das folhas de <i>Eryngium foetidum</i>	45
Figura 15	- Estruturas químicas das isoformas da arbutina (α -arbutina e β -arbutina).....	47
Figura 16	- Estruturas químicas do (<i>E</i>)-2-dodecenal e da arbutina.....	53
Figura 17	- Curva de calibração do ácido gálico e da rutina.....	64
Figura 18	- Cinética de reação da arbutina e do (<i>E</i>)-2-dodecenal no método de sequestro do radical DPPH•.....	67
Figura 19	- Curvas de decaimento da absorvância em função do tempo das amostras pelo método da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.....	70
Figura 20	- Atividade inibitória das amostras frente à alfa-amilase pancreática.....	72
Figura 21	- Atividade inibitória das amostras frente à alfa-glicosidase.....	73
Figura 22	- Atividade inibitória das amostras frente à lipase pancreática.....	75

Figura 23 - Validação dos protocolos de <i>docking</i> molecular pelo método de <i>redocking</i>	77
Figura 24 - Conformações e principais interações intermoleculares entre os ligantes e a alfa-amilase pancreática humana.....	79
Figura 25 - Conformações e principais interações intermoleculares entre os ligantes e a maltase-glicoamilase humana subunidade C-terminal.....	81
Figura 26 - Conformações e principais interações intermoleculares entre os ligantes e a lipase pancreática humana.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Diluições da solução estoque de ácido gálico para obtenção da curva de calibração para determinação dos teores de fenóis totais.....	50
Tabela 2	- Diluições das soluções estoque dos extratos para determinação dos teores de fenóis totais.....	51
Tabela 3	- Diluições das soluções estoque de rutina e dos extratos para determinação dos teores de flavonoides totais.....	52
Tabela 4	- Diluições da solução estoque de rutina para o método de sequestro do radical DPPH•.....	54
Tabela 5	- Diluições da solução estoque de (<i>E</i>)-2-dodecenal para o método de sequestro do radical DPPH•.....	54
Tabela 6	- Diluições das soluções estoque da arbutina e dos extratos para o método de sequestro do radical DPPH•.....	55
Tabela 7	- Diluições das soluções estoque de arbutina e (<i>E</i>)-2-dodecenal para cinética de reação com o radical DPPH•.....	56
Tabela 8	- Diluições da solução estoque de rutina para o método de poder de redução do ferro.....	57
Tabela 9	- Diluições das soluções estoque das amostras para o método de poder de redução do ferro.....	57
Tabela 10	- Teores de fenóis totais, equivalentes a mg/g de ácido gálico, e flavonoides, equivalentes a mg/g de rutina, dos extratos de <i>E. foetidum</i>	64
Tabela 11	- Atividade antioxidante pelos métodos do sequestro do radical DPPH• e poder de redução do ferro (FRAP).....	66
Tabela 12	- Inibição da peroxidação lipídica pelo método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.....	70
Tabela 13	- Valores de energia livre obtidos a partir do <i>docking</i> molecular com as enzimas.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Ácidos Graxos
AGE	Produtos Finais de Glicação Avançada (<i>Advanced Glycation End Product</i>)
BAT	Tecido Adiposo Marrom (<i>Brown Adipose Tissue</i>)
BHT	Butil-hidroxitolueno
DCV	Doenças Cardiovasculares
DM	Diabetes Mellitus
DM-2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNS	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
EFF	Extrato Folhas Frescas
EFS	Extrato Folhas Secas
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Poder de Redução do Ferro
IL	Interleucina
LPL	Lipase Lipoproteica
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMSD	Desvio médio quadrático (<i>Root-Mean-Square Deviation</i>)
SM	Síndrome Metabólica
TAG	Triacilglicerol
TGI	Trato Gastrointestinal
WAT	Tecido Adiposo Branco (<i>White Adipose Tissue</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DOS DISTÚRBIOS METABÓLICOS.....	15
2.1.1 Funções da alfa-amilase e alfa-glicosidase no metabolismo dos carboidratos.....	15
2.1.2 Funções das lipases no metabolismo dos lipídios.....	18
2.1.3 Síndrome metabólica.....	20
2.1.4 Obesidade: mecanismos inflamatórios relacionados à resistência à insulina.....	21
2.1.5 Mecanismos da resistência à insulina associados às dislipidemias.....	24
2.1.6 Diabetes mellitus tipo 2.....	26
2.1.7 Diabetes mellitus tipo 2 e estresse oxidativo.....	27
2.2 AGENTES OXIDANTES, ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	28
2.2.1 Estresse oxidativo e agentes antioxidantes.....	29
2.3 FUNDAMENTOS DOS ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	32
2.4 FUNDAMENTOS DOS ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	35
2.5 ESTUDOS <i>IN SILICO</i> E <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	37
2.5.1 Triagem virtual no desenvolvimento de fármacos.....	39
2.5.2 <i>Docking</i> molecular.....	40
2.6 O GÊNERO <i>ERYNGIUM</i> L.....	42
2.6.1 <i>Eryngium foetidum</i> L. e (<i>E</i>)-2-dodecenal.....	43
2.7 ARBUTINA.....	46
3. OBJETIVOS.....	48
3.1 OBJETIVO GERAL.....	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	49
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	49
4.3 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS.....	49
4.4 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	51
4.5 (<i>E</i>)-2-DODECENAL E ARBUTINA.....	52
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	53
4.6.1 Método do sequestro do radical DPPH•.....	53
4.6.2 Método do poder de redução do ferro (FRAP).....	56
4.6.3 Método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.....	58

4.7	ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE AS ENZIMAS DIGESTIVAS.....	59
4.7.1	Ensaio de inibição da alfa-amilase pancreática.....	59
4.7.2	Ensaio de inibição da alfa-glicosidase.....	60
4.7.3	Ensaio de inibição da lipase pancreática.....	61
4.8	<i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	61
4.8.1	Obtenção das estruturas tridimensionais dos ligantes.....	61
4.8.2	Obtenção das estruturas tridimensionais das enzimas.....	62
4.8.3	Preparação das enzimas e execução do <i>docking</i> molecular.....	62
4.8.4	Validação de protocolos pelo método de <i>redocking</i>	63
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	63
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS.....	64
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	65
5.2.1	Avaliação da atividade antioxidante pelos métodos do sequestro do radical DPPH• e poder de redução do ferro (FRAP).....	66
5.2.2	Avaliação da atividade antioxidante pelo método de co-oxidação do β- caroteno/ácido linoleico.....	69
5.3	INIBIÇÃO DA ALFA-AMILASE PANCREÁTICA.....	71
5.4	INIBIÇÃO DA ALFA-GLICOSIDASE.....	73
5.5	INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA.....	74
5.6	<i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	76
5.6.1	<i>Redocking</i>	76
5.6.2	<i>Docking</i> molecular da alfa-amilase pancreática.....	77
5.6.3	<i>Docking</i> molecular da alfa-glicosidase.....	79
5.6.4	<i>Docking</i> molecular da lipase pancreática.....	82
6.	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	APÊNDICE A - Capítulo intitulado “Enzimas digestivas e distúrbios fisiopatológicos associados”, publicado no livro Ensino e Pesquisa em Bioquímica, Capítulo 5, Páginas 42 a 58, Atena Editora, 2021. ISBN 978-65- 5706-803-8.....	99

1. INTRODUÇÃO

O processo digestivo consiste de um conjunto de transformações físicas e químicas que os alimentos sofrem ao longo do trato gastrointestinal (TGI) após a sua ingestão. Os mecanismos envolvidos na digestão promovem a formação de constituintes nutricionais que, juntamente com a água e eletrólitos, são absorvidos para exercerem importantes funções no organismo. No entanto, para serem absorvidos, esses constituintes são gerados a partir de reações enzimáticas que catalisam a quebra de carboidratos, gorduras e proteínas, transformando moléculas complexas em estruturas mais simples para serem assimiladas por nossas células. Dentre as enzimas responsáveis pela digestão dos alimentos no TGI, a tripsina, as alfa-amilases, as alfa-glicosidases e as lipases (gástrica e pancreática) são destacadas (GOODMAN, 2010).

A degradação do amido, por exemplo, inicia-se durante a mastigação pela ação da alfa-amilase salivar (ptialina), que hidrolisa o amido polimérico em oligômeros curtos, os quais são hidrolisados pela alfa-amilase pancreática liberando principalmente maltose, maltotriose e dextrinas. Por clivar apenas as ligações glicosídicas α -1,4 internas, essas enzimas são consideradas endo-hidrolases, enquanto as alfa-glicosidases, um complexo de enzimas ligadas à borda da membrana intestinal, são denominadas exo-hidrolases, pois hidrolisam as ligações α -1,4 e α -1,6 das extremidades não redutoras dos oligossacarídeos e dissacarídeos, liberando a glicose que será absorvida para a circulação (GOODMAN, 2010). Portanto, a ação dessas enzimas resulta no quadro de hiperglicemia pós-prandial que, por sua vez, aumenta os riscos de complicações em indivíduos portadores de diabetes mellitus, o que as tornam importantes alvos de ação de fármacos (AFOLABI, OLOYEDE, AGUNBIADI, 2018).

As lipases gástrica e pancreática são as principais enzimas envolvidas no processo de digestão dos lipídios provenientes da dieta, como o triacilglicerol. No estômago, a lipase gástrica hidrolisa o triacilglicerol em diacilglicerol e ácidos graxos, formando uma emulsão. Quando essa emulsão atinge o intestino delgado, a lipase pancreática hidrolisa o diacilglicerol liberando monoacilglicerol e ácidos graxos, que serão transportados para os enterócitos e, posteriormente, absorvidos para a circulação. Na circulação sanguínea, os ácidos graxos são incorporados aos quilomícrons até penetrarem nas células, onde poderão sofrer oxidação para fornecimento de energia ou ser re-esterificados em triacilglicerol para o armazenamento, principalmente no tecido adiposo (KO et al., 2020).

Como observado, as enzimas digestivas são importantes ferramentas no controle fisiológico da digestão dos alimentos, entretanto, a ingestão em excesso pode contribuir para o aumento da disponibilidade de glicose e ácidos graxos na circulação sanguínea. Assim, há um

elevado risco de desenvolvimento de sobrepeso e obesidade que, conseqüentemente, colaboram para o surgimento de dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e outros distúrbios que caracterizam a síndrome metabólica (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019). Isso porque, além de ser responsável pelo armazenamento lipídico, o tecido adiposo também exerce função endócrina por secretar na circulação sanguínea hormônios, enzimas, fatores de crescimento e citocinas, levando a um estado de inflamação crônica de baixo grau e resistência à insulina (MCARDLE et al., 2013).

Outro fator que tem uma importância crucial na patogênese das doenças metabólicas é a produção acentuada de espécies reativas de oxigênio que, juntamente com a ineficiência dos mecanismos antioxidantes, geram o estresse oxidativo. Por sua vez, o estresse oxidativo ocasiona uma série de prejuízos ao organismo, causando a disfunção das células β -pancreáticas e afetando as sinalizações celulares, o que prejudica as vias de sinalização da insulina e causa danos ao endotélio. Conseqüentemente, esse estado promove a resistência à insulina e acelera o processo aterogênico, favorecendo o desenvolvimento e/ou a progressão de diabetes mellitus tipo 2, aterosclerose e doenças cardiovasculares (AVELAR et al., 2015).

Considerando os aspectos mencionados, é possível perceber que há uma estreita relação entre os diferentes distúrbios metabólicos, cuja estratégia de tratamento tem sido o uso de medicamentos inibidores de enzimas digestivas. Por exemplo, a acarbose, a voglibose e o miglitol são fármacos utilizados no tratamento de diabetes tipo 2 que atuam através da inibição da alfa-glicosidase, sendo que a acarbose inibe também a alfa-amilase pancreática (JONGKEES et al., 2017). O orlistate (tetra-hidrolipstatina), um inibidor seletivo das lipases, é um fármaco usado no tratamento da obesidade, pois impede a absorção de parte da gordura ingerida nas refeições (GUERCIOLINI, 1997). Entretanto, efeitos adversos gastrointestinais, como desconforto abdominal, flatulência e diarreia, provocados por esses inibidores têm dificultado a adesão ao tratamento. Desse modo, a pesquisa por produtos naturais e substâncias isoladas, capazes de inibir enzimas digestivas e com propriedade antioxidante, tem sido uma estratégia na busca e no desenvolvimento de medicamentos promissores para o tratamento dos distúrbios relacionados à síndrome metabólica (TEKULU, ARAYA, MENGESHA, 2019).

Dentre as espécies encontradas na biodiversidade brasileira, *Eryngium foetidum* (Apiaceae) é nativa da América tropical e das Índias ocidentais, sendo utilizada na medicina tradicional para tratamento de diabetes, hipertensão, reumatismo, asma, malária, doenças venéreas, dor, envenenamento e outros. O óleo essencial das folhas apresenta elevadas concentrações de aldeídos, sendo o (*E*)-2-dodecenal, também conhecido como “eryngial”, o principal constituinte (PAUL, SEAFORTH, TIKASINGH, 2011). Esse composto tem sido

relacionado a várias atividades farmacológicas, como antioxidante (THOMAS et al., 2017), anticonvulsivante (MANVILLE, ABBOTT, 2019), antibacteriana (DANIEL-JAMBUN et al., 2017), anti-helmíntica (FORBES et al., 2014) e antileishmania (DONEGA et al., 2014). Então, esses dados mostram possíveis relações entre os constituintes de *Eryngium foetidum* e a sua aplicabilidade no tratamento de distúrbios metabólicos associados a processos oxidativos.

Outro constituinte proveniente de fontes naturais, a β -arbutina - ou simplesmente arbutina - é um β -glicopiranosídeo de hidroquinona encontrado nas famílias Asteraceae, Lamiaceae, Apiaceae, em espécies do gênero *Origanum* (principalmente na *O. majorana*), nas folhas de uva-de-urso (*Arctostaphylos uva-ursi*), nos mirtilos e outros. A arbutina é amplamente utilizada em produtos cosméticos para o tratamento de distúrbios de hiperpigmentação da pele, como o melasma. Além disso, estudos vem relatando a sua aplicabilidade em outras patologias, inclusive para o diabetes (SAEEDI et al., 2021). Entretanto, ensaios que investigam a relação entre a arbutina e o metabolismo dos carboidratos e lipídios são ainda escassos na literatura científica.

Diante desse cenário, com a necessidade de novos princípios ativos eficazes no tratamento dos distúrbios associados à síndrome metabólica, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de extratos de *Eryngium foetidum*, (*E*)-2-dodecenal e arbutina frente à inibição de mecanismos oxidativos e da atividade das enzimas alfa-amilase pancreática, alfa-glicosidase e lipase pancreática. Além disso, estudos de *docking* molecular foram realizados com o propósito de avaliar as afinidades de ligação e os perfis de interações intermoleculares entre os ligantes e as enzimas em questão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

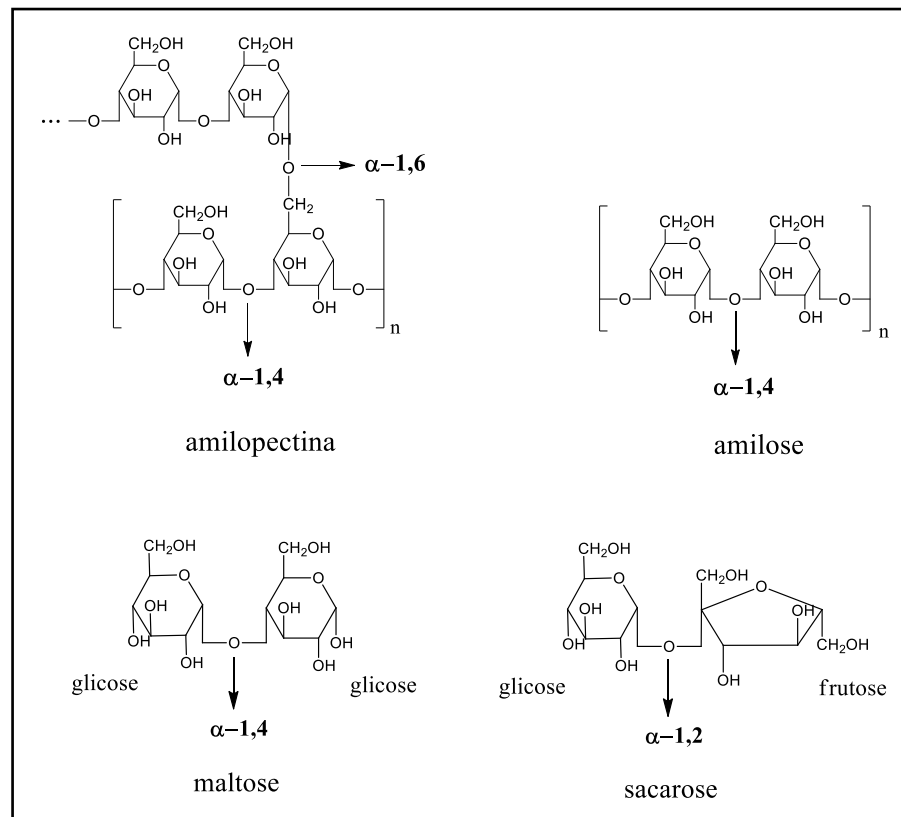
2.1 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DOS DISTÚRBIOS METABÓLICOS

A síndrome metabólica é um conjunto de patologias, como a obesidade central, resistência à insulina, dislipidemias e hipertensão sistêmica, que favorecem o desenvolvimento e a progressão de doenças cardiovasculares ateroscleróticas. Então, explorar as relações existentes entre os distúrbios metabólicos que a compõe permite compreender com maior clareza a sua fisiopatologia, além de auxiliar os estudos que visam o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas preventivas (HUANG, 2009).

2.1.1 Funções da alfa-amilase e alfa-glicosidase no metabolismo dos carboidratos

Os carboidratos são a classe de compostos orgânicos de maior ocorrência na natureza, abrangendo um grupo diversificado de moléculas que podem ser classificadas em monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Como representante dos carboidratos, o amido é um componente digerível da alimentação humana que proporciona a porcentagem mais elevada de energia da dieta, constituindo cerca de 60 a 70% do total de calorias ingeridas. Esse carboidrato é um polímero formado por dois tipos de polissacarídeos de origem vegetal, a amilose e a amilopectina. A amilose é um polímero linear que contém cerca de 1.000 moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, enquanto a amilopectina possui cerca de 100.000 moléculas de glicose unidas predominantemente por ligações glicosídicas α -1,4, mas também por ligações α -1,6, resultando em uma estrutura ramificada (LAPIS et al., 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Diagrama das ligações glicosídicas de carboidratos polissacarídeos e dissacarídeos hidrolisados pela alfa-amilase e alfa-glicosidase.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

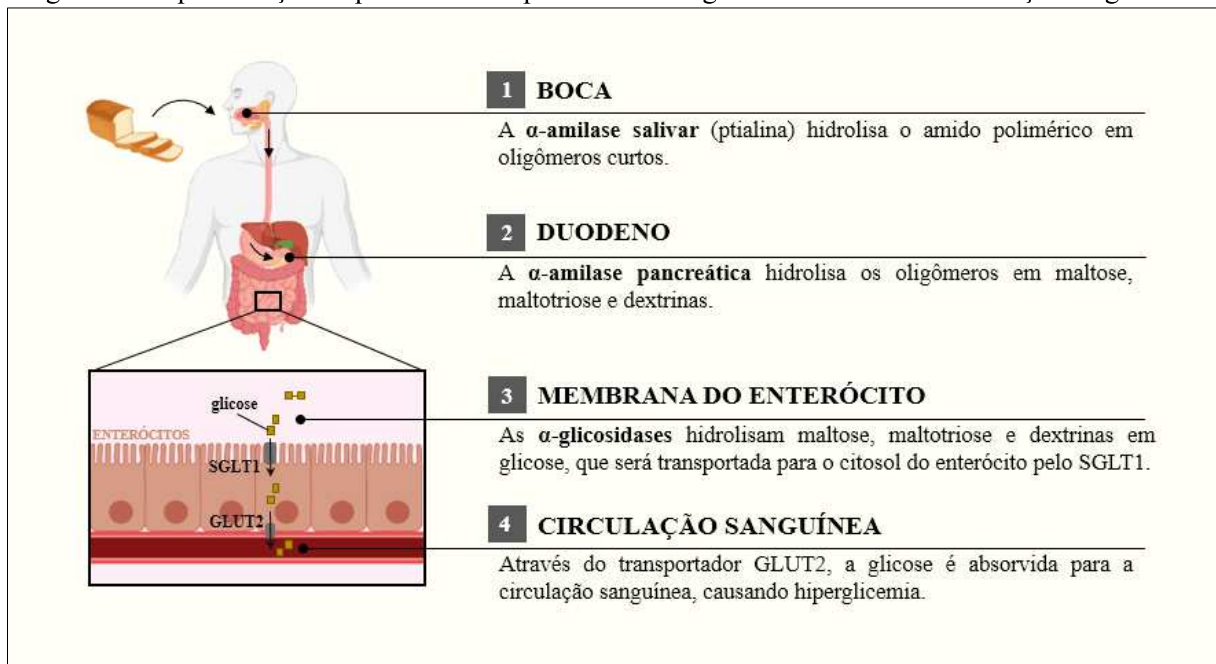
As enzimas alfa-amilase salivar e pancreática ($\alpha-1,4$ -glicano-4-glicano-hidrolases) (EC 3.2.1.1) pertencem à família 13 das glicosídeo-hidrolases (LO PIPARO et al., 2008). São consideradas endo-hidrolases, pois clivam apenas as ligações glicosídicas $\alpha-1,4$ internas do amido, ignorando as ligações $\alpha-1,6$ e $\alpha-1,4$ das extremidades e ramificações (GOODMAN, 2010), gerando dextrinas lineares e ramificadas. Nos seres humanos, as alfa-amilases são codificadas por cinco genes agrupados no cromossomo 1, sendo que os genes AMY1A, AMY1B e AMY1C codificam a alfa-amilase salivar e, os genes AMY2A e AMY2B, a alfa-amilase pancreática. Ambas as isoenzimas são constituídas por 496 aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica, sendo altamente homólogas em suas estruturas, com 97% de similaridade na sequência de aminoácidos e 92% nos domínios catalíticos (LO PIPARO et al., 2008).

As alfa-glicosidases (α -D-glicosídeo glico-hidrolase) pertencem ao subgrupo 1 da família 31 das glicosídeo-hidrolases. São exo-hidrolases, ou seja, enzimas que catalisam a hidrólise das extremidades não redutoras. Nos mamíferos, as alfa-glicosidases são um complexo formado pela sacarase-isomaltase (EC 3.2.148 e 3.2.1.10) e maltase-glicoamilase (EC 3.2.1.20 e 3.2.1.3), sendo que ambas se encontram ligadas à membrana do epitélio do intestino delgado (SIM et al., 2008). A maltase hidrolisa apenas as ligações $\alpha-1,4$ entre as

moléculas de glicose da maltose ou das extremidades do polissacarídeo, enquanto a sacarase-isomaltase é um complexo formado pela isomaltase, também denominada de dextrinase, associada à sacarase. A isomaltase é responsável pela hidrólise das ligações α -1,6 das dextrinas e α -1,4 da maltose e maltotriose, enquanto a sacarase hidrolisa as ligações α -1,2 da sacarose (glicose e frutose) (GOODMAN, 2010). Essas enzimas têm sua composição e estrutura similares, apresentando cerca de 60% de homologia (SIM et al., 2008).

Como importante carboidrato da dieta, a digestão do amido inicia-se na boca com a ação da alfa-amilase salivar, que catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 internas formando oligômeros curtos. Quando esses oligômeros atingem o intestino delgado, através da ação da alfa-amilase pancreática, são hidrolisados em malto-oligossacarídeos lineares, como a maltose e a maltotriose, e as dextrinas, que são estruturas ramificadas. Em seguida, as alfa-glicosidases presentes na membrana apical dos enterócitos realizam a hidrólise desses malto-oligossacarídeos em glicose (NICHOLS et al., 2003). A glicose, por sua vez, será absorvida da membrana apical para o interior do enterócito através do cotransportador sódio-glicose (SGLT1) e, em seguida, para a circulação sanguínea através do transportador de glicose 2 (GLUT2), acarretando em hiperglicemia pós-prandial (KELLETT, BROT-LAROCHE, 2005) (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática dos processos de digestão do amido e da absorção de glicose.

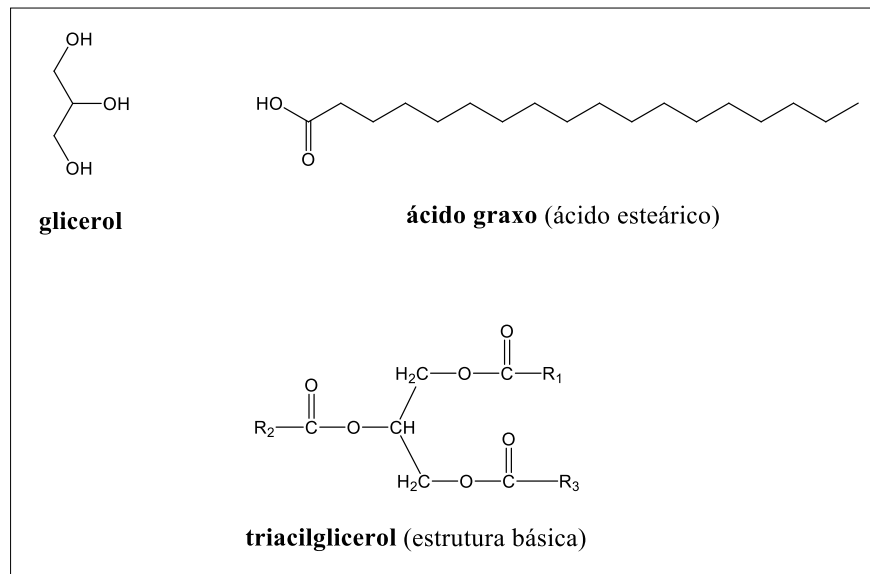


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

2.1.2 Funções das lipases no metabolismo dos lipídios

O triacilglicerol é o principal tipo de gordura ingerida através da alimentação e a principal forma de armazenamento de lipídios no organismo. A molécula do triacilglicerol é constituída por três ácidos graxos, geralmente distintos, esterificados aos grupos hidroxila da molécula de glicerol (CAREY, SMALL, BLISS, 1983) (Figura 3).

Figura 3 - Diagrama das estruturas químicas do glicerol, ácido graxo e triacilglicerol.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases) (EC 3.1.1.3) (BOUCHAËLA et al., 2015) são uma família de enzimas que atuam catalisando a hidrólise das ligações éster dos triacilglicerídios, fosfolipídios e ésteres de colesterol (WONG, SCHOTZ, 2002), compreendendo a lipase gástrica, lipase pancreática, lipase pancreática relacionada à proteína 1, lipase pancreática relacionada à proteína 2, lipase lipoproteica, lipase hepática, lipase endotelial e fosfatidilserina fosfolipase A1 (JIN et al., 2002). A lipase gástrica também é denominada de lipase ácida, pois atua em um pH ideal de 4,0, sendo mais eficaz na hidrólise de triacilgliceróis compostos por ácidos graxos de cadeias médias. Entretanto, a lipase pancreática é a enzima mais importante envolvida no processo de digestão dos lipídios (KO et al., 2020).

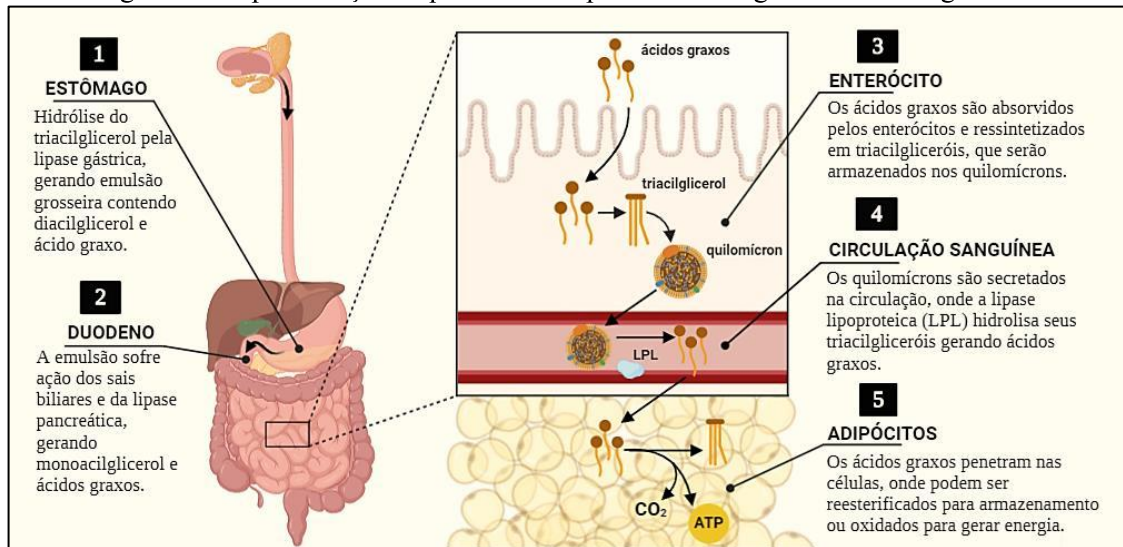
A digestão do triacilglicerol (TAG) inicia-se no estômago, com a ação da lipase gástrica na hidrólise das ligações éster gerando diacilglicerol e ácido graxo, formando uma emulsão grosseira. Em seguida, essa emulsão atinge o intestino delgado onde será ainda mais emulsificada pelos ácidos biliares, facilitando a ação da lipase pancreática. A lipase pancreática, então, promove a hidrólise dos diacilgliceróis em monoacilglicerol e ácidos graxos, que serão

absorvidos do lúmen intestinal para os enterócitos. A absorção dos ácidos graxos pelos enterócitos ocorre através de dois mecanismos distintos: por difusão passiva através da membrana apical, quando a concentração no lúmen intestinal é superior à intracelular, ou por outro mecanismo saturável que provavelmente depende do transporte por proteínas, quando a concentração intracelular de ácidos graxos é superior à luminal (KO et al., 2020).

Após a absorção pelos enterócitos, os ácidos graxos de cadeia curta e média (até 12 átomos de carbono) são transportados na corrente sanguínea pela albumina, enquanto os de cadeia longa (acima de 12 átomos de carbono) deverão ser convertidos a TAG para serem transportados por lipoproteínas (SOBCZAK, BLINDAUER, STEWART, 2019). Dentro dos enterócitos, os monoacilgliceróis e ácidos graxos de cadeia longa são transportados para o retículo endoplasmático, onde serão resintetizados em TAG através da via dos monoacilgliceróis. Neste processo, primeiramente são formados diacilgliceróis a partir da esterificação de monoacilgliceróis com acil-CoA graxo, reação que é catalisada por enzimas monoacilglicerol aciltransferases. Em seguida, sob ação das enzimas diacilglicerol aciltransferases, o diacilglicerol formado é esterificado com outra molécula acil-CoA, produzindo o TAG. Após esse processo de ressíntese, os TAGs podem ser empacotados em lipoproteínas, principalmente os quilomícrons, ou podem ser armazenados no citosol. Os quilomícrons são secretados através da membrana basolateral dos enterócitos e irão transportar esses lipídios para a circulação através do sistema linfático (KO et al., 2020).

A lipase lipoproteica (LPL), enzima presente em vários tipos celulares e nos capilares sanguíneos, promove a hidrólise dos TAGs transportados pelos quilomícrons e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) em ácidos graxos que, por sua vez, irão penetrar nas células dos tecidos para serem oxidados para fornecimento de energia ou poderão ser novamente re-esterificados em TAGs para armazenamento (Figura 4). Dessa forma, os TAGs representam a principal forma de armazenamento de lipídios no organismo, sendo que, em mamíferos, são estocados intracelularmente no tecido adiposo (HE et al., 2018). Dessa forma, as lipases exercem um papel fundamental no metabolismo lipídico e podem constituir um importante alvo molecular para potenciais fármacos com ação antiobesidade ou antidislipidêmico.

Figura 4 - Representação esquemática do processo de digestão do triacilglicerol.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

2.1.3 Síndrome metabólica

A síndrome metabólica (SM), também conhecida como “síndrome da resistência à insulina” e “síndrome X”, tem sido descrita desde 1998 pelo grupo de consulta sobre diabetes da Organização Mundial da Saúde (OMS). Essa síndrome consiste de um conjunto de distúrbios metabólicos que inclui obesidade central, resistência à insulina (diabetes mellitus tipo 2, glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída), dislipidemia aterogênica e hipertensão arterial, estando relacionada com risco aumentado de desenvolvimento de doença cardiovascular aterosclerótica (ROCHLANI et al., 2017).

A patogênese da SM é considerada complexa e ainda não está totalmente elucidada. Entretanto, sabe-se que fatores genéticos e um estilo de vida baseado em consumo excessivo de calorias e ausência de atividade física são fatores contribuintes para a adiposidade visceral, que é mais preponderante no mecanismo de resistência à insulina do que a gordura subcutânea. Isso porque a lipólise visceral promove maior fluxo de ácidos graxos livres para o fígado, além desse tipo de tecido adiposo ser mais ativo metabolicamente por secretar substâncias bioativas com maior abundância (ROCHLANI et al., 2017).

Vários mecanismos são propostos para a patogênese da SM, mas acredita-se que a relação existente entre a resistência à insulina e a circulação de ácidos graxos livres desempenhe um papel fundamental, uma vez que a resistência à insulina aumenta o processo de lipólise e, conseqüentemente, aumenta a circulação de ácidos graxos livres, que estão associados ao aumento de triglicerídeos e VLDL pelo fígado (MCCRACKEN, MONAGHAN,

SREENIVASAN, 2018). Além disso, o estresse oxidativo e a inflamação crônica de baixo grau também são considerados mecanismos potenciais, principalmente no processo aterosclerótico (ROCHLANI et al., 2017).

A terapia farmacológica da SM é baseada nas patologias associadas, já que não existe um tratamento único. Isso requer o uso prolongado de vários medicamentos, o que se torna um desafio para os pacientes e coloca em risco a adesão terapêutica. Nesse sentido, há uma crescente busca por novos produtos terapêuticos que possam auxiliar na redução da progressão e dos riscos da SM (ROCHLANI et al., 2017).

2.1.4 Obesidade: mecanismos inflamatórios relacionados à resistência à insulina

O tecido adiposo ocorre em duas formas distintas, o tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue* [BAT]) e o tecido adiposo branco (*white adipose tissue* [WAT]). O BAT é responsável pela termogênese, ou seja, está associado ao controle da temperatura corporal, enquanto o WAT possui a tradicional função de armazenamento lipídico na forma de triacilglicerol após excesso de energia e, inclusive, de mobilizar essas reservas para geração de energia em períodos de restrição de nutrientes (MCARDLE et al., 2013). Além disso, o WAT também é considerado um órgão endócrino, pois secreta na circulação sanguínea substâncias como hormônios, enzimas, fatores de crescimento, proteínas da matriz e citocinas (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019).

As citocinas secretadas pelo tecido adiposo, denominadas adipocitocinas ou adipocinas, podem ser anti-inflamatórias, que são mediadoras de processos fisiológicos, ou pró-inflamatórias, que estimulam as vias inflamatórias. A adiponectina, fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), interleucinas (IL) IL-10, IL-4 e IL-13, receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) e apelina, por exemplo, são as adipocinas anti-inflamatórias, enquanto IL-6, IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), leptina, visfatina, resistina, angiotensina II e inibidor do ativador de plasminogênio 1 são pró-inflamatórias (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019). Dentre essas proteínas, principalmente, a IL-6, a IL-1 β e o TNF- α têm sido associados ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 e apresentam-se aumentados em pacientes com a doença (YANAI, YOSHIDA, 2019).

A IL-6 é uma potente citocina pró-inflamatória secretada por células do sistema imunológico (monócitos, macrófagos e linfócitos), fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, algumas células tumorais e células do WAT. Sua produção é regulada por diferentes fatores em células normais, como a IL-1, TNF- α , interferons, DNA e RNA de vírus e

endotoxinas de bactérias (YAO et al., 2014). Além da modulação do sistema imunológico, sua ação está associada ao aumento na produção de proteínas de fase aguda (como a proteína C reativa), aumento de fibrinogênio (estado pró-trombótico), estimulação da expressão de moléculas de adesão e ativação de vias do sistema renina-angiotensina (ROCHLANI et al., 2017). A IL-6 promove a fosforilação de serina do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) e, portanto, traz impactos negativos à sinalização da insulina (MCARDLE et al., 2013).

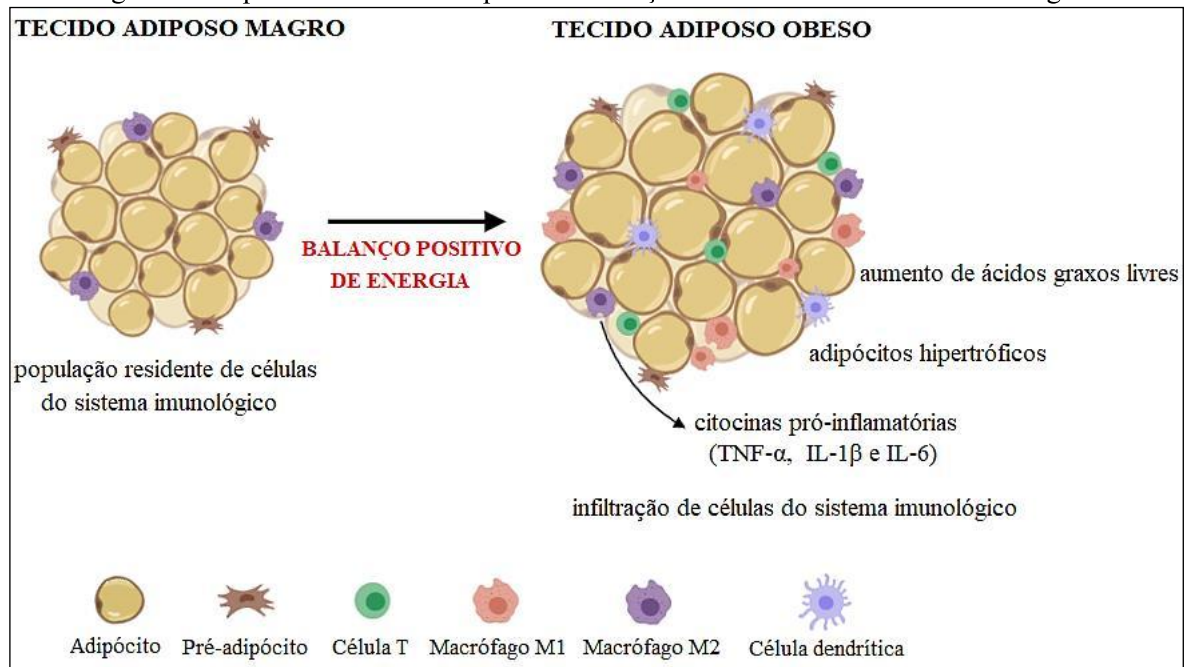
A IL-1 β , pertencente à superfamília de IL-1, é um mediador pró-inflamatório importante na resposta inflamatória sistêmica. Seu precursor é biologicamente inativo, sendo que sua ativação e secreção estão associadas principalmente às células do sistema imunológico, como monócitos, macrófagos e células dendríticas (HERNANDEZ-SANTANA et al., 2019). Seus níveis aumentados na circulação estão relacionados com maior risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (MCARDLE et al., 2013).

O TNF- α é uma potente citocina pró-inflamatória, secretada por monócitos e macrófagos, estimulando a secreção de outros fatores como a IL-6 e IL-1 β (MCARDLE et al., 2013). Além disso, apresenta funções complexas em processos fisiológicos como resposta a infecções e lesões, apoptose, angiogênese e outros. Esse fator (TNF- α) também é citotóxico para células tumorais, o que confere sua propriedade antitumoral (BORST, 2004), mas provoca fosforilação e inativação de receptores de insulina nos tecidos adiposo e muscular liso (ROCHLANI et al., 2017). Foi o primeiro mediador associado à resistência à insulina induzida pela obesidade, e também estimula a lipólise, aumentando a concentração de ácidos graxos livres circulantes (MCARDLE et al., 2013).

Com base nos mecanismos citados, um dos aspectos patológicos relacionados ao tecido adiposo é a obesidade. Essa doença é definida como a expansão e disfunção dos tecidos adiposos ocasionadas sob condições positivas de energia, que estimulam os pré-adipócitos a se diferenciar e proliferar em adipócitos maduros, levando ao aumento no número de células (hiperplasia), assim como estimula o armazenamento lipídico em excesso, levando ao aumento no tamanho das células (hipertrofia). Nesse sentido, como o tecido adiposo é um órgão endócrino capaz de secretar substâncias regulatórias, sua expansão gera um aumento na liberação das citocinas pró-inflamatórias que estimulam respostas do sistema imunológico e promovem a infiltração de células, como macrófagos ativos, levando a um processo de inflamação crônica de baixo grau (LIU, WANG, LIN, 2019) (Figura 5). Além disso, esses fatores pró-inflamatórios ativam várias serina-quinases, como I κ B quinase (IKK) e JNK, que promovem a fosforilação dos resíduos de serina na via de sinalização da insulina, inclusive a serina do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1). Consequentemente, a sinalização normal

da insulina é prejudicada causando estado de resistência, o que favorece o desenvolvimento de várias complicações, inclusive o diabetes mellitus tipo 2 (MCARDLE et al., 2013).

Figura 5 - Expansão do tecido adiposo e infiltração de células do sistema imunológico.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O tratamento da obesidade é baseado principalmente na combinação de mudança de hábitos alimentares e atividade física. Entretanto, os indivíduos que não respondem a essas modificações podem necessitar de terapia farmacológica (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019). Atualmente, estão disponíveis os seguintes fármacos e associações: inibidores das lipases gastrointestinais (orlistate e cetilistate) e supressores do apetite, como sibutramina (inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina), liraglutida (agonista do receptor GLP-1 [*glucagon-like peptide-1*]), fentermina (inibidor do transportador de noradrenalina), fentermina/topiramato (inibidor do transportador de noradrenalina e agonista receptores GABA [ácido gama-aminobutírico], respectivamente), lorcaserina (agonista de receptor 5-HT), naltrexona/bupropiona (antagonista de receptor opióide e inibidor da recaptação de noradrenalina e dopamina, respectivamente), tesofensina (inibidor da recaptação de noradrenalina, dopamina e serotonina) e exenatida (agonista GLP-1) (NARAYANASWAMI, DWOSKIN, 2017).

2.1.5 Mecanismos da resistência à insulina associados às dislipidemias

Os ácidos graxos (AG), que são estocados intracelularmente como TAGs, podem ser mobilizados pelo processo de lipólise através de uma reação de hidrólise (SOBCZAK, BLINDAUER, STEWART, 2019). No entanto, a insulina, além de estimular a captação de glicose pelas células e inibir a gliconeogênese, também promove a inibição da lipólise. Com isso, quando ocorre a resistência à insulina, essa inibição pode ser prejudicada, gerando um aumento de AG circulantes (ROCHLANI et al., 2017). Nas células e tecidos, o excesso de AG ocasiona lipotoxicidade, uma vez que há uma sobrecarga tornando-se impossíveis os processos de conversão para TAG ou β -oxidação, o que eleva a formação de lipídios tóxicos. Conseqüentemente, há disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático e geração de espécies reativas de oxigênio, que resultam em apoptose (principalmente de células β -pancreáticas, musculares esqueléticas e adipócitos), inflamação e resistência à insulina (SOBCZAK, BLINDAUER, STEWART, 2019).

No fígado, os AG circulantes são substratos para produção de TAGs (HUANG, 2009), enquanto, em condições normais, grande parte da apolipoproteína B (apoB) sintetizada é degradada pelo retículo endoplasmático dos hepatócitos. Quando os níveis de TAGs estão aumentados no fígado, há uma supressão da degradação de apoB (HIRANO, 2018), principal apolipoproteína presente nas partículas de VLDL, causando aumento na produção de VLDL. Deve-se considerar ainda que, através de uma via dependente da PI3-K, a insulina está associada à degradação de apoB, e a sua resistência está diretamente relacionada ao aumento na produção de VLDL (HUANG, 2009).

Ainda sobre as vias do metabolismo lipídico, a LPL, que está presente na superfície do endotélio vascular, é responsável pela hidrólise dos TAGs transportados pelos quilomícrons e VLDL, desempenhando um papel importante na remoção dessas partículas (HIRANO, 2018). No entanto, a insulina é capaz de estimular a ação da LPL e o estado de resistência reduz a atividade dessa enzima, resultando em níveis elevados de quilomícrons e VLDL em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. Dessa forma, a hipertrigliceridemia é uma consequência tanto do aumento da produção de TAGs quanto da redução do seu catabolismo, ambos promovidos pela resistência à insulina (HUANG, 2009).

Considerando as lipoproteínas, o VLDL é metabolizado em partículas de LDL denominadas “pequenas e densas” (*small dense LDL* [SdLDL]), além das lipoproteínas remanescentes (HUANG, 2009). Isso ocorre porque há uma transferência de TAGs do VLDL para o LDL, através da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), sendo que o

LDL, rico em TAGs, sofre lipólise pela lipase hepática tornando-se pobre em colesterol e formando o SdLDL. Em comparação às partículas de LDL grandes, o SdLDL está mais fortemente associado ao desenvolvimento de aterosclerose, pois penetra mais facilmente na parede das artérias, possui meia-vida plasmática mais longa, menor afinidade com o receptor de LDL e fraca resistência ao estresse oxidativo (HIRANO, 2018).

De forma semelhante, as partículas de HDL também recebem TAGs transferidos do VLDL pela CETP, em troca dos ésteres de colesterol. Essa lipoproteína (HDL) é rica em TAGs, o que as tornam substratos para a lipase hepática, sendo rapidamente eliminadas da circulação (HUANG, 2009). Com menos partículas de HDL circulantes, há uma redução no transporte reverso de colesterol dos tecidos, responsável por prevenir o desenvolvimento de DCV (HIRANO, 2018).

O aumento nos níveis de triglicerídeos, LDL-c, VLDL-c e colesterol total e os baixos níveis de HDL são os distúrbios do metabolismo lipídico que caracterizam as dislipidemias (DROZDZ et al., 2021). As dislipidemias contribuem para o acúmulo de colesterol nas paredes dos vasos sanguíneos, levando ao recrutamento de células sanguíneas inflamatórias, como os macrófagos, que secretam citocinas tornando o endotélio vascular um ambiente inflamatório. Conseqüentemente, essa inflamação exige reparos através da formação de placas fibrosas de colágeno, denominadas placas de ateroma, que aumentam os riscos de desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico, por exemplo (ADNAN et al., 2018).

O tratamento das dislipidemias é uma abordagem crucial para a prevenção de DCV, e engloba mudanças no estilo de vida e terapia farmacológica (THOMPSON, 2004). Atualmente, as principais classes de fármacos e suas associações são: estatinas (inibidores da 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A [HMG-CoA] redutase), limitam a síntese de colesterol endógeno; fibratos ou derivados do ácido fibríco, estimulam os receptores gama ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR- γ), atuando no metabolismo lipídico e aumentando a atividade da LPL (KHERA, MCGUIRE, 2005); ezetimiba (inibidor da proteína NPC1L1), inibem a absorção intestinal de colesterol; inibidores da PCSK9, proteína envolvida na homeostase do colesterol pela degradação de receptores LDL; estatina/ezetimiba; estatina/fibrato (FILIPPATOS et al., 2017); ácido nicotínico ou niacina, inibe a lipólise (JULIUS, 2015).

2.1.6 Diabetes Mellitus tipo 2

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico caracterizado por concentrações elevadas de glicose no sangue (hiperglicemia), devido à insuficiência na produção de insulina pelas células β -pancreáticas e/ou deficiência na sua ação (resistência à insulina), podendo ser classificado em: diabetes mellitus tipo 1, ou insulino-dependente, quando há destruição das células β -pancreáticas pelo sistema imunológico; diabetes mellitus tipo 2, ou não insulino-dependente, quando há deficiência na secreção ou resistência à insulina; diabetes gestacional, quando a intolerância à glicose é detectada pela primeira vez no período gestacional (ASMAT, ABAD, ISMAIL, 2016); e LADA (diabetes auto-imune latente do adulto), quando o DM tipo 1 se inicia na fase adulta (SCHWARTZ et al., 2017). Além disso, o diabetes *insipidus* é uma doença rara causada pela diminuição na secreção ou ação da vasopressina (hormônio antiurético) que leva à excreção de grandes volumes de urina, concentrando a glicose no sangue (REFARDT, WINZELER, CHRIST-CRAIN, 2020).

O diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) é caracterizado por hiperglicemia crônica como consequência da resistência periférica à insulina, disfunção das células β -pancreáticas ou ambas as situações (MEZA et al., 2019). Os tecidos que apresentam resistência à insulina de forma mais proeminente são o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (FORBES, COOPER, 2013). Como consequência, a captação e utilização de glicose pelas células são afetadas, resultando em aumento da lipólise e proteólise, aumento da gliconeogênese hepática, liberação de hormônios catabólicos (como glucagon, cortisol e catecolaminas), aumento na produção de superóxido e estresse oxidativo, aumento de disfunção endotelial e mitocondrial, aumento na acidose intracelular no cérebro e danos neuronais (RASOULI et al., 2020).

Dessa forma, várias complicações estão associadas com o DM-2. Entre as complicações metabólicas agudas, incluem a cetoacidose diabética, devido à hiperglicemia grave, e o coma, como consequência da hipoglicemia. As complicações de longo prazo estão relacionadas aos danos dos vasos sanguíneos desencadeados pela hiperglicemia crônica, sendo macrovasculares (hipertensão, doença coronariana, ataque cardíaco, derrame, doença vascular cerebral e doença vascular periférica), quando há danos nas artérias, e microvasculares (nefropatia, retinopatia e neuropatia), quando pequenos vasos sanguíneos são acometidos (FORBES, COOPER, 2013).

O manejo terapêutico adequado do DM-2 é importante na prevenção dessas complicações (RASOULI et al., 2020). O tratamento farmacológico compreende as seguintes classes de medicamentos: biguanidas (metformina), reduzem a produção hepática de glicose e a absorção de glicose pelo intestino e estimula captação de glicose pelos tecidos; sulfoniureias

(glibenclamida, gliclazida, glimepirida, glipizida e clorpropamida), agem diretamente nas células β -pancreáticas fechando os canais de potássio dependente de ATP e estimulando a secreção de insulina; tiazolidinedionas (pioglitazona, rosiglitazona e troglitazona), são agonistas dos receptores PPAR- γ e sensibilizam a ação da insulina nos hepatócitos, adipócitos e músculo esquelético; agonistas do receptor GLP-1 (liraglutida, exenatida e lixisenatida), hormônio que estimula a secreção de insulina e inibe a secreção de glucagon; inibidores da DDP-4 (dipeptidil-peptidase 4) (vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina e linagliptina), enzima que metaboliza o GLP-1; inibidores SGLT-2 (co-transportador sódio-glicose 2), impedem a reabsorção de glicose pelo SGLT-2 nos rins; inibidores da alfa-glicosidase (acarbose, voglibose e miglitol), enzima responsável por hidrolisar oligo e dissacarídeos em glicose, promovendo a hiperglicemia pós-prandial (WU et al., 2014).

2.1.7 Diabetes mellitus tipo 2 e estresse oxidativo

A hiperglicemia crônica, característica do DM-2, intensifica ainda mais o processo de glicação de moléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando a formação dos produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation end product* [AGE]). Esses compostos são formados através da reação de Maillard, uma reação não enzimática entre açúcares redutores e resíduos de amina das macromoléculas. Os AGEs ligam-se aos seus receptores de superfície celular localizados em macrófagos e células endoteliais, desencadeando uma cascata de reações que levam à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que também são produzidos pela própria autooxidação da glicose. O aumento na produção de ERO e a ineficiência de sua neutralização pelo sistema antioxidante geram o estresse oxidativo (BIGAGLI, LODOVICI, 2019).

Por outro lado, as células β -pancreáticas, quando comparadas com células de outros tecidos, apresentam maior vulnerabilidade aos danos causados pelo estresse oxidativo, devido à sua reduzida abundância de enzimas do sistema de defesa antioxidante. Assim, as ERO são capazes de oxidar e danificar as estruturas de lipídios, proteínas e DNA, comprometendo suas funções e levando à disfunção e morte das células β -pancreáticas. Além dos danos às macromoléculas, as ERO também podem afetar as vias de sinalização da insulina, ocasionando o estado de resistência. O estresse oxidativo também está associado às complicações vasculares tardias do diabetes, principalmente no DM-2. Isso porque aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, fatores de crescimento, fatores pró-coagulantes e

diminuição da liberação de óxido nítrico, eventos que resultam na disfunção endotelial e, conseqüentemente, complicações micro e macrovasculares (BIGAGLI, LODOVICI, 2019).

2.2 AGENTES OXIDANTES, ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

As espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, principais classes de agentes oxidantes gerados no organismo, podem se encontrar tanto na forma de radicais livres quanto de oxidantes não radicais. Os radicais livres são espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado, ou seja, são eletricamente carregados. Dessa forma, se neutralizam com outras substâncias causando a oxidação de substratos, sendo altamente prejudiciais para o organismo (ALI et al., 2020).

A geração de radicais livres pode ocorrer através de fontes endógenas ou exógenas. A respiração celular nas mitocôndrias, inflamação, infecção, ativação de células do sistema imunológico, exercícios excessivos, estresse, envelhecimento, isquemia e câncer são processos que levam à produção endógena de radicais livres. Já as fontes exógenas são as exposições do organismo a poluentes ambientais, metais pesados, solventes químicos, radiação, álcool, fumaça de cigarro e certos fármacos que, quando degradados ou metabolizados, geram como subprodutos os radicais livres (PIZZINO et al., 2017).

Dentre as espécies reativas de oxigênio (ERO), destacam-se os radicais livres superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e também os oxidantes não radicais peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO), que são convertidos em radicais (ALI et al., 2020). As ERO são produzidas, em organismos vivos, nas mitocôndrias, citosol, membrana plasmática, peroxissomos, lisossomos e retículo endoplasmático, apesar de grande parte ser gerada na cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias e através de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019). A produção dessas espécies reativas pode ocorrer tanto por processos enzimáticos quanto por não enzimáticos (PIZZINO et al., 2017).

No processo enzimático, o radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) é formado através da ação de enzimas como a xantina oxidase ou a NADPH oxidase (ALI et al., 2020), que é uma proteína transmembrana que transfere um elétron do NADPH para o oxigênio molecular (O_2) (MOLDOGAZIEVA et al., 2020). Como o ânion superóxido é altamente reativo e instável, a enzima superóxido dismutase (SOD) realiza a sua conversão em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ALI et al., 2020). Este, por sua vez, pode ser reduzido e convertido em radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$)

através da reação de Fenton, em que íons metais como o Fe^{2+} ou Cu^+ atuam como catalisadores da reação (PIZZINO et al., 2017). No entanto, vale lembrar que o peróxido de hidrogênio também pode sofrer a ação das enzimas catalase ou glutathione peroxidase e ser convertido em água (DRÖGE, 2002).

As espécies reativas de nitrogênio (ERN) são representadas principalmente pelo radical óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), que pode ser gerado por processo enzimático, através da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que converte o aminoácido L-arginina em $\bullet\text{NO}^+$ e L-citrulina, ou por processos não enzimáticos (ALI et al., 2020). Assim, o $\text{NO}\bullet$ produzido pode ser convertido, dependendo do microambiente, em várias outras ERN, como cátion nitrossênio (NO^+), ânion nitroxil (NO^-) ou peroxinitrito (ONOO^-) (DRÖGE, 2002).

2.2.1 Estresse oxidativo e agentes antioxidantes

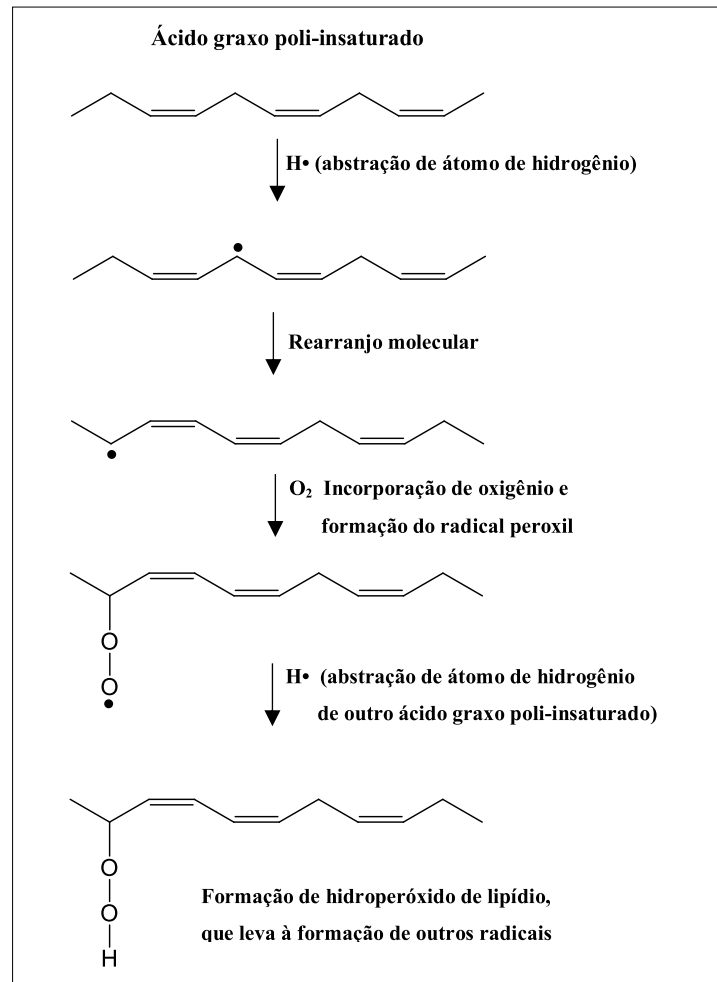
A produção adequada dos agentes oxidantes e sua manutenção em níveis baixos são essenciais para o funcionamento normal de vários processos celulares, como a imunidade e diferenciação, ativação de fatores transcricionais, fosforilação de proteínas e apoptose (PIZZINO et al., 2017). Entretanto, quando há um desequilíbrio entre a geração de agentes oxidantes e a sua neutralização pelo sistema antioxidante endógeno, ocorre o estresse oxidativo (MOLDOGAZIEVA et al., 2020).

O estresse oxidativo está associado a efeitos prejudiciais ao organismo, já que os agentes oxidantes possuem elétrons desemparelhados e, em busca de sua estabilidade, extraem elétrons de outras moléculas, causando danos em estruturas celulares importantes, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (HAIDA, HAKIMAN, 2019). Dessa forma, o estresse oxidativo tem sido relacionado ao surgimento e/ou à progressão de várias patologias, como diabetes mellitus tipo 2, aterosclerose, distúrbios metabólicos, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e câncer (PIZZINO et al., 2017).

Uma consequência preocupante causada pelo estresse oxidativo é o processo de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica consiste de um mecanismo complexo em que agentes oxidantes promovem a abstração de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares. Assim, ocorre um rearranjo das ligações insaturadas e a incorporação de oxigênio, levando à formação de radicais peroxila, que irão abstrair átomos de hidrogênio de outros ácidos graxos poli-insaturados, iniciando uma reação em cadeia (REPETTO, SEMPRINE, BOVERIS, 2012) (Figura 6). Dessa forma, os lipídios, que são componentes essenciais das membranas celulares, sofrem danos oxidativos

favorecendo o surgimento de patologias como diabetes, aterosclerose, câncer, doença hepática e doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e Parkinson (YIN, XU, PORTER, 2011).

Figura 6 - Peroxidação lipídica: mecanismo da reação.



Fonte: Adaptado de MAFRA, ABDALLA, COZZOLINO (1999).

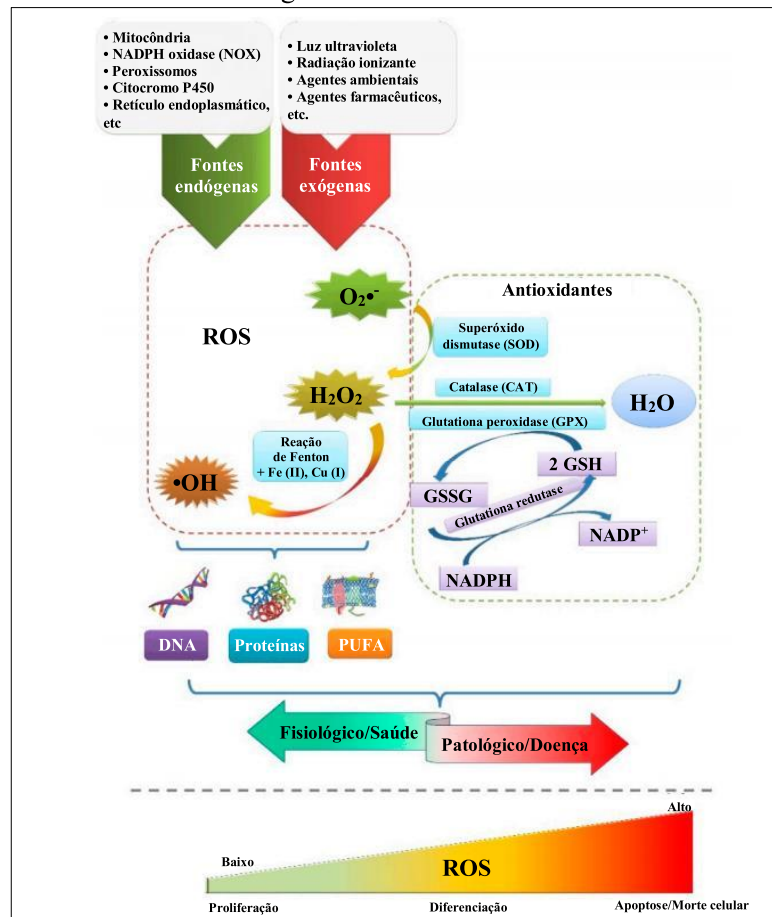
Em resposta ao estresse oxidativo e aos subsequentes danos às biomoléculas, o organismo humano desenvolveu um sistema de defesa antioxidante complexo e sofisticado. Antioxidantes são substâncias capazes de neutralizar os agentes oxidantes, através da doação de um átomo de hidrogênio ou de um elétron, formando produtos com pouca ou nenhuma toxicidade para as células (BOLIGON, MACHADO, ATHAYDE, 2014). Os agentes antioxidantes podem ser classificados, de acordo com o mecanismo que atuam, em enzimáticos ou não enzimáticos (HAIDA, HAKIMAN, 2019).

Alguns exemplos de antioxidantes enzimáticos são as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX), enquanto a glutathione, coenzima Q10,

vitaminas C e E, compostos fenólicos e ácido úrico, por exemplo, constituem os antioxidantes não enzimáticos. Além disso, os antioxidantes podem ser classificados também como primários e secundários. Os antioxidantes primários são capazes de inibir as reações em cadeia que geram os agentes oxidantes, enquanto os antioxidantes secundários eliminam os agentes oxidantes já formados, através da eliminação do radical superóxido, conversão de peróxidos de hidrogênio que geram radicais, quelação de íons metálicos, absorção de radiação ultravioleta e outros mecanismos (MUNTEANU, APETREI, 2021; PISOSCHI et al., 2016).

A formação de espécies reativas de oxigênio e a atuação de agentes antioxidantes enzimáticos são mostradas na Figura 7.

Figura 7 - Esquema simplificado da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e da atuação dos agentes antioxidantes.



O esquema demonstra a formação de ERO a partir de fontes endógenas (cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, NADPH oxidases, peroxissomos, citocromo P450, retículo endoplasmático, e outras) e fontes exógenas (luz ultravioleta, radiação ionizante, agentes ambientais, agentes farmacêuticos e outras). As células dispõem de um sistema antioxidante que engloba mecanismos enzimáticos (SOD, CAT, GPX) e não enzimáticos (glutaciona) que regula os níveis de ERO para manter o bom funcionamento celular. Entretanto, quando há elevação nos níveis de ERO, ocorrem vários danos irreversíveis às macromoléculas, como proteínas, ácidos graxos poli-insaturados (*Poly unsaturated fatty acids* [PUFA]) e DNA, levando ao desenvolvimento de doenças. Além disso, as concentrações de ERO podem afetar funções celulares como proliferação, diferenciação e apoptose.

Fonte: Adaptado de MILKOVIC et al. (2019).

As principais substâncias antioxidantes naturais são os compostos fenólicos, metabólitos secundários de vegetais com grande diversidade estrutural e amplamente presentes na alimentação humana. Dentre os compostos fenólicos com importante propriedade antioxidante, destacam-se os ácidos fenólicos - principalmente os derivados do ácido cinâmico, como o ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido rosmarínico -, os flavonóides - como a quercetina (flavonóis), rutina (flavonóide heterosídeo), apigenina e luteolina (flavonas), catequinas (flavanóis) e vários outros -, e os tocoferóis, como a vitamina E (GÜLÇIN, 2012; GÜLÇIN, 2020).

2.3 FUNDAMENTOS DOS ENSAIOS *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

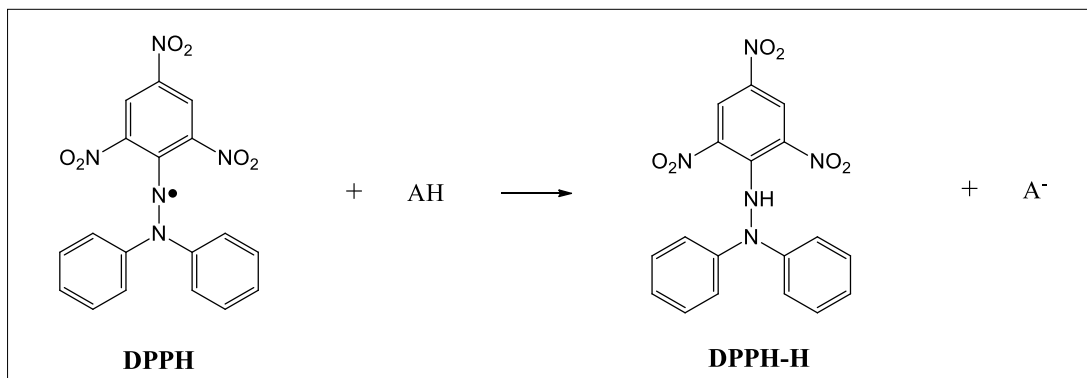
A capacidade antioxidante das substâncias pode ser avaliada através de vários métodos, que diferem entre si com relação ao mecanismo de reação, ambiente e condições da reação e forma de expressar os resultados (SAK, 2014). Esses métodos se baseiam em dois mecanismos principais: sequestro de radicais livres ou grau de inibição da oxidação. O sequestro e eliminação de radicais livres pode ocorrer através da transferência de único elétron ou da transferência de átomo de hidrogênio. Dos métodos descritos a seguir, o sequestro do radical DPPH• baseia-se no mecanismo de transferência de átomo de hidrogênio, enquanto o método do poder de redução do ferro baseia-se no mecanismo de transferência de elétron. O método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico avalia a inibição da peroxidação lipídica (GÜLÇIN, 2012).

O radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) foi descoberto em 1922 por Goldschmidt e Renn em trabalhos envolvendo radicais hidrazila ($R_2NNR\bullet$) que, normalmente, são instáveis. Ao contrário, o radical DPPH• é estável e apresenta coloração intensa, características importantes que justificam sua ampla utilização em soluções, principalmente na avaliação de capacidade antioxidante de substâncias (FOTI, 2015). O pesquisador Blois, em 1958, pela primeira vez sugeriu a sua utilização para esta finalidade (BLOIS, 1958). As principais vantagens do método de sequestro do radical DPPH• são alta sensibilidade, precisão, confiabilidade, boa reprodutibilidade e análise simples e rápida que exige como equipamento apenas um espectrofotômetro padrão. Nesse sentido, trata-se de um ensaio amplamente utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de inúmeros compostos (SAK, 2014).

No método de sequestro do DPPH•, o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil que possui cor roxa é reduzido, através da doação de um átomo de hidrogênio, a 1,1-difenil-2-picril-hidrazina de cor amarela (Figura 8), na presença de moléculas antioxidantes em solução alcóolica

(GÜLÇİN, 2012). Inicialmente, para estudos com produtos naturais, a amostra é diluída com o uso de solventes orgânicos, como o metanol ou etanol, em tubos de ensaio. Em seguida, deve-se adicionar o DPPH•, homogeneizar a solução e incubá-la por 30 minutos à temperatura de 37 °C. A absorvância é mensurada através de espectrofotômetro a 515 nm (HAIDA, HAKIMAN, 2019) e os resultados são expressos em concentração inibitória 50% (IC₅₀), que é a concentração de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração de DPPH•, sendo que um baixo valor de IC₅₀ indica alto poder de atividade antioxidante (GÜLÇİN, 2012).

Figura 8 - Mecanismo da reação no método do sequestro do radical DPPH•.



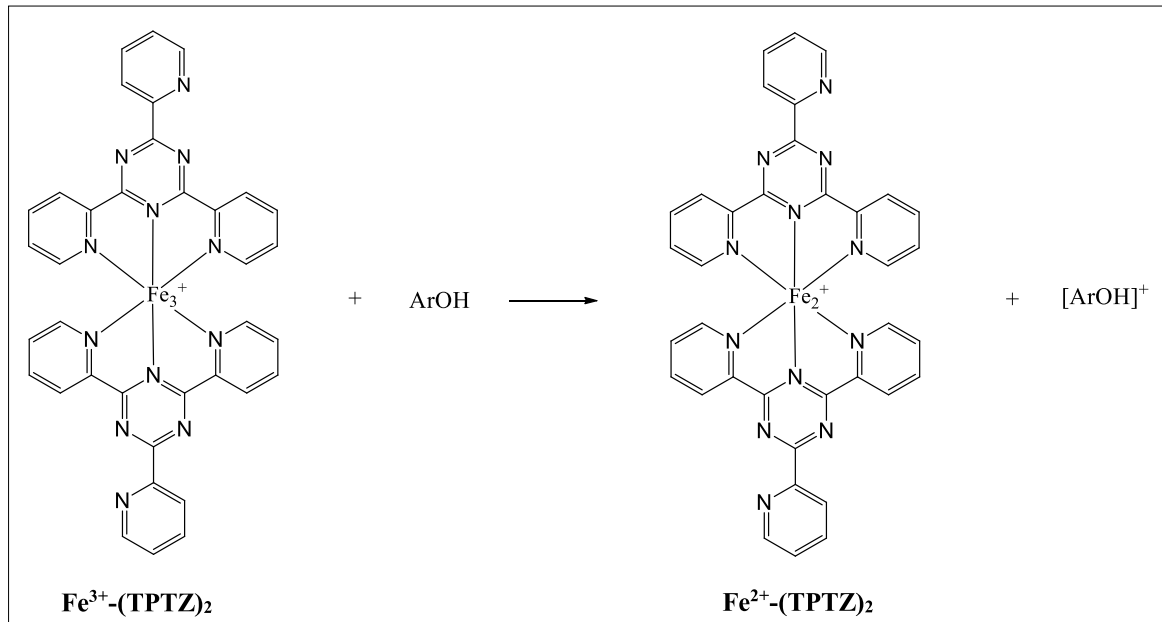
Mecanismo da reação no método do sequestro do radical DPPH•: o antioxidante (AH) doa um átomo de hidrogênio para o radical DPPH, reduzindo-o para DPPH-H.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O método do poder de redução do ferro (*ferric reducing antioxidant power* [FRAP]) avalia a capacidade de um agente antioxidante reduzir o complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) $[\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ para o complexo ferroso $[\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ (Figura 9), que possui cor azul forte. O ensaio é realizado em condições ácidas com o intuito de manter a solubilidade do ferro (GÜLÇİN, 2012). Entretanto, atualmente o ferricianeto de potássio $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tem sido o composto férrico mais utilizado nos ensaios FRAP (MUNTEANU, APETREI, 2021).

A vantagem do método FRAP resume-se no fato de ser uma técnica espectrofotométrica simples, robusta e de baixo custo. Em contrapartida, a sua relevância é questionada, pois os antioxidantes que agem por transferência de átomo de hidrogênio não são detectados por esse método por não serem capazes de reduzir o ferro, visto que a reação de redução do ensaio ocorre por transferência de elétrons (BOLIGON, MACHADO, ATHAYDE, 2014). Além disso, outro ponto questionável é a produção de Fe^{2+} , que é um agente pró-oxidante e pode gerar radicais livres adicionais no meio de reação, como $\bullet\text{OH}$ e H_2O_2 (GÜLÇİN, 2012).

Figura 9 - Mecanismo da reação no método do poder de redução do ferro (FRAP).



Mecanismo da reação no método do poder de redução ferro (FRAP): o antioxidante fenólico (ArOH) doa um elétron para o complexo férrico $[\text{Fe}^{3+}\text{-(TPTZ)}_2]$, reduzindo-o para o complexo ferroso $[\text{Fe}^{2+}\text{-(TPTZ)}_2]$.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico tem como finalidade a avaliação da peroxidação lipídica (GULÇIN, 2020). A técnica foi inicialmente descrita por Marco em 1968 e, em seguida, modificado por Miller em 1971 (MILLER, 1971). O ácido linoleico é um ácido graxo insaturado que, ao sofrer oxidação a partir de espécies reativas de oxigênio, gera radicais livres que irão oxidar o β -caroteno, ocorrendo descoloração da cor amarela (HAIDA, HAKIMAN, 2019). As vantagens dessa técnica são a sua simplicidade e a rápida obtenção de resultados (MILLER, 1971).

Inicialmente, o β -caroteno é dissolvido em clorofórmio e, em seguida, certo volume é transferido para um balão de fundo redondo que contém ácido linoleico purificado e emulsificante Tween 40. A mistura é submetida à rotaevaporação para remoção do clorofórmio e, logo após, é adicionada água destilada oxigenada para a formação de uma emulsão. Por fim, alíquotas da emulsão aquosa são transferidas para uma série de tubos contendo a solução etanólica antioxidante, e colocados em banho-maria à temperatura de 50 °C. As leituras são realizadas com espectrofotômetro a 470 nm, em intervalos regulares, até a descoloração do β -caroteno (MILLER, 1971).

2.4 FUNDAMENTOS DOS ENSAIOS *IN VITRO* DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os ensaios *in vitro* para avaliar a inibição enzimática são considerados relativamente simples. A forma ideal seria a utilização de concentrações fisiológicas de uma enzima humana com o seu substrato real, mimetizando as condições do lúmen intestinal. Entretanto, a maioria dos estudos utilizam enzimas suínas, que correspondem de forma razoável às humanas, enquanto outros estudos utilizam enzimas de leveduras, que apresentam propriedades diferentes (WILLIAMSON, 2013). Os ensaios colorimétricos são amplamente utilizados para avaliar a atividade enzimática, devido à sua praticidade e simplicidade (ZHANG et al., 2020).

Os ensaios colorimétricos que avaliam a inibição da alfa-amilase pancreática normalmente utilizam o próprio amido como substrato e o ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) como reagente cromogênico. O amido, quando hidrolisado pela enzima, gera a maltose, um açúcar redutor que promove a redução do DNS para ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, um produto de cor alaranjada cuja absorvância pode ser mensurada no comprimento de onda de 540 nm (MILLER, 1959). No entanto, os ensaios que avaliam a inibição da alfa-glicosidase utilizam como substrato o ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (ρ NPG) que, após ser hidrolisado pela enzima, gera como produto o ρ -nitrofenol (ρ NP) que possui cor amarela (ZHANG et al., 2020).

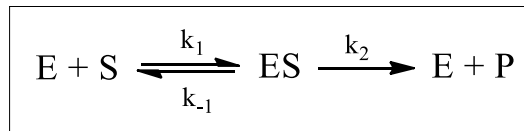
Os ensaios colorimétricos para a inibição da lipase pancreática são executados utilizando como substrato o ρ -nitrofenilpalmitato (ρ NPP), que após ser hidrolisado também gera como produto o ρ -NP que será estimado espectrofotometricamente. O protocolo original empregava o ρ NPP dissolvido em isopropanol e tampão fosfato, porém, era comum se obter uma solução turva que prejudicava a medição espectrofotométrica. Essa turbidez poderia ser causada pela imiscibilidade em água do ρ NPP ou dos ácidos graxos formados após a reação. Dessa forma, para contornar esse problema, o substrato passou a ser dissolvido em Triton X-100, um agente surfactante que promove a dispersão dos ácidos graxos formados, promovendo uma solução límpida (GUPTA, N., RATHI, GUPTA, R., 2002).

Além dos ensaios mencionados, os estudos de cinética também são importantes na avaliação da inibição de enzimas. A cinética das reações enzimáticas é descrita por taxas que estão relacionadas à forma com que os compostos (substratos, produtos, cofatores, inibidores) interagem com a enzima catalisadora. Além de fatores termodinâmicos e estéricos, as concentrações da enzima e dos compostos participantes são os fatores primordiais que interferem na cinética da reação enzimática, juntamente com pH, temperatura e força iônica. Isso porque as concentrações dos participantes da reação influenciam nas colisões entre as suas moléculas, ou seja, quanto maior a concentração, maior é a probabilidade das colisões para que

ocorra a conversão. A influência desses fatores ambientais nas reações enzimáticas foi uma das descobertas mais importantes de Michaelis e Menten em 1913 (WITTIG et al., 2014).

Considerando a reação enzimática descrita abaixo (Figura 10), E, S e P representam enzima, substrato e produto, respectivamente, e ES é o complexo enzima-substrato (considerado um intermediário reativo). A cinética de Michaelis-Menten propõe que os processos enzimáticos ocorrem em estado-estacionário, que é o processo onde as taxas de formação (k_1) e de consumo (k_2) do intermediário reativo são iguais. Dessa forma, não há alteração na concentração do complexo ES (SEIBERT, TRACY, 2014).

Figura 10 - Esquema de reação de única enzima e único substrato.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A equação de Michaelis-Menten foi proposta por Leonor Michaelis e Maud Menten com a publicação de seu artigo sobre cinética enzimática na *Biochemische Zeitschrift* em 1913. Desde então, os autores são considerados os fundadores da enzimologia moderna, já que seus experimentos serviram como um padrão para grande parte dos estudos de cinética enzimática desenvolvidos no último século (SCHNELL, 2014). A equação (Figura 11) relaciona as concentrações de substrato com a velocidade da reação, através dos parâmetros cinéticos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$. A constante de Michaelis-Menten (K_m) é a concentração de substrato na qual a velocidade da reação é metade da máxima, possuindo unidade de concentração, enquanto a $V_{m\acute{a}x}$ é uma taxa, portanto é dada em concentração por unidade de tempo (SEIBERT, TRACY, 2014).

Figura 11 - Equação de Michaelis-Menten.

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

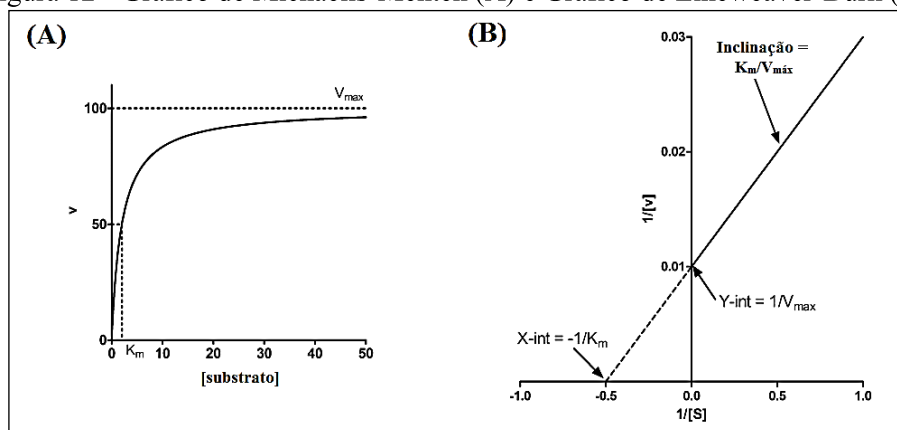
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Os valores desses parâmetros podem ser determinados experimentalmente através de um sistema *in vitro*. Então, é importante determinar a linearidade em relação ao tempo de incubação, uma vez que o valor de $V_{m\acute{a}x}$ é uma taxa de *turnover* em função do tempo (SEIBERT,

TRACY, 2014). Dessa forma, inicialmente, é realizada a medição da taxa inicial de formação do produto em concentrações crescentes de substrato até uma concentração máxima (WITTIG et al., 2014). Em seguida, os dados são plotados em um gráfico de velocidade da reação *versus* concentração de substrato (Figura 12A). Com o gráfico, percebe-se que as mudanças na concentração de substrato resultam em um aumento proporcional na velocidade da reação, em baixas concentrações. Porém, o aumento na velocidade é muito pequeno quando as concentrações de substrato são maiores que K_m (SEIBERT, TRACY, 2014).

Para a análise dos dados, pode-se realizar a transformação linear da equação de Michaelis-Menten para o gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk (Figura 12B), onde serão plotados valores de $1/v$ no eixo das ordenadas *versus* $1/[S]$ no eixo das abscissas. Nessa equação transformada, a inclinação descreve $K_m/V_{máx}$ e a intersecção com o eixo das ordenadas descreve $1/V_{máx}$ (SEIBERT, TRACY, 2014).

Figura 12 - Gráfico de Michaelis-Menten (A) e Gráfico de Lineweaver-Burk (B).



Fonte: Adaptado de SEIBERT; TRACY (2014).

2.5 ESTUDOS *IN SILICO* E *DOCKING* MOLECULAR

Os modernos métodos de química medicinal vêm sendo cada vez mais empregados, pelas indústrias farmacêuticas baseadas em pesquisa, como ferramentas importantes para o estudo das relações estrutura-atividade. O progresso desse ramo acompanhou os avanços nas técnicas espectroscópicas de biomoléculas, como a ressonância magnética nuclear (RMN) e a cristalografia de raios-X, que permitiram a construção de mais de 100.000 estruturas tridimensionais de proteínas. Dessa forma, informações estruturais fundamentais sobre proteínas e complexos proteína-ligante tornaram-se disponíveis. O armazenamento, a organização e a exploração dessas informações exigiram o desenvolvimento de ferramentas

computacionais sofisticadas e robustas. Assim, a associação de métodos *in silico* e experimentais são capazes de proporcionar conhecimento atualizado de aspectos intermoleculares (FERREIRA et al., 2015).

Considerando os recentes avanços nas tecnologias computacionais e a disponibilização de dados estruturais químicos e biológicos de um número crescente de alvos moleculares, houve nas últimas décadas um aumento significativo no uso de abordagens *in silico*, como quimioinformática, modelagem molecular e inteligência artificial. Essas ferramentas permitem a triagem virtual de milhões de compostos disponíveis em bibliotecas, o que torna as buscas por candidatos a fármacos mais promissoras, além de reduzir os custos iniciais na identificação de moléculas biologicamente ativas. Atualmente, estão disponíveis várias técnicas de modelagem molecular para auxiliar o processo de descoberta de fármacos, sendo classificadas em abordagens baseadas em estrutura e ligantes (PINZI, RASTELLI, 2019).

Os métodos de design de drogas baseado em estrutura (SBDD, *structure-based drug design*) utilizam informações de estruturas tridimensionais de alvos biológicos, sendo a triagem virtual baseada em estrutura, *docking* molecular e dinâmica molecular as estratégias de SBDD mais utilizadas. Além disso, os métodos de design de drogas baseado em ligantes (LBDD, *ligand-based drug design*) são uma abordagem distinta que utiliza bibliotecas de pequenas moléculas bioativas, sendo as técnicas mais úteis a triagem virtual baseada em ligantes, busca por similaridade, modelagem QSAR e geração de farmacóforo (FERREIRA et al., 2015).

É essencial nos ramos farmacêuticos de pesquisa e desenvolvimento compreender os mecanismos através dos quais as pequenas moléculas de ligantes reconhecem e interagem com as macromoléculas. O SBDD baseia-se na utilização de dados estruturais tridimensionais de alvos macromoleculares conhecidos (também chamados de receptores) fornecidos experimentalmente ou por modelagem computacional. Dessa forma, é possível analisar cuidadosamente a topologia do sítio de ligação e propriedades eletrostáticas, como distribuição de cargas, e buscar por ligantes com propriedades estereoquímicas e eletrostáticas específicas capazes de gerar alta afinidade de ligação pelo receptor. Logo, os métodos SBDD permitem projetar ligantes potenciais capazes de modular com eficiência o receptor de interesse (FERREIRA et al., 2015).

Uma vez realizada a identificação do composto ativo, pode ser obtida a estrutura tridimensional do complexo ligante-receptor, o que permite a análise das interações intermoleculares primordiais, investigação das conformações de ligação, caracterização de sítios de ligação desconhecidos, estudos mecanísticos e elucidação de mudanças conformacionais induzidas pelo ligante. Assim, as atividades biológicas poderão ser

correlacionas com as informações estruturais, e modificações moleculares poderão ser propostas com o intuito de aumentar a afinidade de novos ligantes para o sítio de ligação. É extremamente importante considerar a flexibilidade do receptor no processo de modelagem, uma vez que mudanças conformacionais podem ocorrer com a ligação do ligante. Nesse sentido, a dinâmica molecular e o *docking* flexível são as técnicas que levam em consideração a questão da flexibilidade (FERREIRA et al., 2015).

2.5.1 Triagem virtual no desenvolvimento de fármacos

Na descoberta de medicamentos, a triagem computacional através de bibliotecas virtuais de compostos com ampla diversidade química e estrutural para selecionar moléculas promissoras é uma das abordagens mais empregadas. Dessa forma, a triagem virtual se tornou um método rápido e econômico para avaliar inúmeros compostos. As estratégias de triagem virtual são classificadas, geralmente, em dois grupos: I) triagem virtual baseada em estrutura e II) baseada em ligante (FERREIRA et al., 2015).

Na triagem virtual baseada em estrutura, os compostos do banco de dados são acoplados com o sítio de ligação do alvo molecular, previamente estabelecido. Em seguida, se obtém uma previsão dos modos de ligação juntamente com uma classificação dos compostos de acordo com suas afinidades, sendo que essa classificação pode ser o único critério de seleção das moléculas promissoras ou podem-se combinar outros critérios de avaliação. De uma forma geral, esse método de triagem virtual baseia-se nas etapas de preparação do alvo molecular, seleção do banco de dados, *docking* molecular e análises pós-*docking* (FERREIRA et al., 2015).

Várias conformações de um mesmo alvo molecular podem ser disponibilizadas e, caso as conformações *holo* e *apo* estejam disponíveis, ambas devem ser consideradas, já que as interações com o ligante geram mudanças conformacionais com detalhes consideráveis. Após a seleção da conformação mais adequada, a mesma deverá ser preparada para os posteriores estudos de *docking*. A etapa de preparação consiste em remover moléculas de água (exceto as envolvidas em interações importantes), adicionar átomos de hidrogênio, calcular cargas parciais e especificar estados de protonação e tautomerização dos resíduos do sítio de ligação. A seleção do banco de dados também é uma etapa fundamental, sendo que aqueles que oferecem grande número de compostos com ampla diversidade estrutural são os mais utilizados. Geralmente, esses bancos de dados permitem pesquisar compostos de acordo com filtros químicos pré-estabelecidos. A etapa de *docking* molecular promove o acoplamento do ligante no sítio de ligação do alvo molecular, sendo que os algoritmos de busca predizem os modos de ligação e

as funções de escore classificam os compostos de acordo com critérios de afinidade. Por fim, a etapa de análise pós-*docking* tem como objetivo decidir quais os compostos se deve priorizar (FERREIRA et al., 2015).

A triagem virtual baseada em ligantes explora descritores moleculares provenientes de compostos ativos já conhecidos, que serão utilizados como filtros nos bancos de dados para a busca por novos compostos com certa semelhança estrutural. Outra abordagem é criar modelos de farmacóforos a partir das características estruturais de compostos conhecidos. Esses modelos tridimensionais de farmacóforos são uma compilação das propriedades químicas e estruturais fundamentais para a atividade biológica (FERREIRA et al., 2015).

2.5.2 *Docking* molecular

Conforme já mencionado, os métodos de design de drogas baseados em estrutura utilizam informações a respeito da estrutura tridimensional do alvo molecular para a busca por ligantes que apresentem complementariedade estrutural e eletrônica. Assim, um dos métodos *in silico* baseados em estrutura mais populares e bem-sucedidos é o *docking* molecular. O termo *docking* foi empregado pela primeira vez em meados da década de 1970 e, desde então, provou ser uma ferramenta importante nos processos de descoberta e desenvolvimento de fármacos (PINZI, RASTELLI, 2019).

O *docking* molecular é uma técnica computacional que possibilita a previsão das conformações e orientações possíveis do ligante no sítio de ligação do alvo macromolecular, através dos algoritmos de busca. Além disso, as funções de escore permitem estimar e classificar a afinidade de uma determinada conformação proposta. Nas últimas décadas, vários softwares foram desenvolvidos, sendo os mais conhecidos o AutoDock, AutoDock Vina, DockThor, GOLD, FlexX e Molegro Virtual Docker (TORRES et al., 2019).

A primeira etapa do *docking* é a obtenção da estrutura tridimensional do alvo molecular que, geralmente, consiste em uma macromolécula biológica, como proteínas, DNA ou RNA. O *Protein Data Bank* (PDB) é uma base de dados que fornece as coordenadas atômicas 3D das estruturas de macromoléculas obtidas experimentalmente. Entretanto, há casos em que a estrutura tridimensional do alvo não está disponível e, para solucionar esse problema, podem ser utilizados métodos de predição computacional como a modelagem comparativa e *ab initio* (TORRES et al., 2019).

A estrutura tridimensional do ligante também pode ser obtida através de bancos de dados online de moléculas pequenas, como PubChem e ZINC. Caso não estejam disponíveis, as

estruturas 2D e até mesmo representações mais simples, como SMILES, podem fornecer as coordenadas atômicas 3D. Para isso, são utilizados vários softwares disponíveis, como o ChemSketch, Avogadro e Concord. Vale lembrar que, inicialmente, é necessária a geometria esteroquimicamente definida do ligante e o estado de protonação correto, uma vez que o programa de *docking* irá explorar as conformações a partir do sítio de ligação do alvo molecular (TORRES et al., 2019).

Com relação ao sítio de ligação nos alvos moleculares, geralmente essa informação está disponível. Contudo, quando não se conhece a região de ligação, duas estratégias podem ser adotadas. A primeira consiste em realizar uma busca sobre toda a estrutura do alvo através da simulação de “*docking* cego”, o que gera um alto custo computacional. A segunda estratégia baseia-se em prever algoritmicamente os locais de ligação mais prováveis através de softwares, como o MolDock, DoGSiteScorer e Fragment Hotspot Maps (TORRES et al., 2019).

Conforme já mencionado, os programas de *docking* baseiam-se em dois fatores fundamentais: algoritmos de busca e funções de escore. O algoritmo de busca cria e analisa as conformações e orientações do ligante no sítio de ligação do alvo molecular, considerando graus de liberdade roto-translacionais do ligante. Cada ligação rotativa aumenta os graus de liberdade do ligante e, conseqüentemente, aumenta as possibilidades de conformações. Portanto, o tamanho geral do ligante e, principalmente, um número elevado de ligações rotativas, pode impactar negativamente a maioria dos algoritmos, tanto com relação ao custo computacional quanto à precisão do *docking* (TORRES et al., 2019).

As estratégias de busca podem ser classificadas em sistemáticas, estocásticas e determinísticas. Algoritmos de busca sistemáticos exploram o grau de liberdade do ligante através da construção incremental de fragmentos do ligante. Algoritmos estocásticos realizam mudanças aleatórias nas ligações rotacionáveis, explorando várias conformações possíveis que, mas não garantem a melhor solução. Algumas simulações estocásticas mais comuns incluem Monte Carlo e algoritmos evolucionários (incluindo algoritmos genéticos). Já nos algoritmos determinísticos, a estratégia mais comum é a dinâmica molecular, que permite explorar a energia livre do sistema e cada conformação e orientação do ligante gerada baseia-se no estado de energia anterior, o que gera um alto custo computacional (TORRES et al., 2019).

Após milhares de conformações e orientações propostas para o complexo ligante-receptor através dos algoritmos de busca, as funções de escore são aplicadas para classificá-las, podendo se basear na energia de ligação, energia livre ou através de uma medida numérica qualitativa que aproxime as energias de interação. As funções de escore podem ser classificadas em empíricas, campos de força e baseadas em conhecimento (TORRES et al., 2019).

As funções de escore empíricas derivam-se das relações estrutura-atividade quantitativas com o intuito de prever a afinidade de ligação de forma altamente precisa, baseando-se em informações de afinidade de ligação obtidas experimentalmente. As funções de campos de força consistem de um somatório das energias, sendo a energia potencial a responsável pelos termos ligados, como ângulos e comprimentos de ligação, e termos não-ligados, como eletrostática e Van der Waals. Por fim, as funções baseadas em conhecimento fundamentam-se nas estruturas tridimensionais do complexo ligante-alvo, determinadas experimentalmente, para observar a frequência de interações de pares de átomos (TORRES et al., 2019).

2.6 O GÊNERO *ERYNGIUM* L.

O gênero *Eryngium*, pertencente à família Apiaceae, é considerado o mais abundante e, provavelmente, o mais complexo taxonomicamente, uma vez que compreende cerca de 300 espécies distribuídas em regiões temperadas de todos os continentes, principalmente América do Sul, Europa, Ásia, norte da África e Austrália. Entretanto, há uma desigualdade na distribuição das espécies no globo terrestre, sendo reconhecidos dois centros de diversidade: centro-leste da América do Sul (sul do Brasil, nordeste da Argentina e Uruguai) e centro-oeste do México, no hemisfério ocidental; e Mediterrâneo ocidental e sudoeste da Ásia, no hemisfério oriental. Além disso, cerca de dois terços das espécies estão localizados em continente americano (CALVIÑO, MARTÍNEZ, DOWNIE, 2008).

As espécies de *Eryngium* podem ser diferenciadas facilmente daquelas pertencentes a outros gêneros da família Apiaceae, graças às suas inflorescências em capítulos e brácteas únicas por flor. Apesar disso, trata-se de um gênero com características morfológicas extremamente variáveis, podendo ter plantas que são prostradas e apresentam apenas alguns centímetros de comprimento, enquanto outras são eretas e chegam até 3 metros de altura (CALVIÑO, MARTÍNEZ, DOWNIE, 2008).

As partes aéreas das espécies de *Eryngium* contêm substâncias como saponinas, flavonoides e óleo essencial, enquanto partes subterrâneas possuem saponinas triterpênicas, monoterpênicos, compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), derivados de cumarina, óleo essencial e outros. A composição do óleo essencial é variável dentre as espécies, sendo os metabólitos mais comuns germacrene D, α -pineno, cariofileno, α e β -selineno, limoneno e outros, além de hidrocarbonetos e compostos aromáticos (ERDEM et al., 2015).

Ao longo da história da humanidade, plantas do gênero *Eryngium* têm sido utilizadas para tratar dor, feridas, queimaduras, hemorróidas e doenças venéreas (LEV, 2002). No mundo contemporâneo, são popularmente utilizadas na culinária e para fins medicinais (ERDEM et al., 2015), atuando como agentes anti-inflamatório, antitussígeno, hipoglicemiante, diurético, afrodisíaco e para o tratamento de distúrbios gastrointestinais (diarreia) e como antídoto para venenos (MEDBOUHI et al., 2019).

2.6.1 *Eryngium foetidum* L. e (E)-2-dodecenal

Eryngium foetidum L. é oriunda da América tropical e das Índias Ocidentais, apesar de ser frequentemente cultivada no sul da Ásia, África tropical, ilhas do Pacífico e regiões quentes do sul da Europa (PAUL, SEAFORTH, TIKASINGH, 2011). No Brasil, é cultivada principalmente na região Amazônica, sendo conhecida por vários nomes populares, como chicória, chicória-do-pará, chicória-da-amazônia, coentrão, coentro japonês e coentro africano. Na culinária brasileira, é utilizada como tempero de pratos à base de peixes, como o pato no tucupi e tacacá, e também carnes, saladas e feijão (DA SILVA et al., 2016).

A hortalica começou a ser utilizada pelos chineses no sudeste da Ásia, por volta da década de 1880, como um condimento substituto do coentro (*Coriandum sativum* L.) devido ao seu cheiro pungente semelhante. Além da culinária, também é um item valioso para as indústrias de perfumaria e cosmética, graças ao seu óleo essencial que dispõe de elevado valor econômico. Aliás, são descritos inúmeros usos tradicionais da planta, principalmente para fins medicinais no tratamento de várias doenças como hipertensão, diabetes, reumatismo, asma, malária, doenças venéreas, dor, envenenamento e outros (PAUL, SEAFORTH, TIKASINGH, 2011).

Devido à suas várias aplicações medicinais, *E. foetidum* tem sido alvo de vários estudos, os quais confirmaram as atividades anti-inflamatória e antioxidante (MEKHORA et al., 2012; DAWILAI et al., 2013), anti-inflamatória tópica (GARCÍA et al., 1999), antimicrobiana contra cepas clínicas de *H. pylori* (MABEKU, BILLE, NGUEPI, 2016), antiparasitária contra o gênero *Leishmania* (ROJAS-SILVA et al., 2014), anti-helmíntica contra larvas de *Strongyloides stercoralis* (FORBES et al., 2014), anticlastogênica (PROMKUM et al., 2012) e ação preventiva de carcinogênese colorretal (PROMTES et al., 2016).

A chicória é uma erva tropical com crescimento favorável em altas temperaturas e ambientes úmidos, condições típicas da região amazônica. Além disso, o seu cultivo requer solos pouco ácidos (DA SILVA et al., 2016). Com relação à morfologia vegetal, suas raízes são

carnudas, as hastes são comumente ramificadas, as inflorescências são esbranquiçadas e as folhas são oblanceoladas com margens dentadas, com comprimento variando de 8 a 20 centímetros (Figura 13). A planta é glabra por toda a sua extensão e possui odor intenso e pungente (PAUL, SEAFORTH, TIKASINGH, 2011).

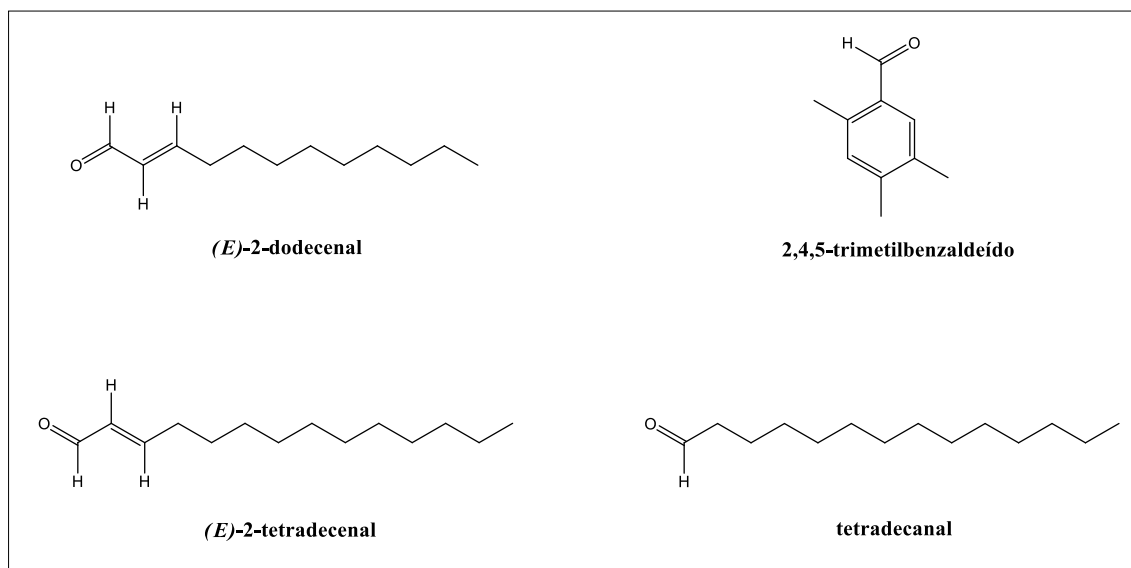
Figura 13 - Morfologia foliar externa de *Eryngium foetidum*.



Fonte: Próprio autor (2022).

Análises fitoquímicas das folhas dessa espécie apontam a ocorrência de flavonoides, taninos e cumarinas, mas não houve relatos de alcaloides. Dessa forma, os principais constituintes das folhas são triterpenoides não ligados, α -colesterol, brassicasterol, campesterol e estigmasterol totalizando 95%, enquanto clerosterol, β -sitosterol, δ -5-avenasterol, δ -(5)-24-estigmastadienol e δ -7-avenasterol se encontram na porção restante. Além disso, as partes aéreas de *E. foetidum* apresentam abundância em cálcio, ferro, caroteno, riboflavina, vitaminas A, B e C e óleos essenciais. Os óleos essenciais apresentam concentrações muito significativas de aldeídos (os principais estão representados na figura 14), tendo como constituinte principal o (*E*)-2-dodecenal, também conhecido como “eryngial”, nome atribuído quando foi relatado pela primeira vez (PAUL, SEAFORTH, TIKASINGH, 2011).

Figura 14 - Estruturas químicas dos principais aldeídos encontrados no óleo essencial das folhas de *Eryngium foetidum*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O estudo realizado por Thomas et al. (2017) avaliou e comparou a composição de óleos essenciais das folhas, caule e raízes de *E. foetidum* cultivada na Nigéria. Os óleos essenciais foram caracterizados por elevadas concentrações de aldeídos aromáticos e alifáticos, saturados e insaturados. No entanto, suas composições foram quali e quantitativamente distintas. No óleo das folhas, os constituintes majoritários foram o (*E*)-2-dodecenal (28,43%) seguido por 13-tetradecenal (27,45%), dodecanal (14,59%) e 2,4,5-trimetilbenzaldeído (10,77%); no óleo do caule, dodecanal (20,21%), 2,4,5-trimetilbenzaldeído (18,43%) e (*E*)-2-dodecenal (8,27%) foram mais abundantes; e, no óleo das raízes, os componentes dominantes foram o 2,4,5-trimetilbenzaldeído (56,08%), 13-tetradecenal (9,26%) e (*E*)-2-dodecenal (7,65%).

Além da variação observada na comparação entre diferentes partes da planta, nota-se também que o (*E*)-2-dodecenal tem sido descrito em diferentes concentrações nos óleos essenciais das folhas de *E. foetidum* cultivadas em diferentes regiões do mundo. Por exemplo, o composto foi considerado componente majoritário do óleo essencial do Vietnã (45,5%) (LECLERCQ et al., 1992), da Malásia (59,72%) (WONG et al., 1994) e de Bangladesh (37,4%) (CHOWDHURY, NANDI, YUSUF, 2007). Porém, foi encontrado em menor concentração (5,67%) no óleo essencial de Cuba (PINO, ROSADO, FUENTES, 1997). Em São Tomé e Príncipe, (*E*)-2-dodecenal foi citado na faixa entre 15,9% a 37,5% (MARTINS et al., 2003), enquanto na Colômbia a concentração foi em torno de 43,96% (JARAMILLO, DUARTE, MARTELO, 2011).

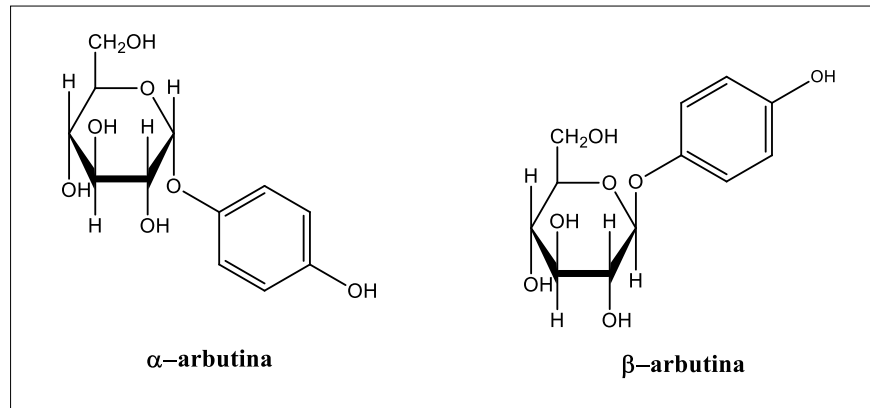
Em *E. foetidum*, o (*E*)-2-dodecenal foi responsável pelas atividades antioxidante (THOMAS et al., 2017) e também anti-helmíntica, devido à toxicidade aguda contra larvas infectantes de *Strongyloides stercoralis* (FORBES et al., 2014). Entretanto, esse composto também pode ser encontrado em outras espécies. Por exemplo, no extrato metanólico de *Coriandrum sativum* (coentro), o (*E*)-2-dodecenal promoveu a abertura dos canais de potássio voltagem dependente da subfamília Q (KCNQ) isoforma neuronal KCNQ2/3, conferindo ação anticonvulsivante à planta (MANVILLE, ABBOTT, 2019). No óleo essencial das folhas de coentro, apresentou inibição do crescimento de promastigotas de *Leishmania donovani* em culturas *in vitro* (DONEGA et al., 2014), enquanto no extrato hexânico das folhas de *Etligeria coccínea*, o (*E*)-2-dodecenal mostrou-se ativo contra cepas de bactérias gram-positivas clinicamente relevantes, sendo o responsável pela propriedade antimicrobiana da planta (DANIEL-JAMBUN et al., 2017). Além disso, a presença do aldeído foi relatada no óleo essencial da erva *Ducrosia anethifolia*, porém, em pequena concentração (5,9% dos compostos oxigenados) (JANSSEN et al., 1984).

Considerando os dados relatados, estudos vêm demonstrando que o “eryngial” dispõe de grande potencial para um composto de valor medicinal, sendo considerado um dos principais candidatos a pesquisas adicionais para o desenvolvimento de medicamentos. Além disso, o (*E*)-2-dodecenal possui uma estrutura química simples, o que favorece a sua síntese em laboratórios para obter um fármaco potencialmente seguro e de baixo custo para aplicação na terapêutica (FORBES et al., 2014).

2.7 ARBUTINA

A arbutina é um glicopiranosídeo de hidroquinona que apresenta dois isômeros: α -arbutina (4-hidroxifenil- α -glicopiranosídeo) e β -arbutina (4-hidroxifenil- β -glicopiranosídeo), que se distinguem pela forma como a hidroquinona se liga ao carbono anomérico da molécula de glicose (Figura 15). A α -arbutina não é obtida a partir de fontes naturais. Em contrapartida, a β -arbutina - também citada somente como arbutina - é encontrada em várias plantas medicinais, como nas famílias Asteraceae, Lamiaceae, Apiaceae, em espécies do gênero *Origanum* (principalmente na *O. majorana*), nas folhas de uva-de-urso (*Arctostaphylos uva-ursi*), nos mirtilos e outros (SAEEDI et al., 2021).

Figura 15 - Estruturas químicas das isoformas da arbutina (α -arbutina e β -arbutina).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Amplamente utilizada em preparações cosméticas, a arbutina é um agente útil no tratamento de distúrbios de hiperpigmentação da pele, ou seja, quando há excessiva produção de melanina ou o seu acúmulo nas camadas da pele. Esses distúrbios englobam os melasmas, hiperpigmentação periorbital (olheiras), lentiginas, riscos de câncer de pele e outros, que podem se desenvolver mediante a exposição à radiação ultravioleta, mediadores inflamatórios, distúrbios hormonais, expressão aumentada da melanogênese e outros. A propriedade despigmentante da arbutina reside na sua capacidade inibir a enzima tirosinase, que desempenha um papel fundamental na síntese de melanina (SAEEDI et al., 2021).

Além dos distúrbios de hiperpigmentação da pele, as formulações contendo arbutina vêm sendo utilizadas para tratamento de várias patologias, como diabetes (LV et al., 2019), osteoporose (BONIFACIO et al., 2020), câncer (JIANG et al., 2018; SAFARI et al., 2020; WANG et al., 2021) e infecção do trato urinário (MIGAS, KRAUZE-BARANOWSKA, 2015), além de apresentar propriedades antioxidante (BONIFACIO et al., 2020), anti-inflamatória (LEE, KIM, 2012), antienvhecimento (ZHOU et al., 2017), hepatoprotetora (MIRSHAIVALAD et al., 2016) e outras.

O estudo de Takii e colaboradores (1997) investigou o efeito de vários glicosídeos fenólicos sobre a redução da glicose pós-prandial em camundongos. Dentre os glicosídeos, a arbutina apresentou redução significativa da glicose pós-prandial dos animais. Os autores sugeriram que esses glicosídeos poderiam inibir o transporte de glicose ou retardar a sua absorção, sendo úteis no tratamento de indivíduos diabéticos. Estudos que investigam a relação entre a arbutina e o metabolismo dos carboidratos e lipídios são ainda escassos na literatura. Nesse sentido, é relevante compreender o mecanismo através do qual a arbutina pode atuar e auxiliar na redução dos níveis plasmáticos de glicose, tornando promissora a sua aplicabilidade no manejo de distúrbios do metabolismo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos extratos de *Eryngium foetidum*, do (*E*)-2-dodecenal e da arbutina sobre a inibição de mecanismos oxidativos e da atividade de enzimas digestivas, com o intuito de relacioná-los à prevenção e/ou tratamento de distúrbios metabólicos associados a processos oxidativos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos das folhas de *E. foetidum*.
- Determinar os teores de fenóis totais e flavonoides totais nos extratos de *E. foetidum*.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* através dos métodos de sequestro do radical DPPH•, poder de redução do ferro (FRAP) e co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.
- Avaliar a inibição *in vitro* das enzimas digestivas alfa-amilase pancreática, alfa-glicosidase e lipase pancreática.
- Realizar estudos de *docking* molecular para avaliar as afinidades de ligação, conformações e interações intermoleculares dos ligantes com o sítio catalítico das enzimas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Eryngium foetidum* foram coletadas no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Uma exsicata da planta se encontra registrada no Herbário Leopoldo Krieger CESJ da UFJF, sob tombo de número 73211.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Após a coleta, parte das folhas de *E. foetidum* foram submetidas à desidratação em estufa e posteriormente à trituração, para a obtenção do material vegetal seco, enquanto uma parte fresca foi diretamente triturada para a aquisição do extrato. Ambos os materiais vegetais, fresco e seco, foram submetidos ao processo de extração por percolação com etanol 100%, obtendo-se o extrato das folhas secas (EFS) e o extrato das folhas frescas (EFF). Os extratos foram concentrados através de evaporador rotatório e os produtos finais foram armazenados em dessecador contendo sílica até o momento das análises.

4.3 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS

A determinação dos teores de fenóis totais foi realizada pelo método do Folin-Ciocalteu, conforme o descrito por Sousa e colaboradores (2007). Inicialmente, como padrão, foi preparada uma solução de ácido gálico (Vetec[®]) na concentração de 1 mg/mL em etanol. Para a obtenção da curva de calibração, essa solução estoque de ácido gálico foi submetida a diluições, em triplicatas, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Diluições da solução estoque de ácido gálico para obtenção da curva de calibração para determinação dos teores de fenóis totais.

Tubos	Concentração (µg/mL)	Solução estoque (µL)	Volume de etanol (µL)	Volume total (mL)
1	200	200	800	1
2	280	280	720	1
3	360	360	640	1
4	440	440	560	1
5	520	520	480	1
6	600	600	400	1
7	680	680	320	1
8	760	760	240	1
9	840	840	160	1

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Em seguida, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram transferidas para tubos falcon, sendo adicionados 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®) e 6 mL de água destilada. Os tubos foram então submetidos à homogeneização em vórtex por 1 minuto. Logo após, foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 15% e agitados por mais 30 segundos. Então, os tubos tiveram os seus volumes ajustados para 10 mL, adicionando-se 1,4 mL de água destilada. Os brancos foram constituídos por 100 µL de etanol e todos os demais reagentes. Após 2 horas de reação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram realizadas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro (UV-1800, SHIMADZU®) no comprimento de onda de 760 nm. A curva de calibração foi construída utilizando-se as médias das absorvâncias de cada concentração de ácido gálico e, através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obteve-se a equação da reta.

Para a quantificação dos teores de fenóis totais nas amostras, foram preparadas soluções estoque - extratos EFS e EFF - na concentração de 2 mg/mL em etanol. Em seguida, as soluções estoque foram submetidas a diluições, em triplicatas, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Diluições das soluções estoque dos extratos para determinação dos teores de fenóis totais.

Tubos	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Solução estoque (mL)	Volume de etanol (mL)	Volume total (mL)
1	1200	0,6	0,4	1
2	1400	0,7	0,3	1
3	1600	0,8	0,2	1
4	1800	0,9	0,1	1
5	2000	1	0	1

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Após as diluições, alíquotas de 100 μL foram transferidas para tubos falcon, sendo que o preparo das reações e as leituras espectrofotométricas foram realizadas da mesma forma descrita para o padrão. Para a determinação dos teores de fenóis totais, as absorvâncias das amostras foram substituídas na variável “y” da equação obtida para o padrão e os cálculos foram realizados, obtendo-se valores em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mgEAG/g).

4.4 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FLAVONOIDES TOTAIS

A determinação dos teores de flavonoides totais foi realizada pelo método do cloreto de alumínio (AlCl_3), conforme o descrito por Sobrinho e colaboradores (2008). Inicialmente, como padrão, foi preparada uma solução estoque de rutina (Sigma-Aldrich[®]) na concentração de 0,5 mg/mL em etanol. Para a obtenção da curva de calibração, esta solução estoque foi submetida a diluições, em triplicatas, conforme a Tabela 3. Para isto, foram adicionados aos tubos 400 μL de etanol, 120 μL de ácido acético, 2000 μL de solução de piridina 20% em etanol, 500 μL de solução de cloreto de alumínio (Synth[®]) 5% em etanol e o volume necessário de água destilada para completar o volume dos tubos para 5 mL.

Tabela 3 - Diluições das soluções estoque de rutina e dos extratos para determinação dos teores de flavonoides totais.

Tubos	Solução Rutina (µL)	Etanol (µL)	Solução amostra (µL)	Ácido acético (µL)	Solução piridina (µL)	Solução AlCl ₃ (µL)	Água (µL)	Concentração (µg/mL)
1	20	400	-	120	2000	500	1960	2
2	50	400	-	120	2000	500	1930	5
3	100	400	-	120	2000	500	1880	10
4	200	400	-	120	2000	500	1780	20
5	300	400	-	120	2000	500	1680	30
6	400	400	-	120	2000	500	1580	40
7	500	400	-	120	2000	500	1480	50
8	600	400	-	120	2000	500	1380	60
Extratos	-	-	400	120	2000	500	1980	800
Branco	-	400	-	120	2000	500	1980	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Após 30 minutos de reação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram realizadas as leituras as absorvâncias em espectrofotômetro (UV-1800, SHIMADZU®) no comprimento de onda de 405 nm. Os brancos foram constituídos por etanol e todos os demais reagentes. A curva de calibração foi construída utilizando-se das médias das absorvâncias de cada concentração de rutina e, através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obteve-se a equação da reta.

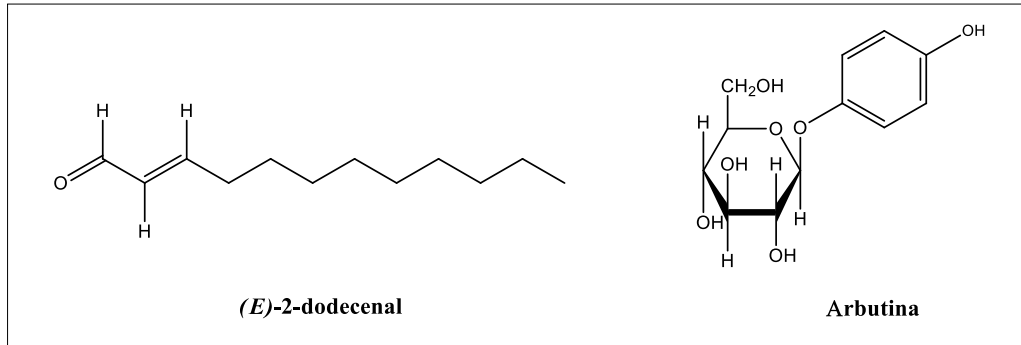
Para a quantificação dos teores de flavonoides totais nas amostras, foram preparadas soluções estoque - extratos EFS e EFF - na concentração de 10 mg/mL em etanol. Em seguida, as soluções estoque foram submetidas a diluições, em triplicatas, de acordo com a Tabela 3. O preparo das reações e as leituras espectrofotométricas foram realizadas da mesma forma descrita para o padrão. Para a determinação dos teores de flavonoides totais, as absorvâncias das amostras foram substituídas na variável “y” da equação obtida para o padrão e os cálculos foram realizados, obtendo-se valores em miligramas equivalentes de rutina por grama de extrato (mgERU/g).

4.5 (E)-2-DODECENAL E ARBUTINA

O (E)-2-dodecenal e a arbutina (Figura 16) foram adquiridos comercialmente através da Sigma-Aldrich®, sendo os números de identificação e números de registro do CAS (*American*

Chemical Society): W240206 e 20407-84-5, para o (*E*)-2-dodecenal, e A4256 e 497-76-7 para a arbutina.

Figura 16 - Estruturas químicas do (*E*)-2-dodecenal e da arbutina.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Método do sequestro do radical DPPH•

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi realizada espectrofotometricamente, conforme o descrito por Mensor e colaboradores (2001). Inicialmente, foram preparadas soluções estoque das amostras - EFS, EFF, (*E*)-2-dodecenal e arbutina - na concentração de 1 mg/mL em etanol. Como controle positivo foi utilizada uma solução de rutina (Sigma-Aldrich®) na mesma concentração. A partir das soluções estoque, foram realizadas diluições em etanol, conforme as tabelas a seguir:

Tabela 4 - Diluições da solução estoque de rutina para o método de sequestro do radical DPPH•.

Tubos	Solução estoque (μL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	20	1
2	60	3
3	100	5
4	200	10
5	300	15
6	600	30
7	800	40
8	900	45
9	1.200	60

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 5 - Diluições da solução estoque de (*E*)-2-dodecenal para o método de sequestro do radical DPPH•.

Tubos	Solução estoque (μL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	100	5
2	300	15
3	500	25
4	1.000	50
5	1.500	75
6	2.000	100
7	2.500	125
8	3.000	150
9	5.000	250
10	10.000	500
11	15.000	750

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 6 - Diluições das soluções estoque da arbutina e dos extratos para o método de sequestro do radical DPPH•.

Tubos	Solução estoque (µL)	Concentração (µg/mL)
1	20	1
2	100	5
3	200	10
4	350	17,5
5	500	25
6	1.000	50
7	1.500	75
8	2.500	125
9	5.000	250
10	10.000	500
11	15.000	750

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Em seguida, alíquotas de 2,5 mL de cada diluição foram transferidas, em triplicatas, para tubos de ensaio e foi adicionado 1,0 mL de solução de DPPH• (Sigma-Aldrich®) 0,3 mM. Após 30 minutos de reação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram realizadas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro (UV-1800, SHIMADZU®) no comprimento de onda de 515 nm. O branco das amostras e da rotina constituiu-se de 2,5 mL de suas respectivas soluções estoque e 1,0 mL de etanol, sendo realizado para cada uma das concentrações preparadas. O controle negativo foi constituído por 2,5 mL de etanol e 1,0 mL de solução de DPPH•, sendo seu branco composto somente por etanol.

Os valores de absorvância obtidos foram utilizados para os cálculos de porcentagem de atividade antioxidante (%AA), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\%AA = \left[\frac{(Abs amostra - Abs branco amostra)}{(Abs controle - Abs branco controle)} \times 100 \right]$$

Onde, *Abs amostra*: absorvância da amostra/rutina de determinada concentração; *Abs branco da amostra*: absorvância do branco da amostra/rutina de determinada concentração; *Abs controle*: absorvância do controle negativo; *Abs branco do controle*: absorvância do branco do controle negativo.

Após os cálculos, os valores de porcentagem de atividade antioxidante foram utilizados para a construção de gráficos cujo eixo da abscissa corresponde à concentração da

amostra/rutina e o eixo da ordenada à %AA. Através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foram determinadas as equações das retas, as quais foram utilizadas para cálculo da concentração inibitória 50% (IC₅₀), substituindo-se a variável “y” da equação por 50.

A capacidade antioxidante da arbutina e do (*E*)-2-dodecenal também foi avaliada com relação à cinética da reação com o radical DPPH•, de acordo com as categorias: cinética rápida (tempo de reação menor que 30 minutos), média (tempo de reação entre 30 minutos e 1 hora) e lenta (tempo de reação maior que 1 hora) (MISHRA, OJHA, CHAUDHURY, 2012). As soluções estoque das amostras (1 mg/mL) foram submetidas a diluições, em triplicatas, de acordo com a tabela 7. Em seguida, 2,5 mL de cada diluição foram transferidos para tubos de ensaio, onde foi adicionado 1,0 mL da solução de DPPH• 0,3 mM. As absorbâncias foram determinadas em intervalos de 15 e 30 minutos nos tempos t₀, t₁₅, t₃₀, t₄₅, t₆₀, t₇₅, t₉₀, t₁₂₀, t₁₅₀, t₁₈₀ e t₂₁₀ em espectrofotômetro (UV-1800, SHIMADZU®) sob comprimento de onda de 515 nm (MENSOR et al., 2001). O branco das amostras foi constituído por 2,5 mL das soluções e 1,0 mL de etanol. Os valores de absorvância foram utilizados para os cálculos da %AA, que foram plotados em gráficos %AA *versus* tempo (minutos).

Tabela 7 - Diluições das soluções estoque de arbutina e (*E*)-2-dodecenal para cinética de reação com o radical DPPH•.

Tubos	Solução estoque (µL)	Concentração (µg/mL)
1	500	25
2	1000	50
3	2500	125
4	5000	250
5	10000	500
6	15000	750

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.6.2 Método do poder de redução do ferro (FRAP)

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder de redução do ferro (FRAP) foi realizada de acordo com o descrito por Oyaizu (1986). Inicialmente, foram preparadas soluções estoque das amostras - EFS, EFF, arbutina e (*E*)-2-dodecenal - a 1 mg/mL em metanol. Como controle positivo foi utilizada uma solução de rutina (Sigma-Aldrich®) na mesma

concentração. Em seguida, alíquotas foram transferidas para tubos falcon, em triplicatas, para o preparo das diluições de acordo com as tabelas mostradas abaixo.

Tabela 8 - Diluições da solução estoque de rutina para o método de poder de redução do ferro.

Tubos	Solução estoque (μL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	10	10
2	25	25
3	50	50
4	75	75
5	100	100
6	125	125
7	150	150
8	200	200
9	250	250
10	300	300
11	350	350
12	400	400
13	500	500
14	600	600
15	700	700

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 9 - Diluições das soluções estoque das amostras para o método de poder de redução do ferro.

Tubos	Solução estoque (μL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
1	100	100
2	200	200
3	300	300
4	400	400
5	500	500
6	600	600
7	700	700
8	800	800
9	900	900
10	1000	1000

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Aos tubos falcon, foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato de potássio 20 μ M (pH 6,6) e 2,5 mL de solução de ferricianeto de potássio [$K_3Fe(CN)_6$] (Vetec[®]) 1% e foram incubados em estufa a 50 °C por 20 minutos. Então, foram adicionados 2,5 mL de solução de ácido tricloroacético (CCl_3CO_2H) (Synth[®]) 10% e os tubos foram submetidos a centrifugação a 3000 rpm por 8 minutos. Após centrifugação, uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante foi transferida para tubos de ensaio, onde foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de cloreto férrico ($FeCl_3$) (Vetec[®]) 0,1%. Em seguida, após 30 minutos de reação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram realizadas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro (UV-1800, SHIMADZU[®]) no comprimento de onda de 700 nm. O branco das amostras foi constituído por 1 mL de água e todos os demais reagentes. Os valores de absorvância obtidos foram utilizados para a construção de gráficos cujo eixo da abscissa corresponde à concentração das amostras e o eixo da ordenada corresponde às absorvâncias. Através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, foram obtidas as equações das retas que foram utilizadas para calcular a concentração inibitória de 50% (IC_{50}), substituindo-se a variável “y” da equação por 0,5.

4.6.3 Método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico

O método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico foi realizado conforme o descrito por Koleva e colaboradores (2002). Inicialmente, foi preparada uma solução de β -caroteno (Sigma-Aldrich[®]) na concentração de 0,2 mg/mL em clorofórmio. Em seguida, 1,0 mL desta solução foi transferida para um balão de rotaevaporação contendo 25 μ L ácido linoléico (Sigma-Aldrich[®]) e 200 mg de Tween 40 (Sigma-Aldrich[®]). Essa mistura foi submetida à rotaevaporação em banho de água a 40 °C durante 15 minutos, para a remoção do clorofórmio, seguida de adição de 50 mL de água destilada oxigenada, lentamente e sob agitação constante, para a formação de uma emulsão. Paralelamente, foram preparadas soluções das amostras - EFS, EFF, arbutina e (*E*)-2-dodecenal - a 250 μ g/mL em etanol, e dos controles positivos - BHT e rutina - a 25 μ g/mL em etanol. Alíquotas de 375 μ L das soluções de amostra/controlado positivo foram adicionados em tubos de ensaio, em triplicatas, seguido pela adição de 3.125 μ L da emulsão. O controle negativo foi constituído por 375 μ L de etanol e 3.125 μ L da emulsão, enquanto o branco foi constituído apenas por 3,5 mL de etanol. Por fim, foram realizadas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro (UV-1800, SHIMADZU[®]) no comprimento de onda de 492 nm nos tempos t_0 , t_{15} , t_{30} , t_{45} , t_{60} , t_{75} , t_{90} e t_{105} . A porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (%I) foi calculada através da fórmula:

$$\%I = \left(\frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \right) \times 100$$

Onde, *Abs controle*: absorvância do controle no t_0 menos a absorvância no t_{105} . *Abs amostra*: absorvância da amostra no t_0 menos a absorvância no t_{105} .

Além disso, os valores de absorvância obtidos foram utilizados para a construção de gráficos absorvância *versus* tempo (minutos), para visualizar o decaimento das absorvâncias em função do tempo, resultante da descoloração do β -caroteno.

4.7 ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE AS ENZIMAS DIGESTIVAS

4.7.1 Ensaio de inibição da alfa-amilase pancreática

A avaliação da inibição da atividade da alfa-amilase pancreática foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico proposto por Pereira e colaboradores (2011), com algumas modificações. A solução de alfa-amilase pancreática suína tipo VI-B (Sigma-Aldrich®) foi preparada na concentração de 1 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,05 mol/L contendo CaCl₂ 0,01 mol/L (pH 7,0). Como substrato foi utilizada uma solução de amido solúvel (Synth®) 1% (p/v). A acarbose (Sigma-Aldrich®) na concentração de 25 µg/mL em tampão foi utilizada como controle positivo. As amostras foram preparadas nas seguintes concentrações: arbutina a 75 mg/mL, (*E*)-2-dodecenal a 25 mg/mL e EFS e EFF a 1 mg/mL, todos solubilizados em tampão. Aos tubos de ensaio, em triplicatas, foram adicionados 150 µL de amostra/controlado e 150 µL de enzima. Os tubos foram pré-incubados em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados aos tubos 300 µL de substrato e os mesmos foram incubados em banho-maria a 37 °C por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 minutos). Como reagente cromogênico foi utilizado o ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich®), preparado em uma solução contendo tartarato de potássio e sódio (Synth®) e hidróxido de sódio (Synth®). Foram adicionados aos tubos de ensaio 600 µL da solução de DNS antes da primeira leitura. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (UV-1800, SHIMADZU®) no comprimento de onda de 540 nm. Os valores de absorvâncias obtidos foram utilizados para a construção de gráficos cujo eixo da abscissa corresponde ao tempo (minutos) e o eixo da ordenada corresponde às absorvâncias. Através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foram obtidas as equações das retas, cujos coeficientes angulares foram

utilizados para os cálculos de porcentagem de inibição enzimática (%I), de acordo com a equação:

$$\%I = \left[\frac{(A - a) - (B - b)}{(A - a)} \right] \times 100$$

(Equação 1)

Onde:

A: valor do coeficiente angular da leitura apenas com enzima e substrato.

a: valor do coeficiente angular da leitura apenas com substrato.

B: valor do coeficiente angular da leitura da enzima, com substrato e com amostra/controle.

b: valor do coeficiente angular do substrato com amostra/controle.

4.7.2 Ensaio de inibição da alfa-glicosidase

A avaliação da inibição da atividade da alfa-glicosidase foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico proposto por Chelladurai e Chinnachamy (2018), com algumas modificações. A solução de alfa-glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich®) foi preparada na concentração de 0,1 U/mL em tampão citrato-fosfato 0,1 mol/L (pH 7,0). O substrato ρ -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (Carbosynth®) foi preparado a 2,5 mmol/L na mesma solução tampão. As amostras - EFS, EFF, arbutina e (*E*)-2-dodecenal - foram preparadas a 2 mg/mL e, como controle positivo, foi utilizada uma solução de acarbose (Sigma-Aldrich®) na mesma concentração, sendo que todas as soluções foram preparadas em tampão citrato-fosfato 0,1 mol/L (pH 7,0). Aos tubos de ensaio, em triplicatas, foram adicionados 350 μ L de amostra/controle e 700 μ L de enzima. Os tubos foram pré-incubados em banho-maria a 37 °C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados aos tubos 350 μ L de substrato e os mesmos foram incubados em banho-maria a 37 °C por quatro períodos de tempo (5, 10, 15 e 20 minutos). As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (UV-1800, SHIMADZU®) no comprimento de onda de 405 nm. Os valores de absorvâncias obtidos foram utilizados para a construção de gráficos cujo eixo da abscissa corresponde ao tempo (minutos) e o eixo da ordenada corresponde às absorvâncias. Através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foram obtidas as equações das retas, cujos coeficientes angulares foram utilizados para os cálculos de porcentagem de inibição enzimática (%I), de acordo com a Equação 1.

4.7.3 Ensaio de inibição da lipase pancreática

A avaliação da inibição da atividade da lipase pancreática suína foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico proposto por Pereira e colaboradores (2011), com algumas modificações. A solução de lipase pancreática suína (Sigma-Aldrich®) foi preparada na concentração de 2,5 g/L em tampão Tris-HCl 0,05 mol/L (pH 8,0) contendo CaCl₂ a 0,01 mol/L e NaCl a 0,025 mol/L. Como substrato foi utilizada uma solução de *p*-nitrofenolpalmitato (Carbosynth®) a 4 mmol/L em Triton X-100 0,5% (p/v). As soluções de EFS, EFF e (*E*)-2-dodecenal foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em tampão, enquanto a solução de arbutina foi preparada a 2 mg/mL em tampão. Como controle positivo, foi utilizada uma solução de orlistate (Sigma-Aldrich®) preparada a 0,5 mg/mL em tampão. Aos tubos de ensaio, em triplicatas, foram adicionados 350 µL de amostra/controle e 700 µL de enzima. Os tubos foram pré-incubados em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. Em seguida, 350 µL de substrato foram adicionados aos tubos que foram incubados em banho-maria a 37 °C por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 minutos). As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (UV-1800, SHIMADZU®) no comprimento de onda de 410 nm. Os valores de absorvâncias obtidos foram utilizados para a construção de gráficos cujo eixo da abscissa corresponde ao tempo (minutos) e o eixo da ordenada corresponde às absorvâncias. Através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foram obtidas as equações das retas, cujos coeficientes angulares foram utilizados para os cálculos de porcentagem de inibição enzimática (%I), de acordo com a Equação 1.

4.8 DOCKING MOLECULAR

Os estudos *in silico* foram realizados com o intuito de analisar as afinidades de ligação, conformações e interações intermoleculares entre as substâncias (*E*)-2-dodecenal e arbutina e as enzimas digestivas (alfa-amilase pancreática, alfa-glicosidase e lipase pancreática).

4.8.1 Obtenção das estruturas tridimensionais dos ligantes

As estruturas bidimensionais dos ligantes foram desenhadas através do programa MarvinSketch 20.17 (CHEMAXON, 2020), enquanto as tridimensionais foram geradas pela função *Clean in 3D*, que calcula as coordenadas tridimensionais para as moléculas. Em seguida,

para obtenção de estruturas energeticamente mais estáveis, estas foram submetidas à otimização geométrica no programa Avogadro 1.2.0 (HANWELL et al., 2012) com aplicação do campo de força MMFF94s. Os arquivos foram salvos em formato *.pdb. No programa AutoDock Tools 1.5.6 (ADT, 2020), foram atribuídas as cargas para cada átomo dos ligantes e feita a conversão de formato dos arquivos de *.pdb para *.pdbqt.

4.8.2 Obtenção das estruturas tridimensionais das enzimas

As coordenadas cristalográficas das estruturas tridimensionais das proteínas foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), um banco de dados público que disponibiliza as coordenadas atômicas e outras informações que descrevem macromoléculas importantes. As estruturas utilizadas foram: PDBid: 1XD0 (LI et al., 2005) para a alfa-amilase pancreática; PDBid: 3TOP (REN et al., 2011) para a alfa-glicosidase; e PDBid: 1LPB (EGLOFF et al., 1995) para a lipase pancreática.

4.8.3 Preparação das enzimas e execução do *docking* molecular

O programa AutoDock Tools 1.5.6 (ADT, 2020) foi utilizado para a preparação das proteínas, etapa na qual foram removidas as moléculas de água e adicionados átomos de hidrogênio e cargas elétricas para cada átomo. Em seguida, foi realizada a conversão do formato dos arquivos de *.pdb para o formato *.pdbqt que, além de informações estruturais, também indica as cargas elétricas de cada átomo que constitui a molécula (Q) e os tipos e números de torções (T). Além disso, o programa também foi utilizado para definir as coordenadas do *Grid Box*, que são caixas de simulação que representam a região no espaço tridimensional onde serão feitas as tentativas de acoplamento e, portanto, deverão acomodar inteiramente o sítio catalítico da enzima. Em seguida, foi criado o arquivo de texto *conf.txt contendo as informações do *Grid Box*, conforme o descrito a seguir:

- Alfa-amilase pancreática (PDBid: 1XD0)

Organismo: *Homo sapiens*

Ligante cristalográfico: pentassacarídeo derivado da acarbose (PDBid: ARE)

Dimensões: 26x26x26, pontos espaçados de 1Å.

Coordenadas: X: 10.441, Y:15.880, Z: 40.721

- Maltase-Glicoamilase subunidade C-terminal (PDBid: 3TOP)
Organismo: *Homo sapiens*
Ligante cristalográfico: acarbose (PDBid: PRD_900007)
Dimensões: 28x34x24, pontos espaçados de 1Å.
Coordenadas: X: -53.337; Y: 9.738; Z: -64.733
- Lipase pancreática complexada com colipase (PDBid: 1LPB)
Organismo: *Homo sapiens* (lipase), *Sus scrofa* (colipase)
Ligante cristalográfico: ácido metoxiundecilfosfínico (PDBid: MUP)
Dimensões: 22x22x22, pontos espaçados de 1Å.
Coordenadas: X: 9.819; Y: 23.490; Z: 50.867

O programa AutoDock Vina 1.1.2 (TROTT, OLSON, 2010) foi utilizado para a execução do *docking* molecular e os resultados obtidos foram analisados através do programa Discovery Studio v20.1.0.19295 2020 (BIOVIA, 2020).

4.8.4 Validação de protocolos pelo método de *redocking*

Antes da execução do *docking* molecular com os ligantes, foram realizadas as validações dos protocolos de *docking* pelo método de *redocking*, que consiste em remover o ligante do complexo cristalográfico e redocá-lo no sítio catalítico da enzima. Os protocolos foram considerados validados quando se obteve valores de *root-mean-square deviation* (RMSD) menores que 2,0 Å.

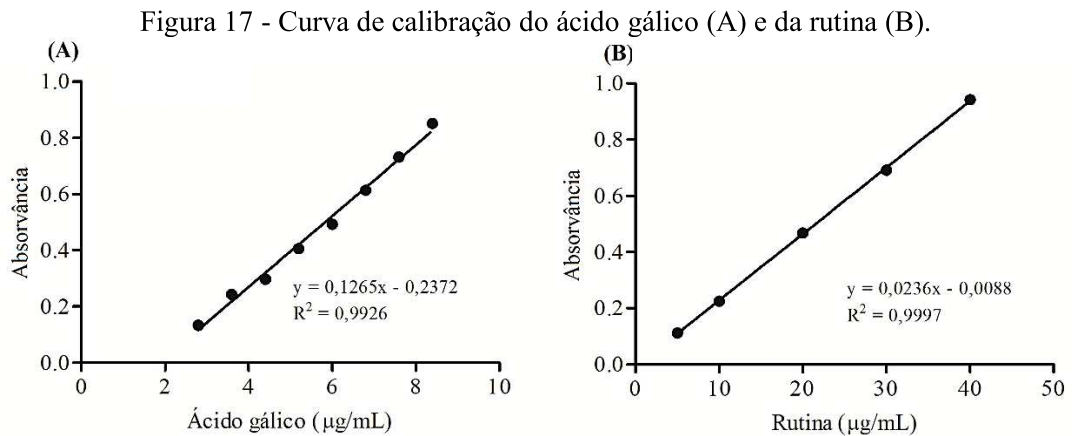
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram demonstrados através da média \pm desvio padrão (D.P.M.) ou erro padrão médio (E.P.M.). Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ou Student–Newman–Keuls como *post-hoc* foi utilizada para medir o grau de significância para $p < 0,05$. O teste t foi aplicado para comparar as médias dos teores de fenóis totais e flavonoides totais. Para as análises estatísticas, foi utilizado o programa GraphPad Prism[®].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE FENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS

Os teores de fenóis totais nos extratos etanólicos de *E. foetidum* (EFS e EFF) foram obtidos por meio da equação da reta de calibração do ácido gálico (Figura 17A). Após a análise de regressão linear, obteve-se a equação da reta ($y = 0,1265x - 0,2372$) e o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9926$). A partir dessa equação e a substituição dos valores de absorvância das amostras na variável “y”, obteve-se a concentração inicial (valor de x) seguida do teor em mg/g equivalentes ao ácido gálico. Da mesma forma, os teores de flavonoides totais foram obtidos usando a equação da reta de calibração da rutina (Figura 17B; $y = 0,0236x - 0,0088$; coeficiente de determinação $R^2 = 0,9997$), sendo os resultados expressos em mg/g equivalentes à rutina.



Os extratos de *E. foetidum* produziram teores de fenóis totais de $107,2 \pm 0,73$ mgEAG/g (EFS) e $118,8 \pm 1,64$ mgEAG/g (EFF), enquanto os teores de flavonoides foram de $7,5 \pm 0,18$ mgERU/g (EFS) e $77,6 \pm 0,65$ mgERU/g (EFF) (Tabela 10).

Tabela 10 - Teores de fenóis totais, equivalentes a mg/g de ácido gálico, e flavonoides, equivalentes a mg/g de rutina dos extratos de *E. foetidum*.

Extratos	Fenóis totais (mgEAG/g)	Flavonóides (mgERU/g)
EFS	$107,2 \pm 0,73^{**}$	$7,5 \pm 0,18^{***}$
EFF	$118,8 \pm 1,64^{**}$	$77,6 \pm 0,65^{***}$

Os valores correspondem à média \pm erro padrão ($n = 3$). Após aplicação do teste t, as médias são diferentes entre si (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Diferentes extratos das folhas de *E. foetidum* exibiram presença de fenóis, flavonoides, saponinas, taninos, antocianinas, esteróis, triterpenóides e antraquinonas, sugerindo que essa planta pode ser uma fonte promissora de compostos bioativos com potencial terapêutico (ASHWATY, SAJ, 2014; MALIK et al., 2016). Malik e colaboradores (2016) mostraram que os teores de fenóis totais variaram conforme o extrato: metanólico ($50,23 \pm 0,89$ mg/g equivalente ao ácido gálico); etanólico ($55,34 \pm 0,43$ mg/g equivalente ao ácido gálico); e aquoso ($21,74 \pm 0,57$ mg/g equivalente ao ácido gálico). Nos mesmos extratos, os teores de flavonoides totais equivalentes à quercetina (mg/g), foram: metanólico ($77,24 \pm 0,67$); etanólico ($85,02 \pm 1,57$); aquoso ($35,58 \pm 1,67$). Considerando os dados de Malik et al. (2016), os resultados do presente estudo apontaram teores de fenóis totais mais elevados, enquanto o teor de flavonoides no EFF foi equivalente àquele encontrado no extrato metanólico.

Diante dos resultados (Tabela 10), observa-se que existe uma variação nos teores de fenóis e flavonoides totais, assim como, quando comparados com os dados da literatura (MALIK et al., 2016). Na verdade, existem distintos fatores que podem influenciar na variação de constituintes fenólicos, dentre eles, destaca-se a época de coleta, que pode alterar na qualidade e, conseqüentemente, no valor terapêutico de plantas medicinais e preparações fitoterápicas. Fatores como temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude e poluição atmosférica, entre outros, podem também afetar o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais (GOBBO-NETO, LOPES, 2007; MACEDO et al., 2013). Entretanto, a secagem das folhas de *E. foetidum*, provavelmente, foi o fator que mais contribuiu com a diferença dos teores de fenóis totais e, principalmente, flavonoides totais.

Dentre os compostos fenólicos, o ácido clorogênico ($4327 \mu\text{g/g}$) foi o principal constituinte encontrado por Leitão e colaboradores (2020) nas folhas de *E. foetidum* da Amazônia. Esses autores também mostraram que a luteína ($205 \mu\text{g/g}$, base seca) e o β -caroteno ($161 \mu\text{g/g}$, base seca) foram os principais carotenoides encontrados. Os flavonoides são considerados os principais constituintes do gênero *Eryngium*, sendo que já foram isolados e identificados flavanonas e flavonóis, como glicosídeos de quercetina e kaempferol com uma ou duas cadeias de oligossacarídeo (WANG et al., 2012).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Considerando que os ensaios de determinação dos teores de fenóis e flavonoides totais apontaram a presença de compostos fenólicos nos extratos de *E. foetidum*, constituintes que são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, EFS e EFF, assim como o (*E*)-2-dodecenal e

a arbutina, foram avaliados com relação à atividade antioxidante através de ensaios *in vitro* pelos métodos do sequestro do radical DPPH•, poder de redução do ferro (FRAP) e co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.

5.2.1 Avaliação da atividade antioxidante pelos métodos do sequestro do radical DPPH• e poder de redução do ferro (FRAP)

O potencial antioxidante frente à inibição do radical livre DPPH• de EFS, EFF, (*E*)-2-dodecenal, arbutina e do controle positivo (rutina) estão apresentados na tabela 11 na forma de IC₅₀ (concentração inibitória de 50%). Os valores de IC₅₀ de EFS e EFF foram de 416,50 ± 0,63 µg/mL e 61,54 ± 0,35 µg/mL, respectivamente. O (*E*)-2-dodecenal não foi efetivo nas concentrações testadas (IC₅₀ > 750 µg/mL), enquanto a arbutina apresentou IC₅₀ de 176,30 ± 1,71 µg/mL. Como controle positivo, a rutina foi efetiva em inibir o DPPH•.

Considerando o método de poder de redução do ferro (FRAP), EFF apresentou um IC₅₀ igual a 545,30 ± 15,01 µg/mL, enquanto o EFS não foi efetivo nas concentrações testadas (IC₅₀ > 1000 µg/mL). Novamente, o (*E*)-2-dodecenal não foi capaz de reduzir os íons ferro (IC₅₀ > 1000 µg/mL), mas a arbutina produziu um valor de IC₅₀ igual a 231,00 ± 2,08 µg/mL. Como o esperado, a rutina reduziu os íons ferro com IC₅₀ de 89,04 ± 0,17 µg/mL, sendo bem efetiva (Tabela 11).

Tabela 11 - Atividade antioxidante pelos métodos do sequestro do radical DPPH• e poder de redução do ferro (FRAP).

Amostras	IC ₅₀ (µg/mL)	
	DPPH	FRAP
Rutina	19,11 ± 0,19	89,04 ± 0,17
EFS	416,50 ± 0,63	> 1000
EFF	61,54 ± 0,35	545,30 ± 15,01
(<i>E</i>)-2-Dodecenal	> 750	> 1000
Arbutina	176,30 ± 1,71	231,00 ± 2,08

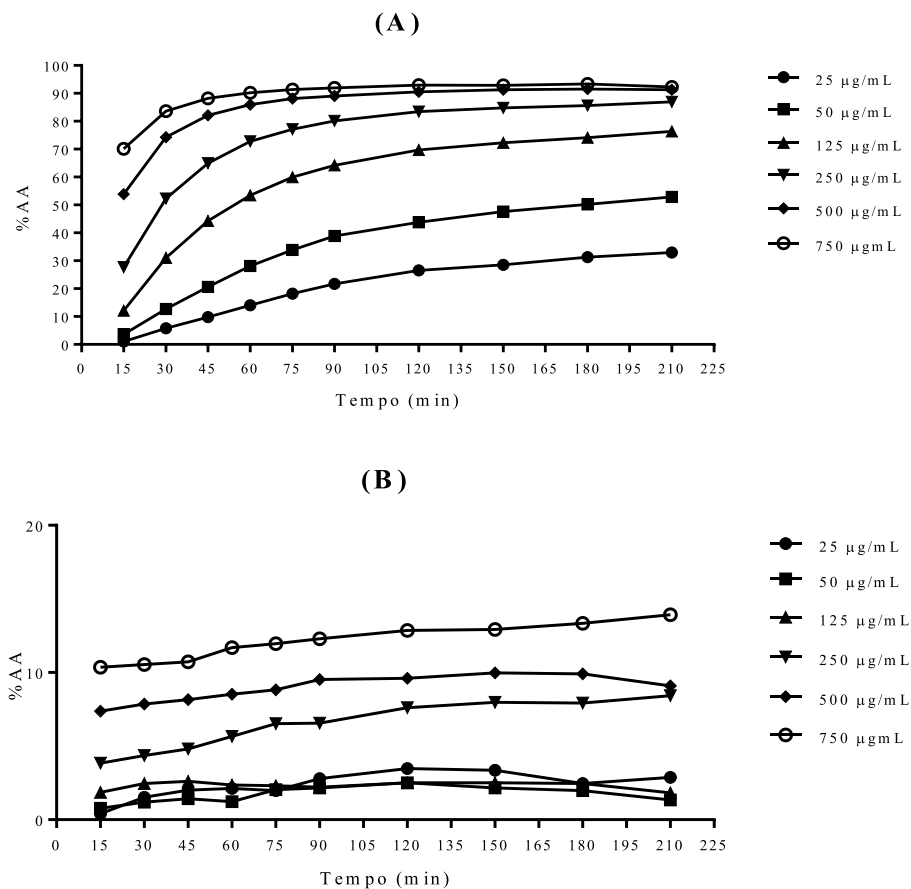
Os valores representam média ± Erro padrão (n = 3). As médias são diferentes entre si após Análise de variância seguido do teste de Tukey para p < 0,001.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Visto que o (*E*)-2-dodecenal não se mostrou eficaz no método de sequestro do radical DPPH•, foi realizado o estudo de cinética da reação com o intuito de avaliar o comportamento da substância no decorrer do tempo (minutos). A cinética de reação com a arbutina também foi realizada por critérios de comparação. A arbutina apresentou cinética média, visto que o tempo de reação com o radical DPPH• foi entre 30 minutos e 1 hora, sendo o percentual de inibição

acima de 50% a partir da concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 18A), o que está de acordo com o IC_{50} de $176,30 \pm 1,71 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 11). Como observado na Figura 18B, mesmo na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$, o percentual de inibição do radical $\text{DPPH}\cdot$ pelo (*E*)-2-dodecenal foi abaixo de 20%, mostrando que não está ocorrendo reação junto ao radical livre. É possível que essa reação seja muito lenta em concentrações acima de 750 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 18 - Cinética de reação da arbutina (A) e do (*E*)-2-dodecenal (B) no método de sequestro do radical $\text{DPPH}\cdot$.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Por apresentar valor de IC_{50} maior que as concentrações testadas, é provável que o (*E*)-2-dodecenal não seja o responsável pela ação antioxidante observada com EFS e EFF, mesmo porque nenhum estudo de atividade antioxidante dessa substância foi relatado na literatura. Entretanto, torna-se evidente que EFF possui uma capacidade inibitória maior que EFS frente ao radical $\text{DPPH}\cdot$ e ao FRAP, o que possivelmente está relacionado aos teores de fenóis e flavonoides totais mostrados na Tabela 10. Compostos fenólicos, como os flavonóides, são bem conhecidos como poderosos agentes antioxidantes em estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo que essa atividade reside em sua capacidade de doar um átomo de hidrogênio ou um elétron e, dessa

forma, neutralizar radicais livres e impedir a oxidação de estruturas celulares importantes (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008). Além disso, esses compostos naturais têm sido estudados por seus efeitos benéficos na saúde e em diversas patologias, como diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e câncer (HRELIA, ANGELONI, 2020).

A propriedade antioxidante de *E. foetidum* foi demonstrada em diversos estudos usando extratos, óleos essenciais e substâncias isoladas. No estudo de Ashwaty e Saj (2014), o extrato metanólico de *E. foetidum*, nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL, exibiu atividade antioxidante superior ao extrato clorofórmico e ao ácido ascórbico (padrão), atingindo quase 100% de inibição frente ao radical DPPH•. Os autores ainda relataram que o extrato metanólico também demonstrou capacidade antioxidante significativamente maior em comparação ao BHT (butil-hidroxitolueno) e ao extrato clorofórmico no ensaio FRAP (ASHWATY, SAJ, 2014).

O extrato metanólico das folhas de *E. foetidum* também foi capaz de capturar DPPH• no estudo de Leitão et al. (2020), com porcentagem de inibição de $91,60 \pm 0,45\%$ do radical na concentração testada de 0,06 µg/g. Singh et al. (2013) relataram um valor semelhante (92,7%), mas superior ao descrito por Singh et al. (2011), que foi de 73,93% de inibição do radical DPPH•. Além disso, o estudo realizado por Dalukdeniya e Rathnayaka (2017) mostrou que o extrato metanólico apresentou um valor de IC₅₀ igual a 272,43 µg/mL, sendo que a concentração de 2000 µg/mL produziu cerca de 88% de inibição frente ao DPPH•.

O estudo realizado por Thomas e seus colaboradores (2017) avaliou a composição química e a propriedade antioxidante de óleos essenciais das folhas, caule e raiz de *E. foetidum* proveniente da Nigéria. Os resultados mostraram que os óleos das folhas, caule e raiz apresentaram, respectivamente, 56,76% (IC₅₀ = 56 µg/mL), 78,08% (IC₅₀ = 46 µg/mL) e 67,53% (IC₅₀ = 54,5 µg/mL) de inibição do radical DPPH•, frente a 90,79% de inibição pelo ácido ascórbico (substância de referência). A composição química do óleo essencial do caule, que mostrou-se mais eficaz, apontou aldeídos como dodecanal (20,21%), 2,4,5-trimetilbenzaldeído (18,43%) e (*E*)-2-dodecenal (8,27%) como compostos majoritários, além de compostos oxigenados que não estavam presentes nos outros óleos, como 2,4,6-trimetilfenol, 2-undecanol, 1-undecanol, 1-dodecanol e (*E*)-2-dodecen-1-ol. No ensaio FRAP, o óleo essencial das folhas apresentou maior potencial redutor, sendo os seus principais constituintes o (*E*)-2-dodecenal (28,43%), 13-tetradecenal (27,45%), dodecanal (14,59%) e 2,4,5-trimetilbenzaldeído (10,77%).

De forma semelhante, outro estudo avaliou o óleo essencial das folhas de *E. foetidum* da Colômbia, que apresentou 80,39% de inibição frente ao radical DPPH•, em comparação a 96,4% do ácido ascórbico. O perfil cromatográfico do óleo demonstrou a presença de 2-

dodecen-1-al (43,96 %), 5-dodeceno (30,15 %), tetradecanal (5,28 %), tetradecenal (5,41 %), 3,4,5-trimetilfenol (3,08 %) e 2,4,6-trimetilbenzaldeído (2,24 %) como constituintes majoritários (JARAMILLO, DUARTE, MARTELO, 2011). Quando avaliado isoladamente no presente estudo, o (*E*)-2-dodecenal não se mostrou capaz de inibir o radical DPPH• no ensaio *in vitro*, o que sugere que a propriedade antioxidante de óleos essenciais de *E. foetidum* pode ser atribuída a um efeito sinérgico dos vários compostos aldeídicos presentes nas folhas da planta.

A atividade antioxidante da arbutina foi descrita por Takebayashi e seus colaboradores (2010), que demonstraram que essa substância reagiu lenta e continuamente com o radical DPPH•, o que resultou numa fraca capacidade na eliminação desse radical. Em contrapartida, os resultados do presente estudo apontam que, mesmo com valor de IC₅₀ maior do que a rutina (controle positivo), a arbutina apresenta propriedade antioxidante por ser capaz de inibir o radical DPPH• e também reduzir os íons ferro (Tabela 11).

5.2.2 Atividade antioxidante pelo método de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico

A capacidade de inibição da peroxidação lipídica por extratos de *E. foetidum*, (*E*)-2-dodecenal e arbutina, avaliada através do método de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico, ainda não se encontra descrita na literatura. Os resultados do presente estudo apontam que a arbutina e o EFF produziram inibições estatisticamente iguais ($p < 0,001$) de $53,38 \pm 3,15\%$ e $52,69 \pm 2,84\%$, respectivamente, sendo mais efetivos que a rutina ($32,69 \pm 2,11\%$), porém, menos efetivos que o antioxidante sintético BHT ($86,21 \pm 2,10\%$) (Tabela 12). Nessa tabela, fica evidenciado que o (*E*)-2-dodecenal, composto encontrado em *E. foetidum*, apresentou uma inibição de $37,25 \pm 5,05\%$ estatisticamente igual à rutina, enquanto o EFS não foi eficiente em inibir a peroxidação lipídica.

Tabela 12 - Inibição da peroxidação lipídica pelo método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.

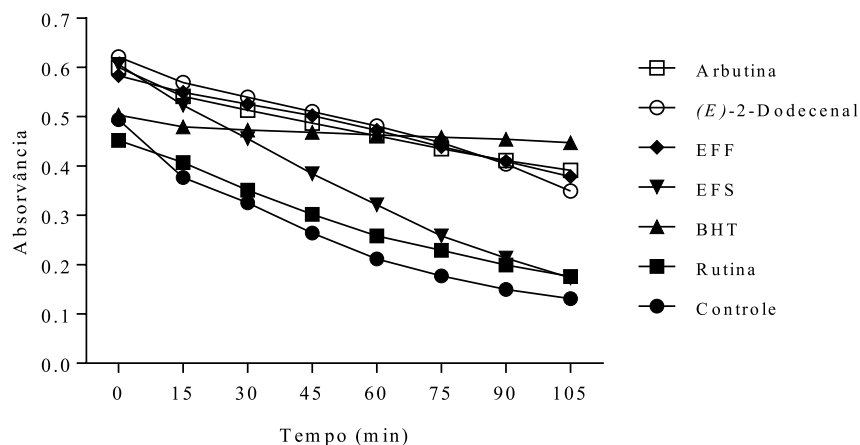
Amostras /Controles	% Inibição da peroxidação lipídica
Rutina	32,69 \pm 2,11 ^a
BHT	86,21 \pm 2,10
EFS	5,67 \pm 0,71
EFF	52,69 \pm 2,84 ^b
(<i>E</i>)-2-Dodecenal	37,25 \pm 5,05 ^a
Arbutina	53,38 \pm 3,15 ^b

Os valores representam média \pm erro padrão (n = 3). Letras iguais na mesma coluna, as médias não diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey (p < 0,001).

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Na Figura 19, são mostradas as leituras das absorvâncias obtidas nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 minutos de reação, para as amostras EFS, EFF, (*E*)-2-dodecenal e arbutina, assim como para os controles positivos (BHT e rutina). Pode-se observar o decaimento das absorvâncias em função do tempo, em decorrência da oxidação do β -caroteno. Quanto menor o decaimento, maior a inibição da peroxidação lipídica e, conseqüentemente, da oxidação do β -caroteno. A arbutina e o EFF apresentaram menor variação no decaimento, demonstrando maior inibição da peroxidação lipídica. Entre os controles positivos testados, o BHT foi mais ativo, produzindo um menor decaimento das absorvâncias.

Figura 19 - Curvas de decaimento da absorvância em função do tempo das amostras pelo método da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Vale ressaltar que a peroxidação lipídica é uma reação que se inicia com a abstração de um átomo de hidrogênio de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares.

A presença de uma ligação dupla adjacente a um grupo metileno deixa o átomo de carbono com um elétron desemparelhado, formando um dieno conjugado que se combina com o oxigênio para formar um radical peroxil. Dessa forma, o radical peroxil é capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo poli-insaturado, iniciando uma reação em cadeia. Assim, a peroxidação lipídica ocorre mediante a condições patológicas, em que há produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, associada à deficiência de tocoferol. Conseqüentemente, ocorre dano oxidativo em estruturas celulares importantes, como os lipídios de membrana, além de gerar toxicidade resultando em morte celular (REPETTO, SEMPRINE, BOVERIS, 2012).

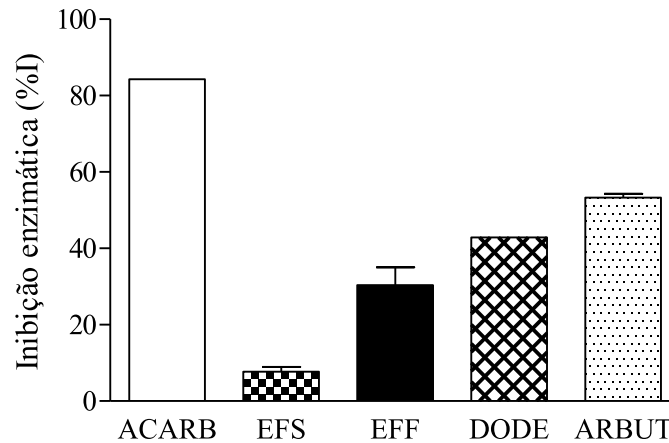
No estudo de Phan (2021), extratos das folhas de *E. foetidum* não apresentaram inibição da peroxidação lipídica, que foi avaliada pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA). Em contrapartida, no estudo de Swargiary et al. (2016), o extrato metanólico de *E. foetidum* apresentou IC₅₀ de $387,60 \pm 29,68$ µg no ensaio de peroxidação lipídica pelo método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico modificado (TBARS), usando homogenatos de gema de ovo como meio rico em lipídios, o que mostra que a espécie é capaz de inibir a peroxidação lipídica.

O estudo de Khadir et al. (2015) demonstrou que ratos com estresse oxidativo induzido por ciclosporina tiveram uma redução na peroxidação lipídica sérica, avaliada pelo método TBARS, devido à administração de 50 mg/kg de arbutina. Contudo, é importante destacar que os resultados do presente estudo demonstram que a arbutina, na concentração de 250 µg/mL, foi eficiente na inibição da peroxidação lipídica, com $53,38 \pm 3,15\%$ de inibição.

5.3 INIBIÇÃO DA ALFA-AMILASE PANCREÁTICA

A atividade inibitória frente à alfa-amilase pancreática mostrou que os extratos EFS e EFF de *Eryngium foetidum*, na concentração de 1 mg/mL, produziram $7,74 \pm 1,19$ e $30,35 \pm 4,72\%$ de inibição, respectivamente, demonstrando que o EFF é mais ativo que o EFS (Figura 20). (*E*)-2-dodecenal (25 mg/mL) causou $42,86 \pm 0,00\%$ de inibição, enquanto a arbutina (75 mg/mL) produziu inibição de $53,33 \pm 0,95\%$ sobre a alfa-amilase pancreática (Figura 20). Como controle positivo, a acarbose (25 µg/mL) foi efetiva apresentando $84,29 \pm 0,00\%$ de inibição da enzima.

Figura 20 - Atividade inibitória das amostras frente à alfa-amilase pancreática.



As barras representam a média \pm Erro padrão ($n = 3$). Após análise de variância seguida do teste de Tukey, as médias são diferentes entre si para $p < 0,05$ ou $p < 0,01$ ou $p < 0,001$. ACARB = Acarbose 25 $\mu\text{g/mL}$; EFS = Extrato etanólico das folhas secas de *E. foetidum* a 1 mg/mL ; EFF = Extrato etanólico das folhas frescas de *E. foetidum* a 1 mg/mL ; DODE = (*E*)-2-dodecenal 25 mg/mL ; ARBUT = Arbutina 75 mg/mL .

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

A alfa-amilase pancreática é uma enzima que atua na digestão dos carboidratos, hidrolisando o amido polimérico em oligossacarídeos, como maltose, maltotriose e dextrinas. Posteriormente, estes são hidrolisados em monossacarídeos, como a glicose, que é absorvida para o sangue causando a hiperglicemia pós-prandial. Nesse sentido, a inibição dessa enzima é uma importante estratégia terapêutica para o tratamento e manutenção de elevações da glicemia pós-prandial, sendo alvo de inibidores enzimáticos, como a acarbose, o miglitol e a voglibose (KAUR et al., 2021).

No estudo de Manjunatha e colaboradores (2019), o extrato metanólico das folhas de *E. foetidum* (5-500 $\mu\text{g/mL}$) demonstrou ter efeitos inibitórios sobre a alfa-amilase pancreática de maneira dependente da dose com inibição máxima de 78,62% a 500 $\mu\text{g/mL}$, e o valor de IC_{50} foi de 88,64 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a acarbose, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, apresentou inibição significativa da atividade enzimática (92,44%) com valor de IC_{50} de 0,48 $\mu\text{g/mL}$. Em outro estudo, o extrato hidroalcoólico de *E. foetidum* na concentração de 1 mg/mL produziu atividade inibitória sobre a alfa-amilase pancreática de $31,22 \pm 1,21\%$ (SUTTISANSANEE et al., 2021). Embora os resultados possam variar entre os estudos apresentados, os achados do presente trabalho confirmam a inibição da alfa-amilase pancreática pelos extratos de *E. foetidum*.

Considerando ainda a inibição da alfa-amilase pancreática, Yousefi e seus colaboradores (2013) concluíram que a arbutina é capaz de inibir a atividade dessa enzima de maneira dose-dependente, causando inibição de 81% da atividade na concentração máxima testada de 100

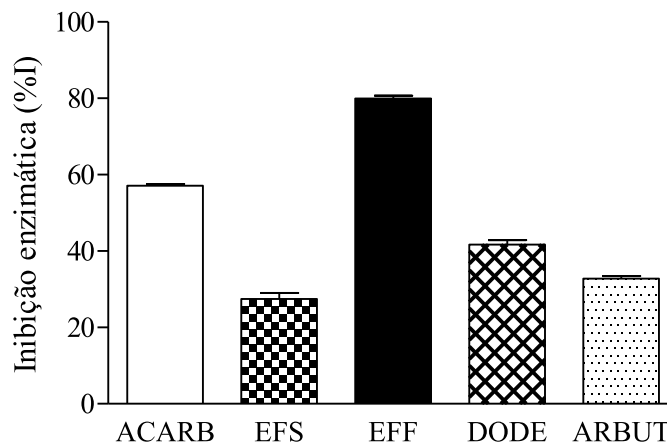
mg/mL. Apesar de uma concentração menor, os nossos resultados corroboram os dados de Yousefi e colaboradores (2013), uma vez que a arbutina promoveu a inibição da alfa-amilase pancreática em $53,33 \pm 0,95\%$ a 75 mg/mL.

Com relação ao (*E*)-2-dodecenal, cabe ressaltar que a inibição da alfa-amilase pancreática por este composto ainda não está relatada na literatura científica, podendo ser considerada um dado inédito do presente estudo.

5.4 INIBIÇÃO DA ALFA-GLICOSIDASE

A atividade inibitória das amostras frente à alfa-glicosidase mostrou que o EFF de *E. foetidum* apresentou uma inibição de $79,94 \pm 0,81\%$, sendo mais efetivo que a acarbose ($57,12 \pm 0,43\%$), enquanto o EFS produziu uma inibição menor ($27,43 \pm 1,59\%$) (Figura 21). Além disso, o (*E*)-2-dodecenal inibiu a atividade da alfa-glicosidase em $41,67 \pm 1,21\%$ e arbutina causou uma inibição de $32,77 \pm 0,70\%$ (Figura 21). Todas as amostras e a acarbose foram testadas na concentração de 2 mg/mL.

Figura 21 - Atividade inibitória das amostras frente à alfa-glicosidase.



As barras representam a média \pm Erro padrão ($n = 3$). Após análise de variância seguida do teste de Tukey, as médias são diferentes entre si para $p < 0,05$; ou $p < 0,01$; ou $p < 0,001$. ACARB = Acarbose 2 mg/mL; EFS = Extrato etanólico das folhas secas de *E. foetidum* a 2 mg/mL; EFF = Extrato etanólico das folhas frescas de *E. foetidum* a 2 mg/mL; DODE = (*E*)-2-dodecenal 2 mg/mL; ARBUT = Arbutina 2 mg/mL.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

As alfa-glicosidases, enzimas digestivas ligadas à membrana do epitélio do intestino delgado, catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas nas extremidades não redutoras dos substratos para liberar monossacarídeos, como a glicose, que serão absorvidos (OKUYAMA et

al., 2016). Dessa forma, essas enzimas atuam na absorção da glicose ingerida nas refeições promovendo o quadro de hiperglicemia pós-prandial. Portanto, a inibição das alfa-glicosidases contribui para minimizar os riscos associados à hiperglicemia pós-prandial em pacientes com diabetes mellitus e obesidade.

Manjunatha e seus colaboradores (2019) também avaliaram os efeitos do extrato de *E. foetidum* (5-500 µg/mL) sobre a atividade da alfa-glicosidase. Esses autores concluíram que a inibição é maneira dependente da concentração, com 62,82% na concentração máxima testada (500 µg/mL) e valor de IC₅₀ de 312,4 µg/mL, enquanto a acarbose (2 µg/mL) apresentou inibição significativa de 88,14% com valor de IC₅₀ de 0,82 µg/mL. Em outro estudo, o extrato hidroalcoólico de *E. foetidum* na concentração de 1 mg/mL inibiu a alfa-glicosidase em 38,36 ± 0,96% (SUTTISANSANEE et al., 2021). Além disso, os extratos aquoso e metanólico de *E. foetidum*, cultivado no Vietnã, ocasionaram inibição de 3% e 8%, respectivamente (MAI et al., 2007).

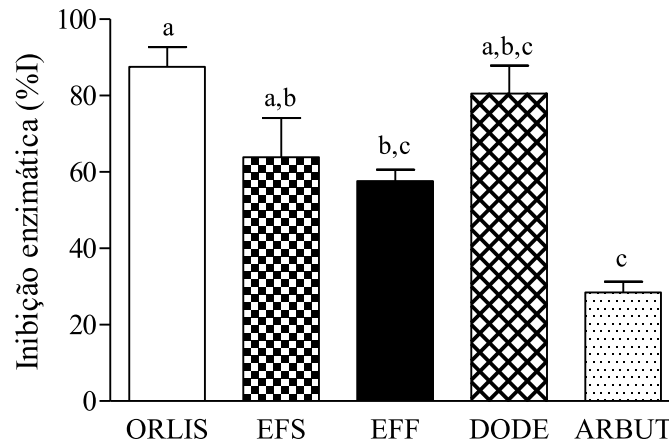
A investigação realizada por Yousefi e seus colaboradores (2013) mostrou que a arbutina exibiu inibição da atividade da alfa-glicosidase de maneira dose-dependente, sendo que a maior concentração testada (100 mg/mL) inibiu 75% da atividade da enzima. Entretanto, no presente estudo, a arbutina (2 mg/mL) foi capaz de inibir em 32,77 ± 0,70% a alfa-glicosidase (Figura 21), confirmando o efeito inibitório desta enzima.

Considerando a ação inibitória apresentada pelo (*E*)-2-dodecenal (2 mg/mL) frente à alfa-glicosidase, cabe mencionar que esta propriedade não foi previamente descrita em publicações científicas, o que pode ser considerado relevante e justificar o efeito hipoglicemiante da *E. foetidum*.

5.5 INIBIÇÃO DA LIPASE PANCREÁTICA

O efeito inibitório das amostras frente à lipase pancreática é mostrado na Figura 22. EFS e EFF, ambos na concentração de 1 mg/mL, produziram inibição de 63,89 ± 10,23% e 57,64 ± 3,03%, respectivamente. Embora com uma média menor, o EFS causou uma ação inibitória estatisticamente igual ao orlistate (0,5 mg/mL; 87,50 ± 5,24) ($p < 0,05$). O (*E*)-2-dodecenal (1 mg/mL) também apresentou uma expressiva ação frente à lipase pancreática com 80,56 ± 7,35% de inibição, sendo estatisticamente igual ao orlistate. Apesar de ser menos eficiente, a arbutina (2 mg/mL) produziu uma inibição de 28,47 ± 2,78% que foi estatisticamente igual ao EFF ($p < 0,05$).

Figura 22 - Atividade inibitória das amostras frente à lipase pancreática.



As barras representam a média \pm Erro padrão ($n = 3$). Após análise de variância seguida do teste de Tukey, letras iguais, as médias não diferem entre si para $p < 0,05$. ORLIS = Orlistate 0,5 mg/mL; EFS = Extrato etanólico das folhas secas de *E. foetidum* a 1 mg/mL; EFF = Extrato etanólico das folhas frescas de *E. foetidum* a 1 mg/mL; DODE = (*E*)-2-dodecenal 1 mg/mL; ARBUT = Arbutina 2 mg/mL.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

As principais lipases humanas incluem as lipases gástrica e pancreática, que são estimuladas pelos sais biliares e atuam na digestão e absorção das gorduras provenientes da dieta, e as lipases hepática, endotelial e lipoproteína lipase, que atuam no metabolismo das lipoproteínas (MUKHERJEE, 2003). A lipase pancreática é a enzima mais importante envolvida no processo de digestão dos lipídios alimentares, atuando na hidrólise das ligações éster do triacilglicerol gerando ácidos graxos que são absorvidos pelos enterócitos e transportados para a circulação sanguínea (KO et al., 2020).

O estudo realizado por Suttisansanee e seus colaboradores (2021) revelou que o extrato hidroalcoólico de *E. foetidum* na concentração de 1 mg/mL foi capaz de inibir em $43,28 \pm 0,85\%$ a atividade da lipase pancreática. Embora este resultado corrobora a capacidade inibitória da espécie, no presente estudo, ambos os extratos etanólicos EFS e EFF, na mesma concentração, mostraram-se mais efetivos na inibição da enzima ($63,89 \pm 10,23\%$ e $57,64 \pm 3,03\%$, respectivamente).

O (*E*)-2-dodecenal, um dos componentes majoritários de óleos essenciais da *E. foetidum* (JARAMILLO, DUARTE, MARTELO, 2011; THOMAS et al., 2017), demonstrou uma inibição bastante significativa da atividade da lipase pancreática, com eficácia equivalente ao orlistate na concentração de 0,5 mg/mL (Figura 22). Estudos com esse composto ainda não foram relatados na literatura científica, mas os resultados do presente estudo sugerem que o (*E*)-2-dodecenal pode ser um candidato promissor para o desenvolvimento de novos fármacos com aplicabilidade no tratamento de obesidade.

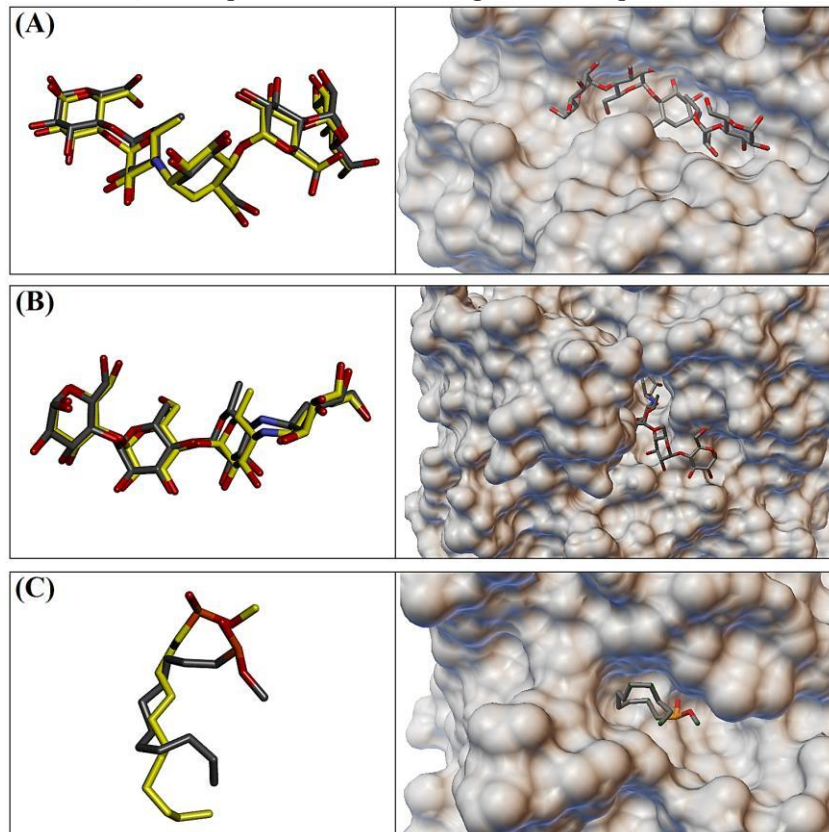
A arbutina é β -glicopiranosídeo de hidroquinona extraído de várias plantas medicinais, como da uva-de-urso (*Arctostaphylos uva-ursi*) e nas famílias Asteraceae, Lamiaceae, Apiaceae, em espécies do gênero *Origanum* (principalmente na *O. majorana*). A arbutina têm se mostrado benéfica no tratamento de várias doenças, como distúrbios de hiperpigmentação da pele, tipos de câncer, distúrbios do sistema nervoso central, osteoporose e diabetes, entre outras, sendo amplamente utilizada em cosméticos como agente despigmentante por inibir a enzima tirosinase que participa da síntese de melanina (SAEEDI et al., 2021). Assim como o (*E*)-2-dodecenal, não há relatos na literatura sobre a capacidade inibitória da arbutina frente à lipase pancreática, o que propõe um novo mecanismo de ação para essa substância. Apesar de sua ação ser bem inferior ao orlistate, esse mecanismo pode ser promissor para a busca de novos agentes para o tratamento da obesidade, uma vez que a arbutina tem sido usada como ingrediente ativo em preparações e produtos comerciais.

5.6 DOCKING MOLECULAR

5.6.1 Redocking

A validação dos protocolos de *docking* molecular foi realizada através do método de *redocking*, que consiste em remover o ligante do complexo cristalográfico e redocá-lo no sítio catalítico da enzima, obtendo-se um valor de RMSD inferior a 2,0 Å. Os resultados do *redocking* do pentassacarídeo derivado da acarbose (PDBid: ARE) no sítio catalítico da alfa-amilase pancreática humana (PDBid: 1XD0) (RMSD 0,7269 Å), da acarbose (PDBid: PRD_900007) no sítio catalítico da maltase-glicoamilase humana (PDBid: 3TOP) (RMSD 0,7027 Å) e do ácido metoxiundecilfosfínico (PDBid: MUP) no sítio catalítico da lipase pancreática (PDBid: 1LPB) (RMSD 1,9874 Å) são mostrados na Figura 23. Observa-se uma expressiva reprodução dos ligantes cristalográficos no sítio catalítico das enzimas, o que permite a continuação dos estudos de *docking* molecular com os ligantes (*E*)-2-dodecenal e arbutina.

Figura 23 - Validação dos protocolos de *docking* molecular pelo método de *redocking*.



Comparações entre as conformações dos ligantes cristalográficos (amarelo) com as conformações geradas pelo *redocking* (cinza). (A) Pentassacarídeo derivado da acarbose no sítio catalítico da alfa-amilase pancreática humana; (B) Acarbose no sítio catalítico da maltase-glicoamilase humana subunidade C-terminal; (C) Ácido metoxiundecilfosfinico no sítio catalítico da lipase pancreática.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

5.6.2 *Docking* molecular da alfa-amilase pancreática

Atuando no processo de digestão, a alfa-amilase pancreática catalisa a reação de hidrólise dos oligômeros, provenientes da degradação do amido pela alfa-amilase salivar, em maltooligossacarídeos lineares (maltose e maltotriose) e dextrinas que, posteriormente, serão hidrolisados em glicose (NICHOLS et al., 2003). A acarbose, um pseudotetrassacarídeo isolado do gênero *Streptomyces sp*, é um fármaco hipoglicemiante que atua através do mecanismo de inibição das enzimas alfa-amilase pancreática e alfa-glicosidase, retardando a absorção de glicose para a circulação sanguínea e minimizando a hiperglicemia pós-prandial (JONGKEES et al., 2017).

A alfa-amilase pancreática humana é uma enzima capaz de se ligar à íons cloreto e cálcio. Esses íons ligam-se na vizinhança do sítio catalítico e desempenham funções importantes na atividade da enzima (BRAYER, LUO, WITHERS, 1995). O sítio catalítico é constituído por resíduos de ácido aspártico (Asp197 e Asp300) e glutamato (Glu233). O

mecanismo catalítico da enzima inicia-se com a atuação do resíduo ácido aspártico (Asp197), que atua como nucleófilo e ataca o carbono anomérico do açúcar. Desse modo, ocorre a formação de um intermediário enzima-glicosil que é estabilizado pelo ácido carboxílico do resíduo de glutamato (Glu233), assim como do ácido aspártico (Asp300), para ocorrer o processo de hidrólise (BRAYER et al., 2000).

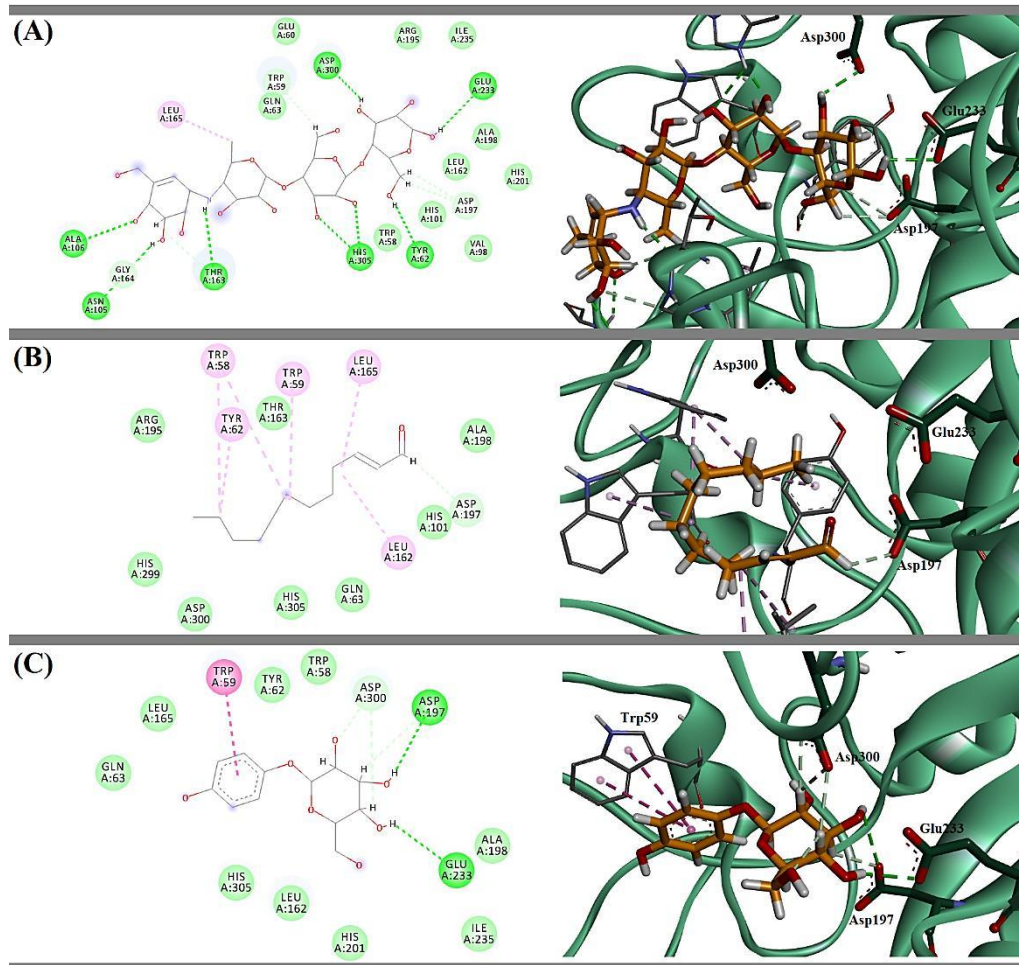
O estudo de *docking* molecular com a alfa-amilase pancreática humana foi realizado com o objetivo de avaliar as afinidades de ligação, as conformações e as principais interações intermoleculares estabelecidas entre os ligantes (*E*)-2-dodecenal e arbutina com o sítio catalítico da enzima, tendo em vista o interesse em avaliar a atuação desses compostos no processo de metabolismo dos carboidratos. Assim, as conformações e as principais interações intermoleculares obtidas pelo *docking* da alfa-amilase pancreática humana (PDBid: 1XD0) com a acarbose e os ligantes são apresentadas na Figura 24.

A acarbose estabeleceu ligações de hidrogênio com os resíduos Glu233 e Asp300, e interação do tipo dipolo-permanente com o resíduo Asp197 (Figura 24A). O valor de energia livre foi de -7,8 kcal/mol (Tabela 13). Além disso, pode-se observar ligações de hidrogênio estabelecidas com outros resíduos da região catalítica. Sendo assim, de acordo com Sun e Miao (2019), o grau de hidroxilação das moléculas é um fator importante para a inibição da alfa-amilase, uma vez que são os grupos hidroxila nas posições dos átomos de hidrogênio que irão interagir com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da enzima estabelecendo ligações de hidrogênio.

O (*E*)-2-dodecenal constituiu interação do tipo dipolo-permanente com o resíduo Asp197 e interação de Van der Waals com o Asp300 (Figura 24B), não havendo interação com o resíduo Glu233. Pode-se observar interações dos tipos alquil e π -alquil com alguns resíduos, o que pode auxiliar na estabilização da molécula de caráter apolar. O valor de energia livre de -4,4 kcal/mol (Tabela 13). Estes dados corroboram o resultado obtido através do ensaio *in vitro* com a alfa-amilase pancreática, pois o (*E*)-2-dodecenal foi capaz de inibir $42,86 \pm 0,00\%$ da atividade da enzima, embora numa concentração considerada elevada (25 mg/mL).

A arbutina foi capaz de estabelecer ligações de hidrogênio com os resíduos Asp197 e Glu233, e interação dipolo-permanente com o resíduo Asp300 (Figura 24C), sendo o valor de energia livre de -6,9 kcal/mol (Tabela 13). Destaca-se também uma interação do tipo π -stacking entre o anel aromático do ligante com o resíduo Trp59. As interações com os resíduos da tríade catalítica justificam a inibição de $53,33 \pm 0,95\%$ da atividade da alfa-amilase pancreática obtida no ensaio *in vitro* com a arbutina na concentração de 75 mg/mL.

Figura 24 - Conformações e principais interações intermoleculares entre os ligantes e a alfa-amilase pancreática humana.



Conformações e principais interações intermoleculares entre (A) acarbose, (B) (*E*)-2-dodecenal e (C) arbutina com os resíduos do sítio catalítico da alfa-amilase pancreática humana (PDBid: 1XD0). As imagens foram geradas através do programa Discovery Studio v20.1.0.19295 2020. Legenda: Verde escuro: ligação de hidrogênio; Verde claro: van der waals; Rosa claro: alquil ou π -alquil; Rosa escuro: π -stacking; Azul claro: dipolo-permanente.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

5.6.3 Docking molecular da alfa-glicosidase

A alfa-glicosidase é um complexo formado pelas enzimas maltase-glicoamilase (MGAM) e sacarase-isomaltase (SI). Ambas as enzimas possuem suas subunidades N-terminal (MGAM-N e SI-N), cuja extremidade do aminoácido consiste em um grupo amina, e C-terminal (MGAM-C e SI-C), que contém um grupo carboxílico. A maltase-glicoamilase subunidade C-terminal (MGAM-C) é a enzima que apresenta maior atividade dentre as quatro subunidades. Por isso, a inibição desta subunidade é uma estratégia eficaz no tratamento de doenças como diabetes mellitus tipo 2 e obesidade. Por exemplo, a acarbose apresenta um perfil

de inibição mais intenso da subunidade MGAM-C quando comparada com a subunidade MGAM-N (REN et al., 2011).

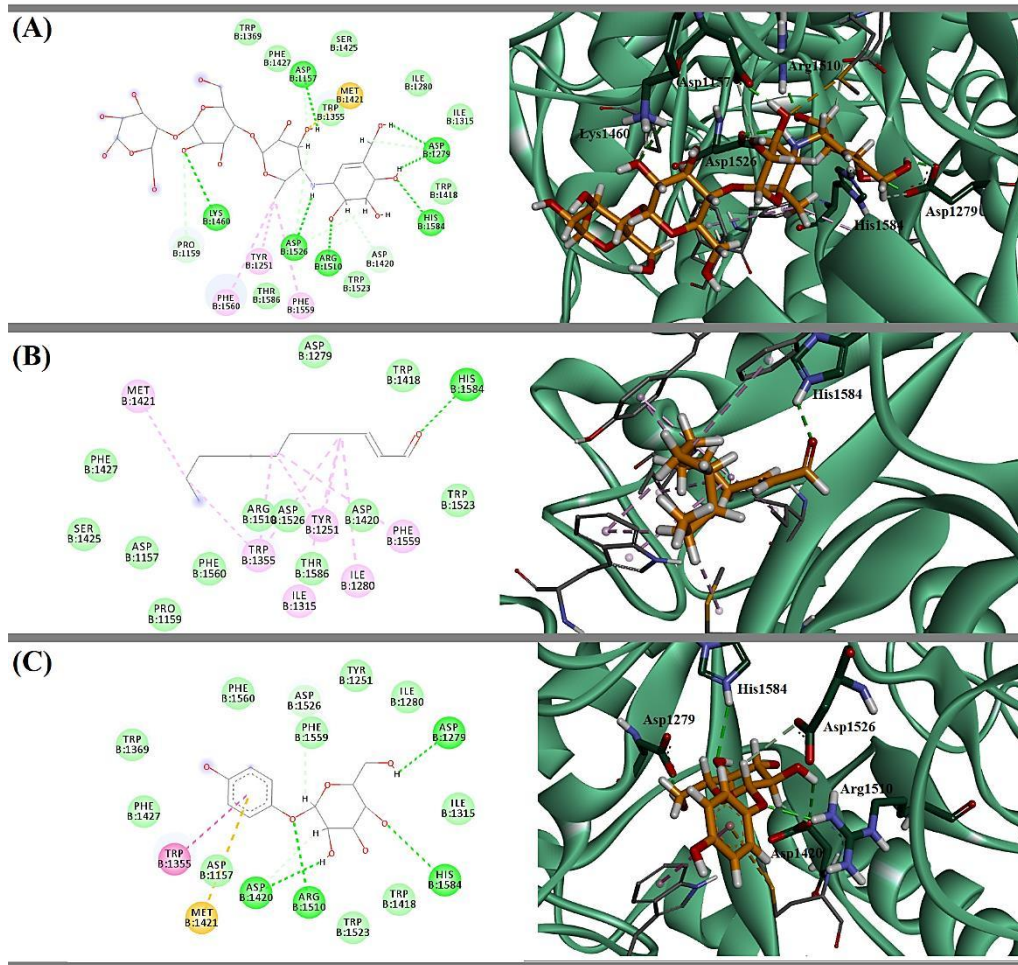
O estudo de *docking* molecular com a maltase-glicoamilase humana subunidade C-terminal foi realizado com o objetivo de avaliar as afinidades de ligação, as conformações e as principais interações intermoleculares estabelecidas entre os ligantes (*E*)-2-dodecenal e arbutina com o sítio catalítico da enzima, tendo em vista o interesse em avaliar a atuação desses compostos no processo de metabolismo dos carboidratos. Observam-se, então, as conformações e as principais interações intermoleculares obtidas pelo *docking* da maltase-glicoamilase humana subunidade C-terminal (PDBid: 3TOP) com a acarbose e os ligantes (Figura 25).

A acarbose interagiu com o sítio catalítico da maltase-glicoamilase humana subunidade C-terminal (PDBid: 3TOP) através de ligações de hidrogênio com os resíduos Asp1157, Asp1279, Lys1460, Arg1510, Asp1526 e His1584 (Figura 25A), além de interações do tipo π -alquil com os resíduos Tyr1251, Phe1559 e Phe1560. O valor de energia livre foi de -8,0 kcal/mol (Tabela 13). De acordo com Ren e colaboradores (2011), a acarbose interage com a MGAM-C através de ligações de hidrogênio com os resíduos Asp1157, Asp1279, Arg1510, Asp1526 e His1584, todas perfeitamente observadas nos resultados deste estudo, além de interações hidrofóbicas que auxiliam na estabilização dos anéis da acarbose.

O (*E*)-2-dodecenal estabeleceu ligação de hidrogênio com o resíduo His1584 e interações de Van der Waals com os resíduos Asp1157, Asp1279, Arg1510 e Asp1526 (Figura 25B). Nota-se também interações dos tipos alquil e π -alquil com os resíduos Tyr1251, Ile1280, Ile1315, Trp1355, Met1421 e Phe1559, que podem atuar na estabilização da molécula. O valor de energia livre foi de -5,5 kcal/mol (Tabela 13). Estes resultados apresentam uma correlação positiva com o resultado do ensaio *in vitro* da alfa-glicosidase, no qual o (*E*)-2-dodecenal na concentração de 2 mg/mL apresentou $41,67 \pm 1,21\%$ de inibição da enzima.

Já a arbutina estabeleceu ligações de hidrogênio com os resíduos Asp1279, Asp1420, Arg1510 e Asp1526 e interação dipolo-permanente com Asp1526 (Figura 25C), sendo o valor de energia livre de -7,6 kcal/mol (Tabela 13). É possível observar também uma interação do tipo π -stacking entre o anel aromático do ligante com o resíduo Trp1355 e uma interação π -sulfur com o resíduo Met1421. Estes resultados confirmam o obtido pelo ensaio *in vitro* da alfa-glicosidase com a arbutina a 2 mg/mL, cuja inibição da enzima foi de $32,77 \pm 0,70\%$.

Figura 25 - Conformações e principais interações intermoleculares entre os ligantes e a maltase-glicoamilase humana subunidade C-terminal.



Conformações e principais interações intermoleculares entre (A) acarbose, (B) (*E*)-2-dodecenal e (C) arbutina com os resíduos do sítio catalítico da maltase-glicoamilase humana subunidade C-terminal (PDBid: 3TOP). As imagens foram geradas através do programa Discovery Studio v20.1.0.19295 2020. Legenda: Verde escuro: ligação de hidrogênio; Verde claro: van der waals; Rosa claro: alquil ou π -alquil; Rosa escuro: π -stacking; amarelo: π -sulfur; Azul claro: dipolo-permanente.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Uma característica química importante quando se trata de inibição da alfa-amilase pancreática e da alfa-glicosidase é o grau de hidroxilação das moléculas. Isto porque são os grupos hidroxila que irão interagir com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico estabelecendo ligações de hidrogênio. Nesse sentido, moléculas com alto grau de hidroxilação poderão apresentar capacidade inibitória significativa frente a essas enzimas (SUN, MIAO, 2019). Com os resultados de *docking* molecular deste estudo, pode-se observar o elevado número de ligações de hidrogênio estabelecidas pela acarbose com o sítio catalítico de ambas as enzimas, graças ao elevado grau de hidroxilação da molécula deste inibidor. Em contrapartida, a arbutina estabelece um número inferior de ligações de hidrogênio, visto que possui poucos grupos hidroxila em sua estrutura química.

5.6.4 *Docking* molecular da lipase pancreática

A lipase pancreática é uma enzima responsável por catalisar a reação de hidrólise das ligações éster nas moléculas de triacilglicerol. A atividade da enzima é favorecida pela presença de um cofator, a colipase, que possui a função de ancorar a lipase na superfície das micelas formadas pelo triacilglicerol em meio aquoso. Dessa forma, mudanças conformacionais importantes ocorrem na superfície da lipase, que passa para sua forma “aberta” expondo o sítio catalítico, que é uma região mais hidrofóbica, favorecendo a ligação do triacilglicerol (VAN TILBEURGH et al., 1992; MENDES, OLIVEIRA, DE CASTRO, 2012).

O mecanismo catalítico da lipase pancreática envolve a participação de três resíduos de aminoácidos principais: ácido aspártico (Asp176), serina (Ser152) e histidina (His263). Inicialmente, o grupo carregado negativamente do ácido aspártico forma uma ligação de hidrogênio com a histidina, o que aumenta o pKa do seu nitrogênio imidazólico e a torna uma base forte. Assim, a histidina é capaz de remover um próton do grupo hidroxila do resíduo de serina que, por sua vez, atua como um nucleófilo e ataca o grupo carbonila do triacilglicerol. Então, forma-se um primeiro intermediário carregado negativamente que, através de ligações de hidrogênio, é estabilizado por resíduos de fenilalanina e leucina. Após ser estabilizado, a ligação C=O retorna no intermediário, o que promove a clivagem da ligação éster formando um complexo acil-enzima. O íon hidroxila proveniente da molécula de água ataca o carbono do complexo acil-enzima abrindo a ligação C=O e formando um segundo intermediário. A ligação C=O retorna liberando como produto um ácido graxo e recuperando o sítio catalítico da enzima (MENDES, OLIVEIRA, DE CASTRO, 2012).

O estudo de *docking* molecular com a lipase pancreática humana foi realizado com o objetivo de avaliar as afinidades de ligação, as conformações e as principais interações intermoleculares estabelecidas entre os ligantes (*E*)-2-dodecenal e arbutina com o sítio catalítico da enzima, tendo em vista o interesse em avaliar a atuação desses compostos no processo de metabolismo dos lipídios. A Figura 26 demonstra as conformações e as principais interações intermoleculares obtidas pelo *docking* da lipase pancreática humana (PDBid: 1LPB) com o orlistate e os ligantes.

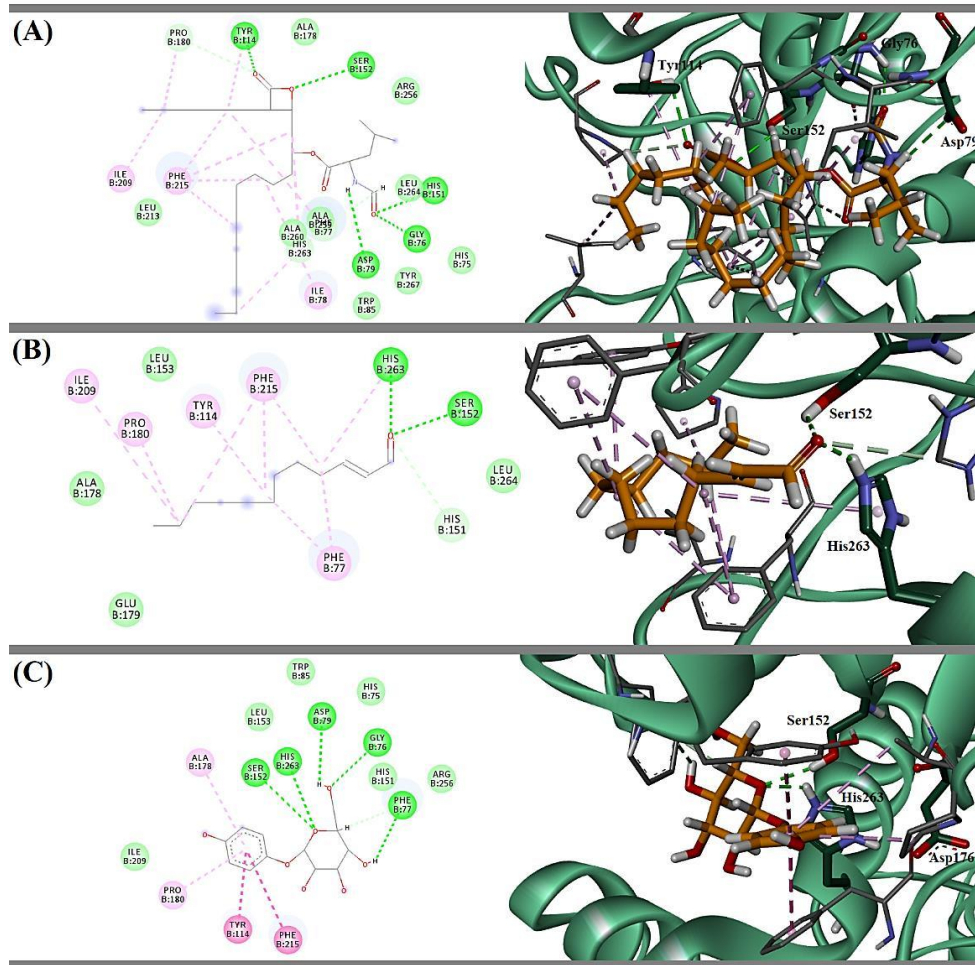
O orlistate (tetrahidrolipstatina) interagiu com a lipase pancreática através de ligações de hidrogênio com os resíduos Ser152, His151, Gly76, Asp79 e Tyr114 e interação dipolo-permanente com o resíduo His263 (Figura 26A). Além disso, várias interações dos tipos alquil e π -alquil são observadas com os resíduos Phe77, Ile78, Tyr114, Ile209, Pro180, Phe215 e His263. O valor de energia livre foi de -6,7 kcal/mol (Tabela 13). Estes dados corroboram os

resultados de Nguyen e colaboradores (2020) que, ao realizar o *docking* do orlistate com a lipase pancreática (PDBid: 1LPB), também obtiveram ligações de hidrogênio com os resíduos Ser152, His151 e Asp79 e um valor de energia livre semelhante de -6,7 kcal/mol.

O (*E*)-2-dodecenal interagiu através de ligações de hidrogênio com os resíduos Ser152 e His263 (Figura 26B), principais responsáveis pela atividade catalítica da enzima, o que justifica a sua inibição equivalente ao orlistate apontada no ensaio *in vitro*. Além disso, observa-se também interações dos tipos alquil e π -alquil com os resíduos Phe77, Tyr114, Pro180, Ile209, Phe215 e His263 que podem auxiliar na estabilização da molécula. O valor de energia livre foi de -5,3 kcal/mol (Tabela 13).

A arbutina foi capaz de estabelecer ligações de hidrogênio com os resíduos Ser152 e His263 (Figura 26C), com valor de energia livre de -7,7 kcal/mol (Tabela 13), superior à energia livre do orlistate. Esses dados explicam a inibição de $28,47 \pm 2,78\%$ da atividade da lipase pancreática apresentada pela arbutina (2 mg/mL) no ensaio *in vitro*. Além disso, é possível observar duas interações do tipo π -alquil entre o anel aromático e os resíduos Ala178 e Pro180, e também duas interações π -stacking com os resíduos Tyr114 e Phe215. Na literatura, ainda não há estudos de *docking* molecular da lipase pancreática com o (*E*)-2-dodecenal e a arbutina.

Figura 26 - Conformações e principais interações intermoleculares entre os ligantes e a lipase pancreática humana.



Conformações e principais interações intermoleculares entre (A) orlistate, (B) (*E*)-2-dodecenal e (C) arbutina com os resíduos do sítio catalítico da lipase pancreática humana (PDBid: 1LPB). As imagens foram geradas através do programa Discovery Studio v20.1.0.19295 2020. Legenda: Verde escuro: ligação de hidrogênio; Verde claro: van der waals; Rosa claro: alquil ou π -alquil; Rosa escuro: π -stacking; Azul claro: dipolo-permanente.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Tabela 13 - Valores de energia livre obtidos a partir do *docking* molecular com as enzimas.

Ligante	Energia livre (kcal/mol)		
	Alfa-amilase pancreática	Maltase-glicoamilase	Lipase pancreática
Acarbose	-7,8	-8,0	-
Orlistate	-	-	-6,7
(<i>E</i>)-2-dodecenal	-4,4	-5,5	-5,3
Arbutina	-6,9	-7,6	-7,7

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

6. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos com o presente estudo, pode-se obter as seguintes conclusões:

Os extratos EFS e EFF de *E. foetidum* apresentaram teores expressivos de compostos fenólicos, incluindo flavonoides, embora as concentrações desses metabólitos tenham sido inferiores no EFS. Essa variação nos teores de fenóis e flavonoides totais possivelmente está relacionada ao processo de secagem das folhas da planta, já que temperaturas mais elevadas podem contribuir para a degradação de alguns compostos;

Com relação à atividade antioxidante, EFF, EFS e arbutina foram capazes de sequestrar o radical DPPH• e de reduzir íons ferro. Em contrapartida, a cinética de reação demonstrou que o (*E*)-2-dodecenal não reagiu com o radical DPPH• nas concentrações testadas. No método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, EFF, (*E*)-2-dodecenal e arbutina se mostraram eficazes em inibir a peroxidação lipídica;

Os ensaios de inibição da atividade enzimática demonstraram que o (*E*)-2-dodecenal e a arbutina inibiram a alfa-amilase pancreática com maior eficiência, embora em concentrações maiores quando comparadas aos extratos. Com relação à alfa-glicosidase, EFF, EFS, (*E*)-2-dodecenal e arbutina foram capazes de inibir a atividade da enzima, sendo que o EFF se mostrou mais eficaz que o fármaco de referência (acarbose). No ensaio com a lipase pancreática, (*E*)-2-dodecenal e EFS apresentaram inibições equivalentes ao orlistate;

O estudo de *docking* molecular revelou que (*E*)-2-dodecenal e a arbutina foram capazes de interagir com os resíduos de aminoácidos mais importantes dos sítios catalíticos da alfa-amilase pancreática, alfa-glicosidase e lipase pancreática, inclusive através de ligações de hidrogênio, o que pode justificar a ação inibitória apresentada por esses compostos;

Portanto, as folhas de *Eryngium foetidum* são fontes de substâncias fenólicas que, assim como o (*E*)-2-dodecenal e a arbutina, apresentam potencial antioxidante e inibitório frente as enzimas digestivas, podendo ser agentes promissores para o desenvolvimento de produtos terapêuticos para prevenção e/ou tratamento de distúrbios metabólicos associados a processos oxidativos.

REFERÊNCIAS

ADNAN, T.; AHMAD, M.; CHAUDHRI, W. M.; ZIL-E-ALI, A.; GONDAL, M. U. M.; ALI, S. M. H.; NUSRAT, M.; WASIQ, S. Pathophysiology of dyslipidemia and its management by PCSK9 inhibitors: A literature review. **Internal Medicine and Medical Investigation Journal**, v. 3, n. 3, p. 92-99, 2018.

ADT. Disponível em: <http://autodock.scripps.edu/resources/adt>. Acesso em: 19 ago. 2021.

AFOLABI, O. B.; OLOYEDE, O. I.; AGUNBIADE, S. O. Inhibitory potentials of phenolic-rich extracts from *Bridelia ferruginea* on two key carbohydrate-metabolizing enzymes and Fe²⁺-induced pancreatic oxidative stress. **Journal of Integrative Medicine**, v. 16, n. 3, p. 192-198, 2018.

ALI, S. S.; AHSAN, H.; ZIA, M. K.; SIDDIQUI, T.; KHAN, F. H. Understanding oxidants and antioxidants: classical team with new players. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 1-13, 2020.

ASHWATY, P. M.; SAJ, O. P. Carminative, phytochemical and antioxidant potentialities of the leaf extracts of *Eryngium foetidum* L. (Apiaceae). **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 2269-2280, 2014.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.

AVELAR, T. M. T.; STORCH, A. S.; CASTRO, L. A.; AZEVEDO, G. V. M. M.; FERRAZ, L.; LOPES, P. F. Oxidative stress in the pathophysiology of metabolic syndrome: which mechanisms are involved? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 4, p. 231-239, 2015.

BIGAGLI, E.; LODOVICI, M. Circulating oxidative stress biomarkers in clinical studies on type 2 diabetes and its complications. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1-17, 2019.

BIOVIA, Dassault Systèmes,[Discovery Studio], [v20.1.0.19295 2020]. Disponível em: <<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>>. Acesso em: março de 2021.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BOLIGON, A. A.; MACHADO, M. M.; ATHAYDE, M. L. Technical evaluation of antioxidant activity. **Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 7, p. 517-522, 2014.

BONIFACIO, M. A.; CERQUENI, G.; COMETA, S.; LICINI, C.; SABBATINI, L.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; DE GIGLIO, E. Insights into arbutin effects on bone cells: Towards the development of antioxidant titanium implants. **Antioxidants**, v. 9, n. 7, p. 579, 2020.

BORST, S. E. The role of TNF- α in insulin resistance. **Endocrine**, v. 23, n. 2-3, p. 177-182, 2004.

BOUCHAËLA, E.; BOUALI, M.; ALI, Y. B.; MILED, N.; GARGOURI, Y.; FENDRI, A. Biochemical characterization and molecular modeling of pancreatic lipase from a cartilaginous fish, the common stingray (*Dasyatis pastinaca*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 1, p. 151-169, 2015.

BRAYER, G. D.; LUO, Y.; WITHERS, S. G. The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. **Protein Science**, v. 4, n. 9, p. 1730-1742, 1995.

BRAYER, G. D.; SIDHU, G.; MAURUS, R.; RYDBERGL, E. H.; BRAUN, C.; WANG, Y.; NGUYEN, N. T.; OVERALL, C. M.; WITHERS, S. G. Subsite mapping of the human pancreatic R-Amylase active site through structural, kinetic, and mutagenesis techniques. **Biochemistry**, v. 39, n. 16, p. 4778-4791, 2000.

CALVIÑO, C. I.; MARTÍNEZ, S. G.; DOWNIE, S. R. The evolutionary history of *Eryngium* (Apiaceae, Saniculoideae): rapid radiations, long distance dispersals, and hybridizations. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 46, n. 3, p. 1129-1150, 2008.

CAREY, M. C.; SMALL, D. M.; BLISS, C. M. Lipid digestion and absorption. **Annual Review of Physiology**, v. 45, n. 1, p. 651-677, 1983.

CHANDRIKA, R.; JAGATH, V.; THARA SARASWATHI, K. J. *In vitro* antioxidant and anti-proliferative activities in *Eryngium foetidum* L. **International Journal of Pharma Research and Health Sciences**, v. 4, n. 2, p. 1110-1116, 2016.

CHELLADURAI, G. R. M.; CHINNACHAMY, C. Alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory effects of aqueous stem extract of *Salacia oblonga* and its GC-MS analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 1, p. 1-10, 2018.

CHEMAXON, s.d. Disponível em: <<http://www.chemaxon.com/download/marvin-suite/#marvin>>. Acessado em Julho de 2021.

CHOWDHURY, J. U.; NANDI, N. C.; YUSUF, M. Chemical constituents of essential oil of the leaves of *Eryngium foetidum* from Bangladesh. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 42, n. 3, p. 347-352, 2007.

DALUKDENIYA, D. A. C. K.; RATHNAYAKA, R. M. U. S. K. Comparative study on antibacterial and selected antioxidant activities of different *Eryngium foetidum* extracts. **Journal of Applied Life Sciences International**, v. 12, n. 4, p. 1-7, 2017.

DANIEL-JAMBUN, D.; DWIYANTO, J.; LIM, Y. Y.; TAN, J. B. L.; MUHAMAD, A.; YAP, S. W.; LEE, S. M. Investigation on the antimicrobial activities of gingers (*Etilingera coccinea* (Blume) S.Sakai & Nagam and *Etilingera sessilanthera* R.M.Sm.) endemic to Borneo. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 810-818, 2017.

DA SILVA, V. A.; DA SILVA, A. N.; JUNIOR, S. S.; BORGES, L. S.; SOUZA, A. M. Levantamento do cultivo do coentrão (*Eryngium foetidum* L.) nas áreas produtoras de Cáceres-MT. **Revista Cultivando o Saber**, v. 9, n. 1, p. 70-83, 2016.

DAWILAI, S.; MUANGNOI, C.; PRAENGAMTHANACHOTI, P.; TUNTIPOPIPAT, S. Anti-inflammatory activity of bioaccessible fraction from *Eryngium foetidum* leaves. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

DONEGA, M. A.; MELLO, S. C.; MORAES, R. M.; JAIN, S. K.; TEKWANI, B. L.; CANTRELL, C. L. Pharmacological activities of cilantro's aliphatic aldehydes against *Leishmania donovani*. **Planta Medica**, v. 80, n. 18, p. 1706-1711, 2014.

DROZDZ, D.; ALVAREZ-PITTI, J.; WÓJCIK, M.; BORGHI, C.; GABBIANELLI, R.; MAZUR, A.; HERCEG-CAVRAK, V.; LOPEZ-VALCARCEL, B. G.; BRZEZINSKI, M.; LURBE, E.; WÜHL, E. Obesity and cardiometabolic risk factors: From childhood to adulthood. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 1-20, 2021.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

EGLOFF, M-P.; MARGUET, F.; BUONO, G.; VERGER, R.; CAMBILLAU, C.; VAN TILBEURGH, H. The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate. **Biochemistry**, v. 34, p. 2751-2762, 1995.

ERDEM, S. A.; NABAVI, S. F.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; IZADI, M.; NABAVI, S. M. Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus *Eryngium*. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 1-22, 2015.

FERNANDEZ-PANCHON, M. S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARRILLA, M. C. Antioxidant activity of phenolic compounds: From *in vitro* results to *in vivo* evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 7, p. 649-671, 2008.

FERREIRA, L. G.; DOS SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FILIPPATOS, T. D.; FLORENTIN, M.; GEORGOULA, M.; ELISAF, M. S. Pharmacological management of diabetic dyslipidemia. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 187-200, 2017.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137-188, 2013.

FORBES, W. M.; GALLIMORE, W. A.; MANSINGH, A.; REESE, P. B.; ROBINSON, R. D. Eryngial (*trans*-2-dodecenal), a bioactive compound from *Eryngium foetidum*: its identification, chemical isolation, characterization and comparison with ivermectin *in vitro*. **Parasitology**, v. 141, n. 2, p. 269-278, 2014.

FOTI, M. C. Use and abuse of the DPPH• radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 40, p. 8765-8776, 2015.

GARCÍA, M. D.; SÁENZ, M. T.; GÓMEZ, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A. Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from *Eryngium foetidum* on chronic and acute inflammation models. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 1, p. 78-80, 1999.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOODMAN, B. E. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. **Advances in Physiology Education**, v. 34, n. 2, p. 44-53, 2010.

GUERCIOLINI, R. Mode of action of orlistat. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 21, p. 12-23, 1997.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.

GULCIN, I. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651-715, 2020.

GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 98-99, 2002.

HAIDA, Z.; HAKIMAN, M. A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 5, p. 1555-1563, 2019.

HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G. R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2012.

HE, P-P.; JIANG, T.; OUYANG, X-P.; LIANG, Y-Q.; ZOU, J-Q.; WANG, Y.; SHEN, Q-Q.; LIAO, L.; ZHENG, X-L. Lipoprotein lipase: Biosynthesis, regulatory factors, and its role in atherosclerosis and other diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 480, p. 126-137, 2018.

HERNANDEZ-SANTANA, Y. E.; GIANNOUDAKI, E.; LEON, G.; LUCITT, M. B.; WALSH, P. T. Current perspectives on the interleukin-1 family as targets for inflammatory disease. **European Journal of Immunology**, v. 49, n. 9, p. 1306-1320, 2019.

HIRANO, T. Pathophysiology of diabetic dyslipidemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 25, p. 771-782, 2018.

HRELIA, S.; ANGELONI, C. New mechanisms of action of natural antioxidants in health and disease. **Antioxidants**, v. 9, n. 4, p. 1-5, 2020.

HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Disease models & mechanisms**, v. 2, n. 5-6, p. 231-237, 2009.

- JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; SVENDSEN, A. B.; AYNEHCHI, Y. The essential oil of *Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss.: chemical composition and antimicrobial activity. **Pharmaceutisch Weekblad**, v. 6, n. 4, p. 157-160, 1984.
- JARAMILLO, B. E.; DUARTE, E.; MARTELO, I. Composición química volátil del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. colombiano y determinación de su actividad antioxidante. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 16, n. 2, p. 140-150, 2011.
- JIANG, L.; WANG, D.; ZHANG, Y.; LI, J.; WU, Z.; WANG, Z.; WANG, D. Investigation of the pro-apoptotic effects of arbutin and its acetylated derivative on murine melanoma cells. **International Journal of Molecular medicine**, v. 41, p. 1048-1054, 2018
- JIN, W.; BROEDL, U. C.; MONAJEMI, H.; GLICK, J. M.; RADER, D. J. Lipase H, a new member of the triglyceride lipase family synthesized by the intestine. **Genomics**, v. 80, n. 3, p. 268-273, 2002.
- JONGKEES, S. A. K.; CANER, S.; TYSOE, C.; BRAYER, G. D.; WITHERS, S. G.; SUGA, H. Rapid discovery of potent and selective glycosidase-inhibiting de novo peptides. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 3, p. 381-390, 2017.
- JULIUS, U. Niacin as antidyslipidemic drug. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 93, n. 12, p. 1043-1054, 2015.
- KELLETT, G. L.; BROT-LAROCHE, E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 3056-3062, 2005.
- KAUR, N.; KUMAR, V.; NAYAK, S. K.; WADHWA, P.; KAUR, P.; SAHU, S. K. Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus: A comprehensive review. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 98, n. 4, p. 539-560, 2021.
- KHADIR, F.; POURAMIR, M.; JOORSARAE, S. G.; FEIZI, F.; SORKHI, H.; YOUSEFI, F. The effect of arbutin on lipid peroxidation and antioxidant capacity in the serum of cyclosporine-treated rats. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 6, n. 4, p. 196-200, 2015.
- KHERA, A.; MCGUIRE, D. K. Management of diabetic dyslipidemia. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 5, n. 2, p. 83-91, 2005.
- KO, C. W.; QU, J.; BLACK, D. D.; TSO, P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 3, p. 169-183, 2020.
- KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; DE GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 8-17, 2002.
- LAPIS, T. J.; PENNER, M. H.; BALTO, A. S.; LIM, J. Oral digestion and perception of starch: effects of cooking, tasting time, and salivary α -amylase activity. **Chemical Senses**, v. 42, n. 8, p. 635-645, 2017.

- LECLERCQ, P. A.; DUÑG, N. X.; LÔ, V. N.; TOANH, N. V. Composition of the essential oil of *Eryngium foetidum* L. from Vietnam. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, n. 4, p. 423-424, 1992.
- LEE, H-J.; KIM, K-W. Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. **Inflammation Research**, v. 61, n. 8, p. 817-825, 2012.
- LEITÃO, D. S. T. C.; SIQUEIRA, F. C.; SOUSA, S. H. B.; MERCADANTE, A. Z.; CHISTÉ, R. C.; LOPES, A. S. Amazonian *Eryngium foetidum* leaves exhibited very high contents of bioactive compounds and high singlet oxygen quenching capacity. **International Journal of Food Properties**, v. 23, n. 1, p. 1452-1464, 2020.
- LEV, E. Reconstructed materia medica of the Medieval and Ottoman al-Sham. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 2-3, p. 167-179, 2002.
- LI, C.; BEGUM, A.; NUMAO, S.; PARK, K. H.; WITHERS, S. G.; BRAYER, G. D. Acarbose rearrangement mechanism implied by the kinetic and structural analysis of human pancreatic R-Amylase in complex with analogues and their elongated counterparts. **Biochemistry**, v. 44, p. 3347-3357, 2005.
- LIU, J.; WANG, Y.; LIN, L. Small molecules for fat combustion: targeting obesity. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 9, n. 2, p. 220-236, 2019.
- LO PIPARO, E.; SCHEIB, H.; FREI, N.; WILLIAMSON, G.; GRIGOROV, M.; CHOU, C. J. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3555-3561, 2008.
- LV, L.; ZHANG, J.; TIAN, F.; LI, X.; LI, D.; YU, X. Arbutin protects HK-2 cells against high glucose induced apoptosis and autophagy by up-regulating microRNA-27a. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 2940-2947, 2019.
- MABEKU, L. B. K.; BILLE, B. E.; NGUEPI, E. *In vitro* and *in vivo* anti-*helicobacter* activities of *Eryngium foetidum* (Apiaceae), *Bidens pilosa* (Asteraceae), and *Galinsoga ciliata* (Asteraceae) against *Helicobacter pylori*. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-7, 2016.
- MACEDO, J. M.; SOUZA, L. G. P.; VALENZUELA, V. C. T.; OLIVEIRA, A. B.; CASTILHO, R. O.; JÁCOME, R. L. R. P. Variação sazonal nos teores de flavonoides, taninos e atividade antioxidante de *Davilla rugosa* Poir. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 585-590, 2013.
- MAI, T. T.; THU, N. N.; TIEN, P. G.; CHUYEN, N. V. Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 53, p. 267-276, 2007.
- MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 3, p. 205-212, 1999.

MALIK, T.; PANDEY, D. K.; ROY, P.; OKRAM, A. Evaluation of phytochemicals, antioxidant, antibacterial and antidiabetic potential of *Alpinia galanga* and *Eryngium foetidum* plants of Manipur (India). **Pharmacognosy Journal**, v. 8, n. 5, p. 459-464, 2016.

MANJUNATHA, L.; KUMAR, V.; SANNABOMMAJI, T.; POORNIMA, D. V.; RAJASHEKAR, J.; GAJULA, H. *In vitro* antioxidant and antidiabetic properties of *Eryngium foetidum* Linn. **Biomedicine**, v. 39, n. 4, p. 1-7, 2019.

MANVILLE, R. W.; ABBOTT, G. W. Cilantro leaf harbors a potent potassium channel-activating anticonvulsant. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 10, p. 11349-11363, 2019.

MARTINS, A. P.; SALGUEIRO, L. R.; DA CUNHA, A. P.; VILA, R.; CAÑIGUERAL, S.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Essential oil composition of *Eryngium foetidum* from S. Tomé e Príncipe. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 2, p. 93-95, 2003.

MCARDLE, M. A.; FINUCANE, O. M.; CONNAUGHTON, R. M.; MCMORROW, A. M.; ROCHE, H. M. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, p. 1-23, 2013.

MCCRACKEN, E.; MONAGHAN, M.; SREENIVASAN, S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. **Clinics in dermatology**, v. 36, n. 1, p. 14-20, 2018.

MEDBOUHI, A.; BENBELAÏD, F.; DJABOU, N.; BEAUFAY, C.; BENDAHO, M.; QUETIN-LECLERCQ, J.; TINTARU, A.; COSTA, J.; MUSELLI, A. Essential oil of algerian *Eryngium campestre*: chemical variability and evaluation of biological activities. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 1-16, 2019.

MEKHORA, C.; MUANGNOI, C.; CHINGSUWANROTE, P.; DAWILAI, S.; SVASTI, S.; CHASRI, K.; TUNTIPOPIPAT, S. *Eryngium foetidum* suppresses inflammatory mediators produced by macrophages. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 2, p. 653-664, 2012.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p.119-134, 2012.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C. D.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MEZA, C. A.; LA FAVOR, J. D.; KIM, D-H.; HICKNER, R. C. Endothelial dysfunction: is there a hyperglycemia-induced imbalance of NOX and NOS?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 1-31, 2019.

MIGAS, P.; KRAUZE-BARANOWSKA, M. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 35-40, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 48, n. 2, p. 91, 1971.

MILKOVIC, L.; GASPAROVIC, A. C.; CINDRIC, M.; MOUTHUY, P-A.; ZARKOVIC, N. Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 1-14, 2019.

MIRSHAIVALAD, S.; FEIZI, F.; BARKHORDAR, A.; BAHADORAM, M.; HOUSHMAND, G.; POURAMIR, M. Hepatoprotective effects of arbutin against liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 11, n. 3, p.1-8, 2016.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K.; Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical and results. **Food Chemistry**, v. 130, n.4, p. 1036-1043, 2012.

MOLDOGAZIEVA, N. T.; MOKHOSOEV, I. M.; MEL'NIKOVA, T. I.; ZAVADSKIY, S. P.; KUZ'MENKO, A. N.; TARENTIEV, A. A. Dual character of reactive oxygen, nitrogen, and halogen species: endogenous sources, interconversions and neutralization. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, n. 1, p. 56-78, 2020.

MUKHERJEE, M. Human digestive and metabolic lipases - a brief review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 5-6, p. 369-376, 2003.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 1-30, 2021.

NARAYANASWAMI, V.; DWOSKIN, L. P. Obesity: Current and potential pharmacotherapeutics and targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 170, p. 116-147, 2017.

NGUYEN, P. T. V.; HUYNH, H. A.; TRUONG, D. V.; TRAN, T-D.; VO, C-V. T. Exploring aurone derivatives as potential human pancreatic lipase inhibitors through molecular docking and molecular dynamics simulations. **Molecules**, v. 25, p. 1-15, 2020.

NICHOLS, B. L.; AVERY, S.; SEN, P.; SWALLOW, D. M.; HAHN, D.; STERCHI, E. The maltase-glucoamylase gene: common ancestry to sucrase-isomaltase with complementary starch digestion activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 3, p. 1432-1437, 2003.

OKUYAMA, M.; SABURI, W.; MORI, H.; KIMURA, A. α -Glucosidases and α -1,4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 14, p. 2727-2751, 2016.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307-315, 1986.

PAUL, J. H. A.; SEAFORTH, C. E.; TIKASINGH, T. *Eryngium foetidum* L.: a review. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 302-308, 2011.

PEREIRA, C. A.; PEREIRA, L. L. S.; CORRÊA, A. D.; CHAGAS, P. M. B.; SOUZA, S. P.; SANTOS, C. D. Inibição de enzimas digestivas por extratos de pó comercial de *Hoodia gordonii* utilizado no tratamento da obesidade. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 9, n. 3, p. 265-269, 2011.

PHAN, D. T. A. Screening of antioxidant and tyrosinase inhibition activities of spicy vegetables in Vietnam and application of *Persicaria odorata* leaf extract to preservative white leg shrimp (*Litopenaus vannamei*). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, Suppl. 3, p. 1-11, 2021.

PINO, J. A.; ROSADO, A.; FUENTES, V. Composition of the leaf oil of *Eryngium foetidum* L. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 4, p. 467-468, 1997.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular *docking*: Shifting paradigms in drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 1-23, 2019.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; CIMPEANU, C.; PREDOI, G. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-36, 2016.

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-13, 2017.

PROMKUM, C.; BUTRYEE, C.; TUNTIPOPIPAT, S.; KUPRADINUN, P. Anticlastogenic effect of *Eryngium foetidum* L. assessed by erythrocyte micronucleus assay. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 7, p. 3343-3347, 2012.

PROMTES, K.; KUPRADINUN, P.; RUNGSIPIPAT, A.; TUNTIPOPIPAT, S.; BUTRYEE, C. Chemopreventive effects of *Eryngium foetidum* L. leaves on COX-2 reduction in mice induced colorectal carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 1, p. 144-153, 2016.

RASOULI, H.; YARANI, R.; POCIOT, F.; POPOVIĆ-DJORDJEVIĆ, J. Anti-diabetic potential of plant alkaloids: Revisiting current findings and future perspectives. **Pharmacological Research**, v. 155, p. 1-28, 2020.

REFARDT, J.; WINZELER, B.; CHRIST-CRAIN, M. Diabetes insipidus: An update. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 49, n. 3, p. 517-531, 2020.

REN, L.; QIN, X.; CAO, X.; WANG, L.; BAI, F.; BAI, G.; SHEN, Y. Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase. **Protein & Cell**, v. 2, n. 10, p. 827-836, 2011.

REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. **Lipid peroxidation**, v. 1, p. 3-30, 2012.

ROCHLANI, Y.; POTHINENI, N. V.; KOVELAMUDI, S.; MEHTA, J. L. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. **Therapeutic advances in cardiovascular disease**, v. 11, n. 8, p. 215-225, 2017.

ROJAS-SILVA, P.; GRAZIOSE, R.; VESELY, B.; POULEV, A.; MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; KYLE, D. E.; LILA, M. A.; RASKIN, I. Leishmanicidal activity of a daucane sesquiterpene isolated from *Eryngium foetidum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 3, p. 398-401, 2014.

SAEEDI, M.; KHEZRI, K.; ZAKARYAEI, A. S.; MOHAMMADAMINI, H. A comprehensive review of the therapeutic potential of α -arbutin. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 8, p. 4136-4154, 2021.

SAFARI, H.; ZABIHI, E.; POURAMIR, M.; MORAKABATI, P.; ABEDIAN, Z.; KARKHAH, A.; NOURI, H. R. Decrease of intracellular ROS by arbutin is associated with apoptosis induction and downregulation of IL-1 β and TNF- α in LNCaP; prostate cancer. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 1-9, 2020.

SAK, K. Dependence of DPPH radical scavenging activity of dietary flavonoid quercetin on reaction environment. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 494-504, 2014.

SCHNELL, S. Validity of the Michaelis–Menten equation—steady-state or reactant stationary assumption: that is the question. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 2, p. 464-472, 2014.

SCHWARTZ, S. S.; EPSTEIN, S.; CORKEY, B. E.; GRANT, S. F.; GAVIN III, J. R.; AGUILAR, R. B.; HERMAN, M. E. A unified pathophysiological construct of diabetes and its complications. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 9, p. 645-655, 2017.

SEIBERT, E.; TRACY, T. S. Fundamentals of enzyme kinetics. In: NAGAR, S.; ARGIKAR, U. A.; TWEEDIE, D. J. **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism: Fundamentals and Applications**. Totowa: Humana Press, 2014. p. 9-22.

SIM, L.; QUEZADA-CALVILLO, R.; STERCHI, E. E.; NICHOLS, B. L.; ROSE, D. R. Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 375, n. 3, p. 782-792, 2008.

SINGH, S.; SINGH, D. R.; SALIM, K. M.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, L. B.; SRIVASTAVA, R. C. Estimation of proximate composition, micronutrients and phytochemical compounds in traditional vegetables from Andaman and Nicobar Islands. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 7, p. 765-773, 2011.

SINGH, S.; SINGH, D. R.; BANU, S.; SALIM, K. M. Determination of bioactives and antioxidant activity in *Eryngium foetidum* L.: A traditional culinary and medicinal herb. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 83, n. 3, p. 453-460, 2013.

SOBCZAK, A. I. S.; BLINDAUER, C. A.; STEWART, A. J. Changes in plasma free fatty acids associated with type-2 diabetes. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 1-42, 2019.

SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAUJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAUJO, P. B. M.; BRANDAO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SUN, L.; MIAO, M. Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 4, p. 541-555. 2019.

SUTTISANSANEE, U.; THIYAJAI, P.; CHALERMCHAIWAT, P.; WONGWATHANARAT, K.; PRUESAPAN, K.; CHAROENKIATKUL, S.; TEMVIRIYANUKUL, P. Phytochemicals and *in vitro* bioactivities of aqueous ethanolic extracts from common vegetables in Thai food. **Plants**, v. 10, p. 1-18, 2021.

SWARGIARY, A.; DAIMARI, A.; DAIMARI, M.; BASUMATARY, N.; NARZARY, E. Phytochemicals, antioxidant, and anthelmintic activity of selected traditional wild edible plants of lower Assam. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 4, p. 418-423, 2016.

TAKEBAYASHI, J.; ISHII, R.; CHEN, J.; MATSUMOTO, T.; ISHIMI, Y.; TAI, A. Reassessment of antioxidant activity of arbutin: Multifaceted evaluation using five antioxidant assay systems. **Free Radical Research**, v. 44, n. 4, p. 473-478, 2010.

TAKII, H.; MATSUMOTO, K.; KOMETANI, T.; OKADA, S.; FUSHIK, T. Lowering effect of phenolic glycosides on the rise in postprandial glucose in mice. **Bioscience, biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 9, p. 1531-1535, 1997.

TEKULU, G. H.; ARAYA, E. M.; MENGESHA, H. G. *In vitro* α -amylase inhibitory effect of TLC isolates of *Aloe megalacantha* baker and *Aloe monticola* Reynolds. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2019.

THOMAS, P. S.; ESSIEN, E. E.; NTUK, S. J.; CHOUDHARY, M. I. *Eryngium foetidum* L. essential oils: chemical composition and antioxidant capacity. **Medicines**, v. 4, n. 2, p. 24, 2017.

THOMPSON, G. R. Management of dyslipidaemia. **Heart**, v. 90, n. 8, p. 949-955, 2004.

TORRES, P. H. M.; SODERO, A. C. R.; JOFILY, P.; SILVA-JR, F. P. Key topics in molecular *docking* for drug design. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 1-29, 2019.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software news and update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

VAN TILBEURGH, H.; SARDA, L.; VERGER, R.; CAMBILLAU, C. Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. **Nature**, v. 359, n. 1, p. 159-162, 1992.

WANG, C-Q.; WANG, X-M.; LI, B-L.; ZHANG, Y-M.; WANG, L. Arbutin suppresses osteosarcoma progression via miR-338-3p/MTHFD1L and inactivation of the AKT/mTOR pathway. **FEBS Open Bio**, v. 11, n. 1, p. 289-299, 2021.

WANG, P.; SU, Z.; YUAN, W.; DENG, G.; LI, S. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). **Pharmaceutical Crops**, v. 3, p. 99-120, 2012.

WILLIAMSON, G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 57, n. 1, p. 48-57, 2013.

WITTIG, U.; REY, M.; KANIA, R.; BITTKOWSKI, M.; SHI, L.; GOLEBIEWSKI, M.; WEIDEMANN, A.; MÜLLER, W.; ROJAS, I. Challenges for an enzymatic reaction kinetics database. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 2, p. 572-582, 2014.

WONG, H.; SCHOTZ, M. C. The lipase gene family. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 7, p. 993-999, 2002.

WONG, K. C.; FENG, M. C.; SAM, T. W.; TAN, G. L. Composition of the leaf and root oils of *Eryngium foetidum* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 6, n. 4, p. 369-374, 1994.

WU, Y.; DING, Y.; TANAKA, Y.; ZHANG, W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 11, p. 1185-1200, 2014.

YANAI, H.; YOSHIDA, H. Beneficial effects of adiponectin on glucose and lipid metabolism and atherosclerotic progression: mechanisms and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1-25, 2019.

YAO, X.; HUANG, J.; ZHONG, H.; SHEN, N.; FAGGIONI, R.; FUNG, M.; YAO, Y. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. **Pharmacology & therapeutics**, v. 141, n. 2, p. 125-139, 2014.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5944-5972, 2011.

YOUSEFI, F.; MAHJOUR, S.; POURAMIR, M.; KHADIR, F. Hypoglycemic activity of *Pyrus bioessieriana* Buhse leaf extract and arbutin: Inhibitory effects on alpha amylase and alpha glucosidase. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 4, n. 4, p. 763-767, 2013.

ZHANG, X.; LI, G.; WU, D.; YU, Y.; HU, N.; WANG, H.; LI, X.; WU, Y. Emerging strategies for the activity assay and inhibitor screening of alpha-glucosidase. **Food & Function**, v. 11, n. 1, p. 66-82, 2020.

ZHOU, L.; FU, X.; JIANG, L.; WANG, L.; BAI, S.; JIAO, Y.; XING, S.; LI, W.; MA, J. Arbutin increases *Caenorhabditis elegans* longevity and stress resistance. **PeerJ**, v. 5, p. 1-15, 2017.

ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA, H.; SITAREK, P.; MERECZ-SADOWSKA, A.; MALINOWSKA, K.; ZAJDEL, K.; JABLONSKA, M.; SLIWINSKI, T.; ZAJDEL, R. Plant

extracts and reactive oxygen species as two counteracting agents with anti- and pro-obesity properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 1-30, 2019.

APÊNDICE A

Capítulo intitulado “Enzimas digestivas e distúrbios fisiopatológicos associados”, publicado no livro Ensino e Pesquisa em Bioquímica, Capítulo 5, Páginas 42 a 58, Ateneu Editora, 2021. ISBN 978-65-5706-803-8.

CAPÍTULO 5

ENZIMAS DIGESTIVAS E DISTÚRBIOS FISIOPATOLÓGICOS ASSOCIADOS

Data de aceite: 04/02/2021

Data da submissão: 28/12/2020

Julianna Oliveira de Lucas Xavier

Universidade Federal de Juiz de Fora,
Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus
Universitário, Juiz de Fora, MG, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/9651862658018674>

Ana Lúcia Santos de Matos Araújo

Universidade Federal de Juiz de Fora,
Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus
Universitário, Juiz de Fora, MG, Brazil
<http://lattes.cnpq.br/0893671644627346>

Orlando Vieira de Sousa

Universidade Federal de Juiz de Fora,
Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus
Universitário, Juiz de Fora, MG, , Brazil
<http://lattes.cnpq.br/9797237863119033>

RESUMO: A digestão dos alimentos compreende transformações físicas e químicas no trato gastrointestinal para que os nutrientes possam ser absorvidos. Essas transformações são desencadeadas por reações enzimáticas que catalisam a quebra de carboidratos, gorduras e proteínas. O amido, por exemplo, é degradado pela α -amilase salivar (ptialina) e α -amilase pancreática que hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 internas, enquanto a α -glicosidase hidrolisa polissacarídeos, oligossacarídeos e dissacarídeos em glicose e outros monossacarídeos nas posições α -1,6 e α -1,4 das extremidades. As lipases gástrica e pancreática

catalisam a digestão dos lipídios da dieta, como os triacilgliceróis, gerando diacilgliceróis, monoacilglicerol e ácidos graxos. Além disso, doenças do metabolismo, como o diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, doença isquêmica do coração e acidente vascular encefálico, assim como a obesidade, o que pode resultar na síndrome metabólica, direta ou indiretamente estão relacionadas às enzimas digestivas. Entre os fármacos usados no tratamento dessas enfermidades, destacam-se os inibidores da α -amilase, α -glicosidase e lipase pancreática. Nesse contexto, os aspectos relevantes sobre as enzimas digestivas foram abordados neste capítulo com o intuito de oferecer um conteúdo consistente e atualizado para os estudantes e profissionais de ciências biológicas e da saúde.

PALAVRAS - CHAVE: Enzimas digestivas. Síndrome metabólica. Diabetes. Dislipidemia. Obesidade.

DIGESTIVE ENZYMES AND ASSOCIATED PATHOPHYSIOLOGICAL DISORDERS

ABSTRACT: The digestion of food comprises physical and chemical changes in the gastrointestinal tract so that nutrients can be absorbed. These transformations are triggered by enzymatic reactions that catalyze the breakdown of carbohydrates, fats and proteins. Starch, for example, is degraded by salivary α -amylase (ptialin) and pancreatic α -amylase that hydrolyze internal α -1,4 glycosidic bonds, while α -glycosidase hydrolyzes polysaccharides, oligosaccharides and disaccharides in glucose and other monosaccharides at the positions α -1,6

and α -1,4 of the extremities. Gastric and pancreatic lipases catalyze the digestion of dietary lipids, such as triacylglycerols, generating diacylglycerols, monoacylglycerol and fatty acids. In addition, metabolic disorders such as type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, atherosclerosis, acute myocardial infarction, ischemic heart disease and stroke, as well as obesity, which can result in metabolic syndrome, directly or indirectly are related to digestive enzymes. Among the drugs used in the treatment of these diseases, α -amylase, α -glycosidase and pancreatic lipase inhibitors have been highlighted. In this context, the relevant aspects of digestive enzymes were addressed in this chapter in order to offer consistent and updated content for biological and health sciences students and professionals.

KEYWORDS: Digestive enzymes. Metabolic syndrome. Diabetes. Dyslipidemia. Obesity.

1 | INTRODUÇÃO

O processo digestivo consiste de um conjunto de transformações físicas e químicas em que os alimentos sofrem no trato gastrointestinal (TGI) após sua ingestão. Para serem absorvidos, os nutrientes são produzidos a partir de reações enzimáticas que catalisam a quebra de carboidratos, gorduras e proteínas, transformando em moléculas mais simples para serem assimiladas pelas células, onde irão exercer importantes funções. Entre as enzimas responsáveis pela digestão dos alimentos no TGI, α -amilase, α -glicosidase e lipases (gástrica e pancreática) são destacadas (GOODMAN, 2010; HARTENSTEIN; MARTINEZ, 2019; JANIÁK, 2016).

Durante a digestão, o amido, por exemplo, é degradado pela ação da α -amilase salivar (ptialina), que o hidrolisa a oligômeros, enquanto a α -amilase pancreática produz maltose, maltotriose e oligossacarídeos (dextrinas), ocorrendo ruptura nas ligações glicosídicas α -1,4 internas. Sendo mais potente, a α -glicosidase, enzima ligada à borda da membrana intestinal, hidrolisa polissacarídeos, oligossacarídeos e dissacarídeos em glicose e outros monossacarídeos nas posições α -1,6 e α -1,4 das extremidades (GOODMAN, 2010). O metabolismo dos carboidratos apresenta estreita relação com doenças, como o diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) (AFOLABI; OLOYEDE; AGUNBIÁDE, 2018).

As lipases gástrica e pancreática são enzimas que digerem lipídios da dieta, como os triacilgliceróis. No estômago, a lipase gástrica gera diacilgliceróis e ácidos graxos, enquanto, no intestino delgado, a lipase pancreática produz monoacilglicerol e ácidos graxos para serem absorvidos pelos enterócitos. Após a absorção, os ácidos graxos penetram nas células onde são reesterificados em triacilgliceróis, armazenando-se, principalmente, nos tecidos adiposos (KO et al., 2020). No entanto, complicações decorrentes do metabolismo lipídico, como as dislipidemias, podem ocasionar doenças cardiovasculares (DCV) e cerebrovasculares (RHEE et al., 2019; ADNAN et al., 2018).

A absorção de nutrientes também está relacionada ao sobrepeso e à obesidade, elevando o risco do desenvolvimento de DM-2, dislipidemias, doenças cardiovasculares e outros distúrbios que caracterizam a síndrome metabólica (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019). Esses distúrbios envolvem o armazenamento lipídico no tecido adiposo que

ainda exerce função endócrina por secretar hormônios, enzimas, fatores de crescimento e citocinas, causando inflamação crônica e resistência à insulina (MCARDLE et al., 2013).

A estreita relação entre os diferentes distúrbios do metabolismo (obesidade, diabetes mellitus, dislipidemias e doenças cardiovasculares) pode apresentar como estratégia de tratamento a inibição de enzimas digestivas. A acarbose, a voglibose e o miglitol, por exemplo, são fármacos hipoglicemiantes orais que inibem a α -glicosidase e/ou α -amilase pancreática (JONGKEES et al., 2017), enquanto o orlistat é um inibidor seletivo das lipases (LIU et al., 2020; TEKULU; ARAYA; MENGESHA, 2019).

O objetivo deste capítulo foi realizar uma revisão atualizada sobre as funções fisiológicas e os distúrbios fisiopatológicos associados direta ou indiretamente com as enzimas digestivas (α -amilase, α -glicosidase e lipase), destacando os fármacos usados no tratamento destes distúrbios.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

O propósito deste capítulo foi revisar as funções das enzimas digestivas nos contextos fisiológicos e fisiopatológicos. Para isto, a metodologia do estudo teve como base o uso de Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), como enzimas digestivas, lipase pancreática, α -amilase, α -glicosidase, síndrome metabólica, dislipidemias e diabetes. A Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs) via Biblioteca Virtual em Saúde, o portal Pubmed gerenciado pelo *US National Library of Medicine/National Institutes of Health* e o Portal Periódicos Capes foram as principais plataformas científicas usadas nesta pesquisa, que foi realizada entre agosto de 2019 e dezembro de 2020.

Os seguintes critérios de inclusão foram adotados para a escolha dos documentos científicos: identificações completas, idiomas em português, inglês e espanhol, as descrições dos estudos (pleno, curta comunicação, revisão, relato de casos, notas científicas, etc.), publicados em periódicos indexados e disponíveis em plataformas científicas, teses, dissertações e livros. Além disso, a confiabilidade e a fidelidade das fontes, assim como a veracidade documental foram analisadas. Os critérios de exclusão envolveram documentos não indexados e referências com identificação duvidosa. Cada referência foi apreciada quanto ao título da obra, autores, fundamentos, objetivos, metodologias, resultados e conclusões. Os conceitos foram definidos a partir de um consenso de uma ou mais obras (SOARES et al., 2018).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Funções da α -Amilase E α -Glicosidase

Os carboidratos abrangem um grupo diversificado de moléculas que podem ser classificadas em mono- e dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. Como um dos

principais carboidratos da alimentação humana, o amido proporciona a porcentagem mais elevada de energia da dieta, representando cerca de 60 a 70% do total de calorias ingeridas. Esse carboidrato é um polímero constituído por dois tipos de polissacarídeos de origem vegetal, a amilose e a amilopectina. A amilose é um polímero linear com aproximadamente 1.000 moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, enquanto a amilopectina possui cerca de 100.000 moléculas de glicose unidas predominantemente por ligações glicosídicas α -1,4 e também ligações α -1,6, resultando em uma estrutura ramificada (LAPIS et al., 2017) (Figura 1).

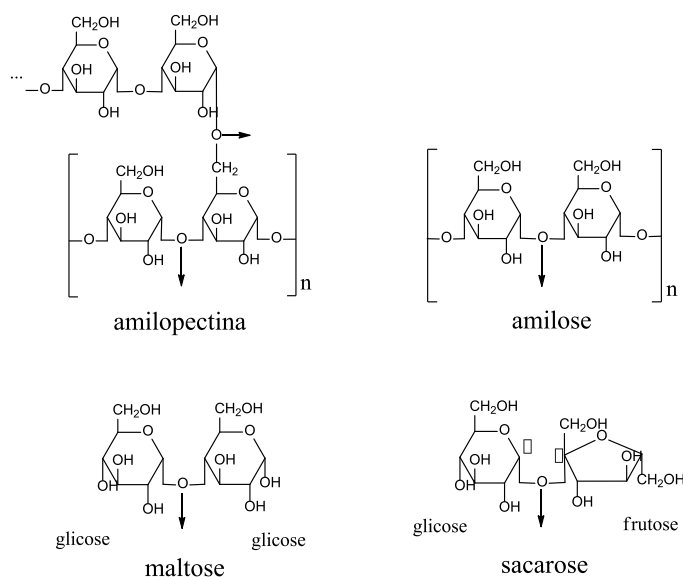


Figura 1 - Diagrama das estruturas das ligações glicosídicas de frações de carboidratos polissacarídeos e dissacarídeos hidrolisados pela α -amilase e α -glicosidase.

As enzimas α -amilase salivar e pancreática (α -1,4-glicano-4-glicano-hidrolases) pertencem à família 13 das glicosídeo-hidrolases (LO PIPARO et al., 2008). Como endo-hidrolases, clivam as ligações glicosídicas α -1,4 internas do amido (GOODMAN, 2010), gerando dextrinas lineares e ramificadas. Nos seres humanos, são codificadas por cinco genes no cromossomo 1, os genes AMY1A, AMY1B e AMY1C (α -amilase salivar) e AMY2A e AMY2B (α -amilase pancreática). Essas isoenzimas são constituídas por 496 aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica com alta homologia em suas estruturas, 97% de similaridade na sequência de aminoácidos e 92% nos domínios catalíticos (LO PIPARO et al., 2008).

As α -glicosidases (α -D-glicosídeo glicohidrolase) pertencem ao subgrupo 1 da família 31 das glicosídeo-hidrolases que catalisam a hidrólise das extremidades não redutoras das

dextrinas em glicose. Nos mamíferos, essas enzimas formam um complexo (sacarase-isomaltase e maltase-glicoamilase) na membrana do epitélio do intestino delgado (SIM et al., 2008). A maltase hidrolisa as ligações α -1,4 entre as moléculas de glicose da maltose ou das extremidades do polissacarídeo. Já a sacarase-isomaltase é um complexo formado pela isomaltase (dextrinase), responsável pela hidrólise das ligações α -1,6 das dextrinas e α -1,4 da maltose e maltotriose, associada à sacarase, que hidrolisa as ligações α -1,2 da sacarose (glicose e frutose) (GOODMAN, 2010). Essas enzimas têm sua composição e estrutura similares, apresentando cerca de 60% de homologia (SIM et al., 2008).

O amido inicia sua digestão pela ação da α -amilase salivar que hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 internas, formando oligômeros curtos. No intestino, esses oligômeros sofrem ação da α -amilase pancreática que cliva em malto-oligossacarídeos lineares (maltose e maltotriose) e dextrinas. Então, a sacarase-isomaltase e a maltase-glicoamilase, enzimas α -glicosidases da membrana apical dos enterócitos, hidrolisam os malto-oligossacarídeos em glicose (NICHOLS et al., 2003), que será absorvida para o interior do enterócito através do cotransportador sódio-glicose (SGLT1), seguida para a circulação pelo transportador de glicose 2 (GLUT2) acarretando em hiperglicemia pós-prandial (KELLETT; BROT-LAROCHE, 2005) (Figura 2).

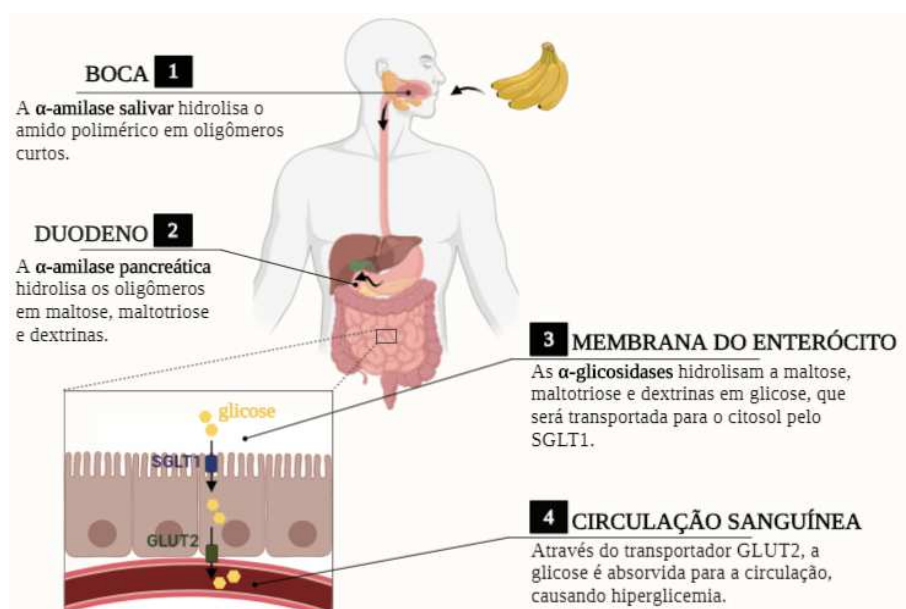


Figura 2 - Representação esquemática dos processos de digestão do amido e absorção de glicose.

3.2 Funções das lipases

O triacilglicerol (TAG) é a principal gordura ingerida através da alimentação e armazenada no organismo. A molécula do triacilglicerol é constituída por três ácidos graxos, geralmente distintos, esterificados aos grupos hidroxila da molécula de glicerol (BELMONTE; AOKI, 1983) (Figura 3).

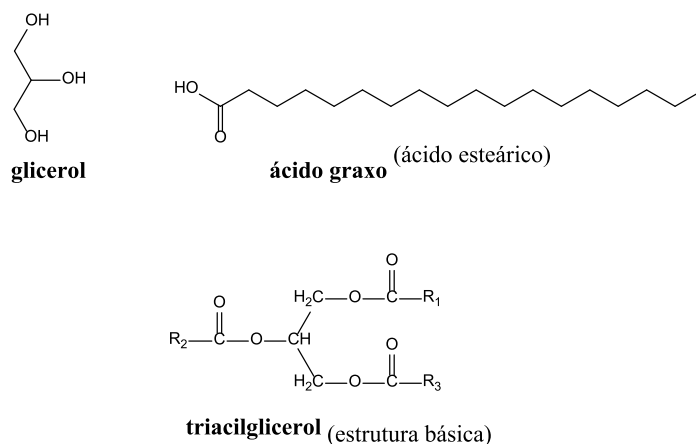


Figura 3 - Diagrama das estruturas químicas do glicerol, ácido graxo e triacilglicerol.

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases) (BOUCHAËLA et al., 2015) são uma família de enzimas que catalisam a hidrólise das ligações éster dos triacilglicerídios, fosfolipídios e ésteres de colesterol (WONG; SCHOTZ, 2002), compreendendo a lipase gástrica, lipase pancreática, lipase pancreática relacionada à proteína 1, lipase pancreática relacionada à proteína 2, lipase lipoproteica, lipase hepática, lipase endotelial e fosfatidilserina fosfolipase A1 (JIN et al., 2002). A lipase gástrica (lipase ácida) age em pH ideal de 4,0, sendo mais eficaz na hidrólise de triacilgliceróis compostos por ácidos graxos de cadeias médias. Já a lipase pancreática é a enzima mais importante do processo de digestão dos lipídios no TGI (KO et al., 2020).

A digestão do triacilglicerol (TAG) inicia-se no estômago pela ação da lipase gástrica, gerando diacilglicerol e ácido graxo na forma de uma emulsão. Ao atingir o intestino delgado, ocorre mais emulsificação pelos ácidos biliares, facilitando a ação da lipase pancreática. Então, a lipase pancreática hidrolisa os TAGs em monoacilglicerol e ácidos graxos, que são absorvidos pelos enterócitos por difusão passiva ou transportador (KO et al., 2020). No sangue, os ácidos graxos de cadeia curta e média (até 12 átomos de carbono) são transportados pela albumina, enquanto os de cadeia longa (acima de 12 átomos de carbono) são convertidos a TAG para serem carreados por lipoproteínas (SOBCZAK; BLINDAUER; STEWART, 2019).

Cabe destacar que, dentro dos enterócitos, os monoacilgliceróis e ácidos graxos de cadeia longa são transportados para o retículo endoplasmático, onde serão resintetizados em TAG através da via dos monoacilgliceróis. Neste processo, as monoacilglicerol aciltransferases catalisam a formação de diacilgliceróis a partir da esterificação de monoacilgliceróis com acil-CoA. Então, sob ação das enzimas diacilglicerol aciltransferases, as moléculas de diacilglicerol são esterificadas com moléculas de acil-CoA, gerando o TAG. Após essa ressíntese, os TAGs podem ser inseridos como lipoproteínas, principalmente os quilomícrons, ou armazenados no citosol. Os quilomícrons são secretados através da membrana basolateral dos enterócitos e irão para a circulação através do sistema linfático (KO et al., 2020).

A lipase lipoproteica (LPL), enzima presente em vários tipos celulares e nos capilares sanguíneos, promove a hidrólise dos triacilgliceróis, presentes nos quilomícrons e nas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), em ácidos graxos que podem ser oxidados para fornecer energia ou penetrar nas células e ser novamente reesterificados em triacilgliceróis para armazenamento (Figura 4). Dessa forma, os triacilgliceróis representam a principal forma de armazenamento de lipídios no organismo, sendo que, em mamíferos, são estocados intracelularmente no tecido adiposo (HE et al., 2018).

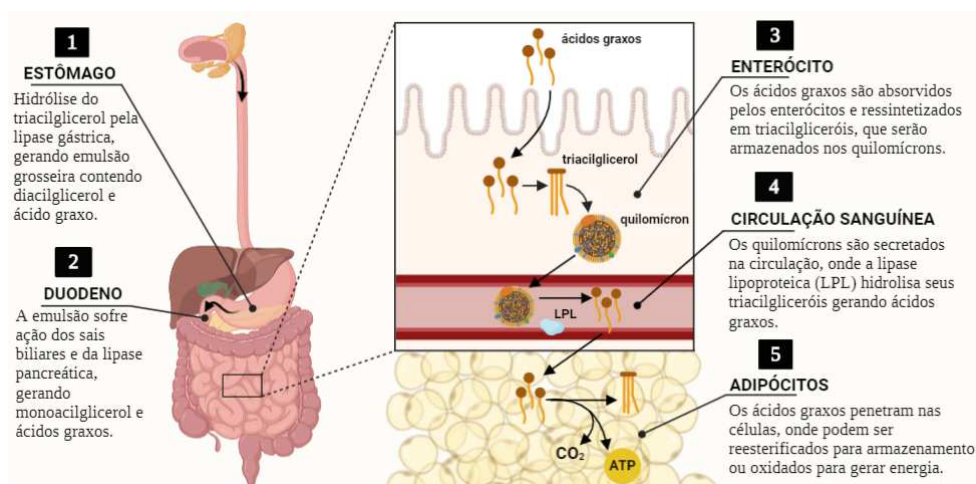


Figura 4 - Representação esquemática do processo de digestão do triacilglicerol.

3.3 Síndrome Metabólica

A síndrome metabólica (SM), também conhecida como “síndrome da resistência à insulina” e “síndrome X”, é considerada como um conjunto de distúrbios metabólicos que inclui obesidade central, resistência à insulina (diabetes mellitus tipo 2, glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída), dislipidemia aterogênica e hipertensão arterial,

estando relacionada com risco aumentado de desenvolvimento de doença cardiovascular aterosclerótica (ROCHLANI et al., 2017). A patogênese da SM é complexa e ainda não está totalmente elucidada, entretanto, sabe-se que os fatores genéticos e o estilo de vida baseado em consumo excessivo de calorias e ausência de atividade física contribuem para a adiposidade visceral, que é mais preponderante no mecanismo de resistência à insulina do que a gordura subcutânea (ROCHLANI et al., 2017).

Vários mecanismos são propostos para a patogênese da SM, mas acredita-se que a relação existente entre a resistência à insulina e a circulação de ácidos graxos livres desempenhe um papel fundamental. Isso porque a resistência à insulina aumenta o processo de lipólise e, conseqüentemente, aumenta a circulação de ácidos graxos livres, que estão relacionados à elevação de triglicerídeos e VLDL pelo fígado (MCCRACKEN; MONAGHAN; SREENIVASAN, 2018). Além disso, o estresse oxidativo e a inflamação crônica de baixo grau também são considerados mecanismos potenciais, principalmente no processo aterosclerótico (ROCHLANI et al., 2017).

A terapia farmacológica da SM é baseada nas patologias associadas, já que não existe um tratamento único. Isso requer o uso prolongado de vários medicamentos, o que se torna um desafio para os pacientes e coloca em risco a adesão (ROCHLANI et al., 2017). Entre os medicamentos usados para reduzir a morbidade, a mortalidade cardiovascular e renal e prevenir o agravamento metabólico da SM, destacam-se os diuréticos, anti-hipertensivos, antidiabéticos orais (biguanidas, tiazolidinedionas ou glitazonas, inibidores da alfa-glicosidase e sulfonilureias), antilipídêmicos (estatinas, fibratos, ácido nicotínico e outros) e inibidor da lipase pancreática (orlistat).

3.4 Inflamação, Resistência À Insulina e Obesidade

O tecido adiposo ocorre em duas formas distintas, o tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue* [BAT]) e o tecido adiposo branco (*white adipose tissue* [WAT]). O BAT é responsável pela termogênese para o controle da temperatura corporal, enquanto o WAT possui a função de armazenamento lipídico na forma de triacilglicerídeos (MCARDLE et al., 2013). Além disso, o WAT é considerado um órgão endócrino, pois secreta na circulação sanguínea substâncias como hormônios, enzimas, fatores de crescimento, proteínas da matriz e citocinas (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019).

Citocinas secretadas pelo tecido adiposo são denominadas adipocitocinas ou adipocinas, e podem ser anti-inflamatórias, que são mediadoras de processos fisiológicos, ou pró-inflamatórias, que estimulam as vias inflamatórias. Adiponectina, fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), interleucinas (IL) IL-10, IL-4, IL-13, receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) e apelina são as adipocinas anti-inflamatórias, enquanto IL-6, IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), leptina, visfatina, resistina, angiotensina II e inibidor do ativador de plasminogênio 1 são pró-inflamatórias (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019). Dentre essas proteínas, IL-6, IL-1 β e TNF- α têm sido relacionadas ao

desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) (YANAI; YOSHIDA, 2019).

IL-6 é uma citocina secretada por células do sistema imunológico (monócitos, macrófagos e linfócitos), fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, algumas células tumorais e células do WAT. Sua produção é regulada por fatores, como IL-1, TNF- α , interferons, DNA e RNA de vírus e endotoxinas de bactérias (YAO et al., 2014), e sua ação aumenta a produção de proteínas de fase aguda (como a proteína C reativa), fibrinogênio (estado pró-trombótico), expressão de moléculas de adesão e ativação do sistema renina-angiotensina (ROCHLANI et al., 2017). IL-6 também promove a fosforilação da serina do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) e, portanto, traz impactos negativos à sinalização da insulina (MCARDLE et al., 2013).

IL-1 β é um mediador pró-inflamatório da resposta inflamatória sistêmica e seus níveis aumentados na circulação estão relacionados ao maior risco de desenvolvimento de DM-2 (HERNANDEZ-SANTANA et al., 2019; MCARDLE et al., 2013). Como citocina pró-inflamatória, o TNF- α , secretado por monócitos e macrófagos, estimula a liberação de IL-6 e IL-1 β , responde às infecções e lesões, apoptose e angiogênese (MCARDLE et al., 2013) e é citotóxico para células tumorais (BORST, 2004). Além disso, TNF- α induz a fosforilação e inativação dos receptores de insulina nos tecidos adiposo e muscular liso, estando associado com a resistência à insulina induzida pela obesidade, (ROCHLANI et al., 2017) e também estimula a lipólise, que aumenta os ácidos graxos livres circulantes (MCARDLE et al., 2013).

A obesidade é definida como uma expansão e disfunção dos tecidos adiposos ocasionadas sob condições positivas de energia, que estimulam os pré-adipócitos a se diferenciar e proliferar em adipócitos maduros, aumentando o número de células (hiperplasia) e o tamanho das células (hipertrofia), devido ao armazenamento lipídico em excesso. Como o tecido adiposo é um órgão endócrino capaz de secretar substâncias regulatórias, sua expansão gera um aumento na liberação das citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas estimulam respostas do sistema imunológico e promovem a infiltração de células como macrófagos ativos, causando um processo inflamatório crônico de baixo grau (LIU; WANG; LIN, 2019) (Figura 5). Além disso, os fatores pró-inflamatórios ativam várias serina-quinases, como I κ B quinase (IKK) e c-Jun N-terminal quinase (JNK), que promovem a fosforilação dos resíduos de serina na via de sinalização da insulina, inclusive a serina do IRS-1. Consequentemente, a sinalização normal da insulina é prejudicada promovendo estado de resistência, o que favorece o desenvolvimento de várias complicações, inclusive o DM-2 (MCARDLE et al., 2013).

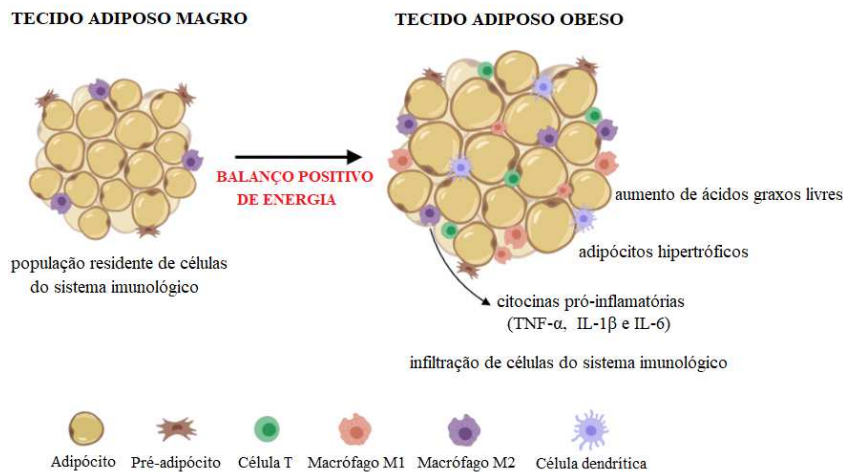


Figura 5 - Expansão do tecido adiposo e infiltração de células do sistema imunológico.

O tratamento da obesidade é baseado principalmente na combinação de mudança de hábitos alimentares e atividade física. Entretanto, os indivíduos que não respondem a essas modificações podem necessitar de terapia farmacológica (ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA et al., 2019). Atualmente, estão disponíveis os seguintes fármacos e associações: inibidores das lipases gastrointestinais (orlistat e cetilistat) e supressores do apetite, como sibutramina (inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina), liraglutida (agonista do receptor GLP-1 [*glucagon-like peptide-1*]), fentermina (inibidor do transportador de noradrenalina), fentermina/topiramato (inibidor do transportador de noradrenalina e agonista receptores GABA, respectivamente), lorcaserina (agonista de receptor 5-HT), naltrexona/bupropiona (antagonista de receptor opióide e inibidor da recaptção de noradrenalina e dopamina, respectivamente), tesofensina (inibidor da recaptção de noradrenalina, dopamina e serotonina) e exenatida (agonista GLP-1) (NARAYANASWAMI; DWOSKIN, 2017).

3.5 Resistência à insulina e dislipidemias

Os ácidos graxos (AG) que são estocados intracelularmente como TAGs podem ser mobilizados pelo processo de lipólise através de sua hidrólise (SOBCZAK; BLINDAUER; STEWART, 2019). A insulina, por sua vez, além de estimular a captação de glicose pelas células e inibir a gliconeogênese, também é capaz de inibir a lipólise. Desse modo, a resistência à insulina prejudica a inibição da lipólise e gera um aumento de AG circulantes (ROCHLANI et al., 2017). O excesso de AG nas células e tecidos ocasiona a lipotoxicidade e sobrecarga e impossibilita os processos de conversão para TAG ou β -oxidação, formando lipídios tóxicos. Conseqüentemente, há disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático e geração de espécies reativas de oxigênio, que resultam em apoptose (principalmente células β -pancreáticas, musculares esqueléticas e adipócitos), inflamação

e resistência à insulina (SOBCZAK; BLINDAUER; STEWART, 2019).

No fígado, os AG circulantes são substratos para produção de TAGs (HUANG, 2009). Em condições normais, grande parte da apolipoproteína B (apoB) sintetizada é degradada pelo retículo endoplasmático dos hepatócitos. Quando os níveis de TAG estão aumentados no fígado, há uma supressão da degradação de apoB (HIRANO, 2018), principal apolipoproteína presente nas partículas de VLDL, causando aumento na produção de VLDL. Além disso, a insulina também está associada à degradação de apoB, através de uma via dependente da PI3-K e, portanto, a resistência à insulina está diretamente relacionada ao aumento na produção de VLDL (HUANG, 2009).

A LPL, presente na superfície do endotélio vascular, é responsável pela hidrólise de TAGs transportados pelos quilomícrons e VLDL, desempenhando um papel importante na remoção dessas partículas (HIRANO, 2018). A insulina estimula a ação da LPL e o estado de resistência reduz a atividade da enzima, resultando em níveis elevados de quilomícrons e VLDL. Dessa forma, indivíduos com DM-2 frequentemente também apresentam níveis de quilomícrons elevados. Portanto, a hipertrigliceridemia é uma consequência tanto do aumento da produção de TAGs quanto da redução do seu catabolismo, ambos promovidos pela resistência à insulina (HUANG, 2009).

O VLDL é metabolizado em partículas de LDL denominadas “pequenas e densas” (SdLDL, *small dense LDL*), além das lipoproteínas remanescentes (HUANG, 2009). Isso ocorre porque há uma transferência de TAGs do VLDL para o LDL, através da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), sendo que o LDL rico em TAGs sofre lipólise pela lipase hepática tornando-se pobre em colesterol e formando o SdLDL. Em comparação às partículas de LDL grandes, o SdLDL está mais fortemente associado ao desenvolvimento de aterosclerose, pois penetra mais facilmente na parede das artérias, possui meia-vida plasmática mais longa, menor afinidade com o receptor de LDL e fraca resistência ao estresse oxidativo (HIRANO, 2018).

De forma semelhante, as partículas de HDL também recebem TAGs transferidos do VLDL pela CETP, em troca dos ésteres de colesterol. Portanto, são formadas partículas de HDL ricas em TAGs, o que as tornam substratos melhores para a lipase hepática, sendo rapidamente eliminadas da circulação (HUANG, 2009). Com menos partículas de HDL circulantes, há uma redução no transporte reverso de colesterol dos tecidos, responsável por prevenir o desenvolvimento de DCV (HIRANO, 2018).

O tratamento das dislipidemias é uma abordagem crucial para a prevenção de DCV, e engloba mudanças no estilo de vida e terapia farmacológica (THOMPSON, 2004). Atualmente, as principais classes de fármacos e suas associações são: estatinas (inibidores da 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A [HMG-CoA] redutase), limitam a síntese de colesterol endógeno; fibratos ou derivados do ácido fibríco, estimulam os receptores gama ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR- γ), atuando no metabolismo lipídico e aumentando a atividade da LPL (KHERA; MCGUIRE, 2005); ezetimiba (inibidor da

proteína NPCL1), inibem a absorção intestinal de colesterol; inibidores da PCSK9, proteína envolvida na homeostase do colesterol pela degradação de receptores LDL; estatina/ezetimiba; estatina/fibrato (FILIPPATOS et al., 2017); ácido nicotínico ou niacina, inibe a lipólise (JULIUS, 2015).

3.6 Diabetes mellitus tipo 2

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico caracterizado por concentrações elevadas de glicose no sangue (hiperglicemia), devido à insuficiência na produção de insulina pelas células β -pancreáticas e/ou deficiência na sua ação (resistência à insulina), podendo ser classificado em: diabetes mellitus tipo 1, ou insulino-dependente, quando há destruição das células β -pancreáticas pelo sistema imunológico; diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), ou não insulino-dependente, quando há deficiência na secreção ou resistência à insulina; diabetes gestacional, quando a intolerância à glicose é detectada pela primeira vez no período gestacional (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016); e LADA (diabetes auto-imune latente do adulto), quando o DM tipo 1 se inicia na fase adulta (SCHWARTZ et al., 2017). Por fim, o diabetes *insipidus* é uma doença rara causada pela diminuição na secreção ou ação da vasopressina que leva à excreção de grandes volumes de urina (REFARDT; WINZELER; CHRIST-CRAIN, 2020).

DM-2 é caracterizado por hiperglicemia crônica como consequência da resistência periférica à insulina, disfunção das células β -pancreáticas ou ambas as situações (MEZA et al., 2019). Os tecidos que apresentam resistência à insulina de forma mais proeminente são o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (FORBES; COOPER, 2013). Como consequência, a captação e utilização de glicose pelas células são afetadas, resultando em aumento da lipólise e proteólise, aumento da gliconeogênese hepática, liberação de hormônios catabólicos (como glucagon, cortisol e catecolaminas), aumento na produção de superóxido e estresse oxidativo, aumento de disfunção endotelial e mitocondrial, aumento na acidose intracelular no cérebro e danos neuronais (RASOULI et al., 2020).

Dessa forma, várias complicações estão associadas ao DM-2. As complicações metabólicas agudas incluem a cetoacidose diabética, devido à hiperglicemia grave, e coma, como consequência da hipoglicemia. Já as complicações de longo prazo estão relacionadas com danos aos vasos sanguíneos desencadeados pela hiperglicemia crônica, sendo macrovasculares (hipertensão, doença coronariana, ataque cardíaco, derrame, doença vascular cerebral e doença vascular periférica), quando há danos nas artérias, e microvasculares (nefropatia, retinopatia e neuropatia), quando pequenos vasos sanguíneos são acometidos (FORBES; COOPER, 2013).

O manejo terapêutico adequado do DM-2 é importante na prevenção dessas complicações (RASOULI et al., 2020). O tratamento farmacológico compreende as seguintes classes de medicamentos: biguanidas (metformina), reduzem a produção hepática de glicose e a absorção de glicose pelo intestino e estimula captação de glicose pelos tecidos;

sulfoniuréias (glibenclamida, gliclazida, glimepirida, glipizida e clorpropamida), agem diretamente nas células β -pancreáticas bloqueando os canais de potássio dependente de ATP e estimulando a secreção de insulina; tiazolidinedionas (pioglitazona, rosiglitazona e troglitazona), são agonistas dos receptores PPAR- γ e sensibilizam a ação da insulina nos hepatócitos, adipócitos e músculo esquelético; agonistas do receptor GLP-1 (liraglutida, exenatida e lixisenatida), hormônio que estimula a secreção de insulina e inibe a secreção de glucagon; inibidores da DDP-4 (dipeptidil-peptidase 4) (vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina e linagliptina), enzima que metaboliza o GLP-1; inibidores SGLT-2 (co-transportador sódio-glicose 2), impedem a reabsorção de glicose pelo SGLT-2 nos rins; inibidores da α -glicosidase (acarbose, voglibose e miglitol), enzima responsável por hidrolisar oligo e dissacarídeos em glicose, promovendo a hiperglicemia pós-prandial (WU et al., 2014).

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente capítulo descreveu as funções fisiológicas das enzimas digestivas (α -amilase, α -glicosidase e lipase) e os distúrbios direta ou indiretamente associados, enfocando os principais fármacos usados no tratamento dessas complicações. Essas enzimas estão envolvidas nos processos digestivos através de reações que catalisam a quebra de carboidratos e gorduras, transformando em estruturas mais simples a serem captadas pelos tecidos.

Entre os distúrbios associados com as enzimas digestivas, a síndrome metabólica consiste de um conjunto de complicações orgânicas que inclui obesidade central, resistência à insulina, dislipidemia aterogênica e hipertensão arterial. Com distúrbio ligado ao metabolismo, a obesidade constitui uma disfunção do tecido adiposo causada, normalmente, por um consumo excessivo de calorias alimentares. Consequentemente, ocorre a secreção de substâncias regulatórias que liberam citocinas pró-inflamatórias que desencadeiam processo inflamatório crônico, levando ao surgimento de DM-2 e doenças cardiovasculares. Por sua vez, a dislipidemia, geralmente, está relacionada à elevação de colesterol e triglicérides no plasma e/ou a diminuição dos níveis de HDL que contribuem para aterosclerose. No entanto, o aumento de AG circulantes pode resultar em apoptose (principalmente de células β -pancreáticas, musculares esqueléticas e adipócitos), inflamação e resistência à insulina. Neste contexto, esses distúrbios envolvem o aparecimento da DM-2 que se caracteriza por concentrações elevadas de glicose no sangue (hiperglicemia) devido à insuficiência na secreção de insulina pelas células β -pancreáticas e/ou resistência à insulina.

Quando associados, os distúrbios metabólicos causam grandes consequências aos seres humanos, necessitando, entre outros, de tratamento farmacológico. Entre as classes de fármacos usadas no tratamento das complicações metabólicas, destacam-se

os inibidores da α -glicosidase (acarbose, voglibose e miglitol) e lipase (orlistat e cetilistat).

REFERÊNCIAS

ADNAN, T.; AHMAD, M.; CHAUDHRI, W. M.; ZIL-E-ALI, A.; GONDAL, M. U. M.; ALI, S. M. H.; NUSRAT, M.; WASIQ, S. Pathophysiology of dyslipidemia and its management by PCSK9 inhibitors: A literature review. **Internal Medicine and Medical Investigation Journal**, v. 3, n. 3, p. 92-99, 2018.

AFOLABI, O. B.; OLOYEDE, O. I.; AGUNBIADE, S. O. Inhibitory potentials of phenolic-rich extracts from *Bridelia ferruginea* on two key carbohydrate-metabolizing enzymes and Fe²⁺-induced pancreatic oxidative stress. **Journal of Integrative Medicine**, v. 16, n. 3, p. 192-198, 2018.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.

BELMONTE, M. A.; AOKI, M. S. Triacilglicerol intramuscular: um importante substrato energético para o exercício de endurance. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, n. 2, p. 135-140, 2005.

BORST, S. E. The role of TNF- α in insulin resistance. **Endocrine**, v. 23, n. 2-3, p. 177-182, 2004.

BOUCHAËLA, E.; BOUALI, M.; ALI, Y. B.; MILED, N.; GARGOURI, Y.; FENDRI, A. Biochemical characterization and molecular modeling of pancreatic lipase from a cartilaginous fish, the common stingray (*Dasyatis pastinaca*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 1, p. 151-169, 2015.

FILIPPATOS, T. D.; FLORENTIN, M.; GEORGOULA, M.; ELISAF, M. S. Pharmacological management of diabetic dyslipidemia. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 187-200, 2017.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137-188, 2013.

GOODMAN, B. E. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. **Advances in Physiology Education**, v. 34, n. 2, p. 44-53, 2010.

HARTENSTEIN, V.; MARTINEZ, P. Structure, development and evolution of the digestive system. **Cell and Tissue Research**, v. 377, p. 289-292, 2019.

HE, P-P.; JIANG, T.; OUYANG, X-P.; LIANG, Y-Q.; ZOU, J-Q.; WANG, Y.; SHEN, Q-Q.; LIAO, L.; ZHENG, X-L. Lipoprotein lipase: Biosynthesis, regulatory factors, and its role in atherosclerosis and other diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 480, p. 126-137, 2018.

HIRANO, T. Pathophysiology of diabetic dyslipidemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 25, n. 9, p. 771-782, 2018.

HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Disease models & mechanisms**, v. 2, n. 5-6, p. 231-237, 2009.

JANIAK, M. C. Digestive enzymes of human and nonhuman primates. **Evolutionary Anthropology**, v. 25, n. 5, p. 253-266, 2016.

JIN, W.; BROEDL, U. C.; MONAJEMI, H.; GLICK, J. M.; RADER, D. J. Lipase H, a new member of the triglyceride lipase family synthesized by the intestine. **Genomics**, v. 80, n. 3, p. 268-273, 2002.

JONGKEES, S. A. K.; CANER, S.; TYSOE, C.; BRAYER, G. D.; WITHERS, S. G.; SUGA, H. Rapid discovery of potent and selective glycosidase-inhibiting de novo peptides. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 3, p. 381-390, 2017.

JULIUS, U. Niacin as antidyslipidemic drug. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 93, n. 12, p. 1043-1054, 2015.

KELLETT, G. L.; BROT-LAROCHE, E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 3056-3062, 2005.

KHERA, A.; MCGUIRE, D. K. Management of diabetic dyslipidemia. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 5, n. 2, p. 83-91, 2005.

KO, C. W.; QU, J.; BLACK, D. D.; TSO, P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, v. 17, n. 3, p. 169-183, 2020.

LAPIS, T. J.; PENNER, M. H.; BALTO, A. S.; LIM, J. Oral digestion and perception of starch: effects of cooking, tasting time, and salivary α -amylase activity. **Chemical Senses**, v. 42, n. 8, p. 635-645, 2017.

LIU, T-T.; LIU, X-T.; CHEN, Q-X.; SHI, Y. Lipase inhibitors for obesity: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 128, p. 1-9, 2020.

LO PIPARO, E.; SCHEIB, H.; FREI, N.; WILLIAMSON, G.; GRIGOROV, M.; CHOU, C. J. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3555-3561, 2008.

MCARDLE, M. A.; FINUCANE, O. M.; CONNAUGHTON, R. M.; MCMORROW, A. M.; ROCHE, H. M. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, article 52, 2013.

MCCRACKEN, E.; MONAGHAN, M.; SREENIVASAN, S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. **Clinics in dermatology**, v. 36, n. 1, p. 14-20, 2018.

MEZA, C. A.; LA FAVOR, J. D.; KIM, D-H.; HICKNER, R. C. Endothelial dysfunction: is there a hyperglycemia-induced imbalance of NOX and NOS?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3775, 2019.

NARAYANASWAMI, V.; DWOSKIN, L. P. Obesity: Current and potential pharmacotherapeutics and targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 170, p. 116-147, 2017.

NICHOLS, B. L.; AVERY, S.; SEN, P.; SWALLOW, D. M.; HAHN, D.; STERCHI, E. The maltase-glucoamylase gene: common ancestry to sucrase-isomaltase with complementary starch digestion activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 3, p. 1432-1437, 2003.

RASOULI, H.; YARANI, R.; POCIOT, F.; POPOVIĆ-DJORDJEVIĆ, J. Anti-diabetic potential of plant alkaloids: Revisiting current findings and future perspectives. **Pharmacological Research**, 104723, 2020.

REFARDT, J.; WINZELER, B.; CHRIST-CRAIN, M. Diabetes insipidus: An update. **Endocrinology and Metabolism Clinics**, v. 49, n. 3, p. 517-531, 2020.

RHEE, E.-J.; KIM, H. C.; KIM, J. H.; LEE, E. Y.; KIM, B. J.; KIM, E. M.; SONG, Y. J.; LIM, J. H.; KIM, H. J.; CHOI, S.; MOON, M. K.; NA, J. O.; PARK, K.-Y.; OH, M. S.; HAN, S. Y.; NOH, J.; YI, K. H.; LEE S.-H.; HONG, S.-C.; JEONG, I.-K. 2018 Guidelines for the management of dyslipidemia. **Korean Journal of Internal Medicine**, v. 34, n. 4, p. 723-771, 2019.

ROCHLANI, Y.; POTHINENI, N. V.; KOVELAMUDI, S.; MEHTA, J. L. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. **Therapeutic advances in cardiovascular disease**, v. 11, n. 8, p. 215-225, 2017.

SCHWARTZ, S. S.; EPSTEIN, S.; CORKEY, B. E.; GRANT, S. F.; GAVIN III, J. R.; AGUILAR, R. B.; HERMAN, M. E. A unified pathophysiological construct of diabetes and its complications. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 9, p. 645-655, 2017.

SIM et al., L.; QUEZADA-CALVILLO, R.; STERCHI, E. E.; NICHOLS, B. L.; ROSE, D. R. Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 375, n. 3, p. 782-792, 2008.

SOARES, S. V.; PICOLLI, I. R. A.; CASAGRANDE, J. L. Pesquisa bibliográfica, pesquisa bibliométrica, artigo de revisão e ensaio teórico em administração e contabilidade. **Administração: Ensino e Pesquisa**, v. 19, n. 2, p. 308-339, 2018.

SOBCZAK, A. I. S.; BLINDAUER, C. A.; STEWART, A. J. Changes in plasma free fatty acids associated with type-2 diabetes. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2022, 2019.

TEKULU, G. H.; ARAYA, E. M.; MENGESHA, H. G. In vitro α -amylase inhibitory effect of TLC isolates of *Aloe megalacantha* baker and *Aloe monticola* Reynolds. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 206, 2019.

THOMPSON, G. R. Management of dyslipidaemia. **Heart**, v. 90, n. 8, p. 949-955, 2004.

WONG, H.; SCHOTZ, M. C. The lipase gene family. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 7, p. 993-999, 2002.

WU, Y.; DING, Y.; TANAKA, Y.; ZHANG, W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 11, p. 1185-1200, 2014.

YANAI, H.; YOSHIDA, H. Beneficial effects of adiponectin on glucose and lipid metabolism and atherosclerotic progression: mechanisms and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1190, 2019.

YAO, X.; HUANG, J.; ZHONG, H.; SHEN, N.; FAGGIONI, R.; FUNG, M.; YAO, Y. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. **Pharmacology & therapeutics**, v. 141, n. 2, p. 125-139, 2014.

ZIELINSKA-BLIZNIEWSKA, H.; SITAREK, P.; MERECZ-SADOWSKA, A.; MALINOWSKA, K.; ZAJDEL, K.; JABLONSKA, M.; SLIWINSKI, T.; ZAJDEL, R. Plant extracts and reactive oxygen species as two counteracting agents with anti- and pro-obesity properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 1-30, 2019.