

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALISSON SAMUEL PORTES CALDEIRA

FITOQUÍMICA E POTENCIAL ANTIDIABÉTICO DAS CASCAS DO
FRUTO DO PEQUI (*Caryocar brasiliense*)

Belo Horizonte - MG
2021

ALISSON SAMUEL PORTES CALDEIRA

**FITOQUÍMICA E POTENCIAL ANTIDIABÉTICO DAS CASCAS DO
FRUTO DO PEQUI (*Caryocar brasiliense*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito necessário à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga, FAFAR, UFMG.

Coorientadores: Prof. Dr. Steyner de França Côrtes, ICB, UFMG.

Prof.^a Dr.^a Priscilla Rodrigues Valadares Campana, FAFAR, UFMG

Colaborador: Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua, FAFAR, UFMG.

**Belo Horizonte - MG
2021**

C148f Caldeira, Alisson Samuel Portes.
Fitoquímica e potencial antidiabético das cascas do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense*) / Alisson Samuel Portes Caldeira. – 2021.
187 f. : il.

Orientador: Fernão Castro Braga.

Coorientadores: Steyner de França Côrtes.

Priscilla Rodrigues Valadares Campana.

Colaborador: Rodrigo Maia de Pádua.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

1. Caryocar – Teses. 2. Pequi – Teses. 3. Produtos naturais – Teses. 4. Extratos vegetais/uso terapêutico – Teses. 5. Diabetes mellitus tipo 2 – Teses. 6. Hipoglicemiantes/uso terapêutico – Teses. I. Braga, Fernão Castro. II. Côrtes, Steyner de França. III. Campana, Priscilla Rodrigues Valadares. IV. Pádua, Rodrigo Maia de. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. VI. Título.

CDD: 615.537



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

"FITOQUÍMICA E POTENCIAL ANTIDIABÉTICO DAS CASCAS DO FRUTO DO PEQUI (CARYOCAR BRASILIENSE)"

ALISSON SAMUEL PORTES CALDEIRA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Profa. Dra. Denise Coutinho Endringer
Universidade Vila Velha - UVV

Dra. Vera Lúcia de Almeida
Fundação Ezequiel Dias - FUNED

Profa. Dra. Adaliene Versiani Ferreira Matos
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Isabela da Costa César
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Ricardo José Alves
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Fernão Castro Braga - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Steyner de França Côrtes - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 11 de outubro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Adaliene Versiani Matos Ferreira, Professora do Magistério Superior**, em 13/10/2021, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Steyner de Franca Cortes, Professor do Magistério Superior**, em 13/10/2021, às 10:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabela da Costa Cesar, Membro**, em 13/10/2021, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Jose Alves, Professor do Magistério Superior**, em 13/10/2021, às 11:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Rodrigues Valadares Campana, Professora do Magistério Superior**, em 13/10/2021, às 13:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernão Castro Braga, Professor do Magistério Superior**, em 13/10/2021, às 15:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vera Lucia de Almeida, Usuário Externo**, em 14/10/2021, às 09:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denise Coutinho Endringer, Usuário Externo**, em 17/10/2021, às 09:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1016032 e o código CRC 887F2E86.

Dedico este trabalho a minha família, por tornar o caminho mais simples e os obstáculos mais fáceis de superar e por estarem sempre ao meu lado, a minha irmã Grazielle, pelos conselhos e pela atenção, a minha afilhada Isabelle pela doçura, sorriso e momentos alegres, ao meu pai, minha inspiração, por acreditar em mim e me apoiar nos momentos difíceis e a minha mãe, meu exemplo de amor, dedicação e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao PPGCF, pela oportunidade de qualificação acadêmica, e pelo constante incentivo e investimento na minha formação.

Ao professor Fernão Castro Braga, pela orientação, paciência e incentivo durante o desenvolvimento de todo o projeto. E também pela sua ética e competência profissional, exemplo a ser seguido. Obrigado também pelo suporte e valiosos direcionamentos que me permitiram consolidar e concluir este trabalho.

À professora Priscilla Rodrigues Valadares Campana, pela coorientação ao longo do desenvolvimento do projeto, pelos ensinamentos e suporte na operação do HPLC preparativo, pelo conhecimento compartilhado, atenção, dedicação e paciência.

Ao professor Steyner de França Côrtes do ICB, pela efetiva colaboração prestada ao trabalho.

Ao colega e aluno de doutorado do ICB Ulrich Carlos Mbiakop pela paciência, suporte e colaboração durante realização dos ensaios antidiabéticos com camundongos.

Ao professor Ricardo José Alves pela consolidação da minha formação para interpretação dos espectros de UV, LC-MS e RMN.

À funcionária Juliana Divina Almeida Raposo, pela paciência, dedicação, colaboração prestada na execução de análises e treinamento para operação do equipamento de CLUE-ESI-MS/MS.

Ao professor José Dias de Souza Filho, pela colaboração na execução das análises de RMN.

Ao professor Rodrigo Maia de Pádua, pela contribuição ao meu trabalho, pelo suporte na interpretação dos espectros de UPLC-ESI-MS/MS e pela paciência durante os treinamentos no Software para processamento dos dados e geração dos espectros de RMN.

Aos professores José Eduardo Gonçalves e Izabella Thais da Silva por contribuírem na minha formação e capacitação para trabalhar com cultivo celular e demais ensaios biológicos *in-vitro*.

Aos funcionários da FAFAR Batista pela ajuda na operação do moinho para obtenção das drogas vegetais e Adelaide pelo auxílio com os camundongos para os experimentos *in vivo*.

À funcionária e colega Raquel Geralda Isidório, pelo apoio nas atividades do Laboratório de Fitoquímica, conhecimentos divididos e atenção dispensada ao longo desse trabalho.

Aos amigos Marina Rocha, Wellerson e Marina Leite pelas experiências trocadas ao longo do doutorado, pelo companheirismo, happy hours e risadas. Vocês fizeram essa caminhada se tornar mais leve e prazerosa.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica, Maria Fernanda, Diego, José Hugo e Douglas, agradeço pela convivência e troca de saberes ao longo da caminhada.

Aos pesquisadores da Fiocruz Minas Carlos Leomar Zani, Tânia M. A. Alves e Zélia Profeta pela liberação para cursar o Doutorado junto ao PPGCF da Faculdade de Farmácia da UFMG.

À pesquisadora e colega Betânia Barros Cota pelo incentivo e auxílio na elaboração do projeto apresentado durante o Processo Seletivo ao Doutorado do PPGCF.

À colega Daniela Nabak Bueno Maia, pela força e contribuição prestada nos ensaios biológicos com células.

À colega Mariana Costa Ferreira pelo apoio nos momentos que estive ausente do laboratório de química de produtos naturais da Fiocruz Minas.

Aos meus amados pais José Leonardo e Edméia Maria, a minha irmã Grazielle Portes e a minha afilhada e sobrinha Izabelle Portes por todo amor e atenção que transmitem e me fazem sentir.

À FINEP pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

A Deus e aos espíritos de Luz pelo grande amparo e pela força na superação dos obstáculos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Mudanças nos hábitos alimentares e estilo de vida têm resultado no aumento da incidência de várias doenças metabólicas, incluindo o diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Novos agentes terapêuticos são demandados para o controle do DMT2 e produtos naturais de plantas se apresentam como uma alternativa, incluindo espécies usadas tradicionalmente como anti-inflamatório, caso de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae), denominada popularmente de pequi, e da espécie exótica ornamental *Leea rubra* Blume ex Spreng. (Vitaceae). O estudo objetivou avaliar a atividade de extratos de *C. brasiliense* e *L. rubra* em modelos experimentais relacionados ao DMT2, visando identificar substâncias e/ou frações quimicamente caracterizadas com potencial terapêutico. Foram preparados extratos etanólicos de folhas (EEFCB) e de cascas do fruto (EECCB) de *C. brasiliense*, e de partes aéreas de *L. rubra* (EEALR). Os extratos foram fracionados por partição entre solventes imiscíveis e as frações obtidas, bem como os extratos de origem (10; 30 e 90 µg/mL), tiveram seu efeito avaliado sobre a liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e MCP-1 em células THP-1 previamente estimuladas por LPS, sendo as citocinas quantificadas por ELISA. A viabilidade celular das amostras foi superior a 90%, avaliada pelo método do MTT, indicando ausência de toxicidade para as células THP-1, com exceção das frações hexânica e diclorometânica de EEFCB e EECCB. EEALR não foi ativa frente a nenhuma das citocinas avaliadas, enquanto EEFCB inibiu a liberação de TNF- α , MCP-1 e IL-1 β de maneira concentração dependente com inibições máximas (IM) de $84,9 \pm 0,6\%$, $89,8 \pm 0,8\%$ e $72,2 \pm 4,4\%$, respectivamente. Por sua vez, EECCB inibiu a liberação de TNF- α , MCP-1 e IL-1 β com valores de IM de $28,5 \pm 5,6\%$, $42,3 \pm 9,0\%$ e $74,5 \pm 3,7\%$, respectivamente. A fração em acetato de etila (EtOAc) de EECCB inibiu a liberação de TNF- α em todas as concentrações testadas (IM de $59,9 \pm 2,3\%$), bem como a liberação de MCP-1 (IM de $85,7 \pm 2,7\%$) e de IL-1 β (IM de $71,9 \pm 4,9\%$). Na sequência, a potencial atividade antidiabética dos extratos e frações foi avaliada *in vitro* em ensaio de inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase. EECCB e EtOAc promoveram inibição concentração dependente de α -glicosidase (IM de $97,9 \pm 1,4\%$ e $97,0 \pm 0,7\%$, respectivamente) e induziram aproximadamente 30% de inibição de α -amilase. EECCB foi fracionado em coluna de Sephadex-LH20 visando obter frações enriquecidas em taninos, denominadas FR15C e FR16C. Ambas as frações inibiram a α -glicosidase, sendo que FR16C induziu um efeito inibitório mais potente que EECCB e FR15C, com o maior valor de pIC₅₀ ($5,3 \pm 0,1$). Na sequência, avaliou-se o efeito de EECCB, EtOAc, FR15C e FR16C no teste de tolerância ao amido em camundongos. FR16C reduziu a glicemia significativamente 60 min

após a ingestão de amido pelos animais, com nível glicêmico de 181 ± 10 mg/dL em comparação ao grupo controle de 238 ± 11 mg/dL. A composição química de EECCB, EtOAc e FR16C foi investigada por CLUE-ESI-MS/MS. Foram identificados, em EECCB, íons com relação massa/carga compatíveis com glicogalina, ácido gálico, corilagina, geraniina e ácido elágico. A fração EtOAc apresentou-se enriquecida nos constituintes identificados em EECCB, enquanto análises por CLUE-ESI-MS/MS revelaram um perfil menos complexo para FR16C, sendo corilagina e geraniina identificadas como picos majoritários. Os elagitaninos corilagina e geraniina foram isolados por CLAE preparativa e tiveram suas estruturas químicas caracterizadas inequivocamente por análises de RMN, empregando experimentos 1D (^1H e ^{13}C) e 2D (COSY, HMQC e HMBC). Em estudo crônico com modelo de DMT2 induzido por baixa dose de estreptozotocina com suplementação de nicotinamida (LD-STZ-NA), os grupos de camundongos tratados com EECCB ou EtOAc apresentaram redução significativa nos níveis de glicose de jejum entre a segunda e quarta semanas de tratamento, com efeitos hipoglicêmicos máximos observados no grupo tratado com EtOAc. Em conclusão, os resultados obtidos a partir dos ensaios *in vitro* e *in vivo* aqui relatados para EECCB e frações derivadas indicam que as cascas do pequi contêm elagitaninos com atividade hipoglicêmica, potencialmente úteis para o desenvolvimento futuro de um produto fitoterápico ou alimento funcional com propriedades antidiabéticas.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*; elagitaninos; corilagina; geraniina; atividade antidiabética; nutracêutico.

ABSTRACT

Changes in food habits and lifestyle increased several metabolic diseases, including type 2 diabetes mellitus (T2DM). New therapeutic agents have been demanded to control T2DM. Natural products from plants represent an alternative, including species traditionally used as anti-inflammatory agents like *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae), popularly named *pequi* tree, and the exotic ornamental species *Leea rubra* Blume ex Spreng. (Vitaceae). This study aimed to evaluate the activity of *C. brasiliense* and *L. rubra* extracts in experimental models related to T2DM, in order to identify compounds and/or chemically characterized fractions potentially useful for future therapeutic applications. The ethanolic extracts of leaves (EEFCB) and fruit peels (EECCB) of *C. brasiliense* were prepared, along with the ethanol extract of *L. rubra* aerial parts (EEALR). These extracts were fractionated by partition between immiscible solvents and the resulting fractions, along with the original extracts (10, 30 and 90 $\mu\text{g/mL}$), had their effect on the release of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and MCP-1 evaluated in LPS-stimulated THP-1 cells, being the cytokines quantified by ELISA. The cell viability of all samples was higher than 90%, tested by the MTT assay, indicating the absence of toxicity for THP-1 cells, except for the hexane and dichloromethane fractions of EEFCB and EECCB. EEALR had no inhibitory effect on the assayed cytokines, while EEFCB inhibited the release of TNF- α , MCP-1 and IL-1 β in a concentration-dependent manner, with maximum inhibitions (MI) of $84.9 \pm 0.6\%$, $89.8 \pm 0.8\%$ and $72.2 \pm 4.4\%$, respectively. On the other hand, EECCB inhibited the release of TNF- α , MCP-1 and IL-1 β with MI values of $28.5 \pm 5.6\%$, $42.3 \pm 9.0\%$ and $74.5 \pm 3.7\%$, respectively. The ethyl acetate (EtOAc) fraction of EECCB inhibited the release of TNF- α at all tested concentrations (MI of $59.9 \pm 2.3\%$), as well as the release of MCP-1 (MI of $85.7 \pm 2.7\%$) and IL-1 β (MI of $71.9 \pm 4.9\%$). Subsequently, the potential antidiabetic activity of the extracts and fractions was tested *in vitro* by the α -amylase and α -glucosidase enzyme inhibition assay. EECCB and EtOAc inhibited α -glucosidase activity in a concentration-dependent manner (MI of $97.9 \pm 1.4\%$ and $97.0 \pm 0.7\%$, respectively) and induced approximately 30% inhibition of α -amylase. EECCB was fractionated by chromatography over a Sephadex-LH20 column to afford tannin-enriched fractions, named FR15C and FR16C. Both fractions inhibited α -glucosidase activity, and FR16C induced a more potent inhibitory effect than EECCB and FR15C, showing the highest pIC_{50} value (5.3 ± 0.1). Following, EECCB, EtOAc, FR15C and FR16C were assayed in the starch tolerance test in mice. FR16C significantly reduced blood glucose 60 min after starch intake, resulting in a glycemic level of 181 ± 10 mg/dL in comparison to the control group of 238 ± 11 mg/dL. The

chemical composition of EECCB, EtOAc and FR16C was investigated by UPLC-ESI-MS/MS. Ions with mass-to-charge ratio compatible with gallic acid, glucogallin, ellagic acid, corilagin and geraniin were identified in EECCB. According to UPLC-ESI-MS/MS analysis, the EtOAc fraction was enriched in the identified constituents of EECCB, whereas FR16C presented a less complex profile, majorly composed by corilagin and geraniin. The ellagitannins corilagin and geraniin were isolated by preparative HPLC and had their structures characterized unequivocally by 1D (^1H and ^{13}C) and 2D (COSY, HMQC and HMBC) NMR experiments. In a chronic model of T2DM induced by the administration of a low dose of streptozotocin with nicotinamide supplementation (LD-STZ-NA), the mice groups treated with EECCB or EtOAc showed a significant reduction in fasting glucose levels between the second and fourth week of treatment, with maximal hypoglycemic effects observed in the EtOAc-treated group. In conclusion, the results obtained from *in vitro* and *in vivo* assays herein reported for EECCB and derived fractions indicate that pequi peels contain ellagitannins with hypoglycemic activity, potentially useful for future development of an herbal product or functional food with antidiabetic properties.

Keywords: *Caryocar brasiliense*; ellagitannins; corilagin; geraniin; antidiabetic activity; nutraceutical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do fracionamento dos extratos etanólicos por partição sequencial entre solventes imiscíveis.....	60
Figura 2. Esquema geral do fracionamento do extrato etanólico das cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i>	62
Figura 3. Esquema geral do fracionamento por CLAE em escala preparativa da fração enriquecida em taninos (FR16C).....	65
Figura 4. Conversão do MTT no produto formazana.....	78
Figura 5. Viabilidade das células THP-1 tratadas com os extratos etanólicos de folhas (A) e de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> (B), e de partes aéreas de <i>L. rubra</i> (C) nas concentrações de 62,5, 125, e 250 µg/mL (A e B); e 10, 30 e 90 µg/mL (C), juntamente com o controle de células (CC), controle de extrato (CE) e dexametasona (DX), após 24h de incubação, no ensaio de MTT.....	79
Figura 6. Viabilidade das células THP-1 tratadas com as frações hexânica (A), diclorometânica (B), em acetato de etila (C) e hidrometanólica (D) do extrato etanólico de folhas de <i>C. brasiliense</i> nas concentrações de 62,5, 125, e 250 µg/mL, juntamente com o controle de células (CC), controle de extrato (CE) e dexametasona (DX) após 24h de incubação, no ensaio de MTT.....	80
Figura 7. Viabilidade das células THP-1 tratadas com as frações hexânica (A), diclorometânica (B), em acetato de etila (C) e hidrometanólica (D) do extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> nas concentrações de 62,5, 125, e 250 µg/mL, juntamente com o controle de células (CC), controle de extrato (CE) e dexametasona (DX) após 24h de incubação, no ensaio de MTT.....	81
Figura 8. Viabilidade das células THP-1 tratadas com as frações hexânica (A), diclorometânica (B), em acetato de etila (C) e hidrometanólica (D) do extrato etanólico de partes aéreas de <i>L. rubra</i> nas concentrações de 10, 30, e 90 µg/mL, juntamente com o controle de células (CC), controle de extrato (CE) e dexametasona (DX) após 24h de incubação, no ensaio de MTT.....	82
Figura 9. Efeito dos extratos etanólicos de folhas (A) e de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> (B), e de partes aéreas de <i>L. rubra</i> (C), avaliados nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL, sobre a liberação de IL-1β em células THP-1 estimuladas por LPS após 24h de incubação.....	84
Figura 10. Efeito dos extratos etanólicos de folhas (A) e de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> (B), e de partes aéreas de <i>L. rubra</i> (C), avaliados nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL, sobre a liberação de TNF-α em células THP-1 estimuladas por LPS após 24h de incubação.....	85
Figura 11. Efeito dos extratos etanólicos de folhas (A) e de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> (B), e de partes aéreas de <i>L. rubra</i> (C), avaliados nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL, sobre a liberação de MCP-1 em células THP-1 estimuladas por LPS após 24h de incubação.....	87

Figura 12. Efeito das frações em acetato de etila e hidrometanólica dos extratos de folhas (A e B, respectivamente) e de cascas do fruto (C e D, respectivamente) de <i>C. brasiliense</i> , avaliados nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL, sobre a liberação de IL-1β em células THP-1 estimuladas por LPS, após 24h de incubação.....	89
Figura 13. Efeito das frações em acetato de etila e hidrometanólica dos extratos de folhas (A e B, respectivamente) e de cascas do fruto (C e D, respectivamente) de <i>C. brasiliense</i> , avaliados nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL, sobre a liberação de TNF-α em células THP-1 estimuladas por LPS, após 24h de incubação.....	90
Figura 14. Efeito das frações em acetato de etila e hidrometanólica dos extratos de folhas (A e B, respectivamente) e de cascas do fruto (C e D, respectivamente) de <i>C. brasiliense</i> , avaliados nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL, sobre a liberação de MCP-1 em células THP-1 estimuladas por LPS, após 24h de incubação.....	91
Figura 15. Efeito do extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> (EECCB), da fração em acetato de etila (EtOAc), e das frações 15C e 16C sobre a atividade de α-amilase.....	92
Figura 16. Efeito do extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> (EECCB), da fração em acetato de etila (EtOAc), e das frações 15C e 16C sobre a atividade de α-glicosidase (A). Acarbose foi utilizada como controle positivo. Valores de pCI ₅₀ para EECCB, EtOAc, 15C, 16C e acarbose para inibição de α-glicosidase (B).....	94
Figura 17. Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> registrado em 210 nm.....	96
Figura 18. Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a fração EtOAc do extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> registrado em 210 nm.....	96
Figura 19. Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-MS/MS para o extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> (A) Detecção no DAD em 210 nm; (B) íons totais (TIC) no modo negativo de ionização (ESI ⁻); (C) íons totais (TIC) no modo positivo de ionização (ESI ⁺).....	101
Figura 20. Espectros obtidos por CLUE-ESI-MS/MS para o extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> . (A) Espectro no UV-Vis do pico 1, tR = 0,56 min; (B) Espectro de massas em ESI ⁻ para o pico 1, tR = 0,56 min; (C) Espectro de íons produto em ESI ⁻ do íon precursor de m/z 331 [M-H] ⁻ , tR = 0,64 min. (D) Espectro de massas em ESI ⁺ para o pico 1, tR = 0,56 min.....	104
Figura 21. Espectros obtidos por CLUE-ESI-MS/MS, para o extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> . (A) Espectro no UV-Vis do pico 2, tR = 0,93 min; (B) Espectro de massas em ESI ⁻ obtido para o pico 2, tR = 0,97 min; (C) Espectro de íons produto em ESI ⁻ do íon de m/z 169 [M-H] ⁻ , tR = 1,12 min; (D) Espectro de massas em ESI ⁺ para o pico 2, tR = 0,95 min.....	105
Figura 22. Espectros obtidos por CLUE-ESI-MS/MS para o extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> . (A) Espectro no UV-Vis obtido para o pico 4, tR = 1,85 min; (B) Espectro de massas em ESI ⁻ obtido para o pico 4, tR = 1,89 min; (C) Espectro de íons produto em ESI ⁻ do íon de m/z 633 [M-H] ⁻ , tR = 1,99 min.....	107
Figura 23. Proposta de fragmentação do íon precursor de m/z 633 [M-H] ⁻ referente à substância corilagina.....	108

Figura 24. Espectros, obtidos por CLUE-ESI-MS/MS, para o extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> . (A) Espectro no UV-Vis obtido para o pico 5, tR = 2,18 min; (B) Espectro de massas em ESI ⁻ obtido para o pico 5, tR = 2,20 min; (C) Espectro de íons produto em ESI ⁻ do íon precursor de <i>m/z</i> 951 [M-H] ⁻ , tR = 2,38 min; (D) Espectro de massas em ESI ⁺ obtido para o pico 5, tR = 2,22 min.....	109
Figura 25. Proposta de fragmentação do íon precursor de <i>m/z</i> 951 [M-H] ⁻ referente à forma hemiacetálica A da geraniina (hidratada).....	110
Figura 26. Espectros obtidos por CLUE-ESI-MS/MS, para o extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> . (A) Espectro obtido no UV-Vis para o pico 7, tR = 2,81 min; (B) Espectro de massas em ESI ⁻ obtido para o pico 7, tR = 2,86 min; (C) Espectro de íons produto em ESI ⁻ do íon precursor de <i>m/z</i> 301 [M-H] ⁻ , tR = 2,99 min; (D) Espectro de massas em ESI ⁺ para o pico 7, tR = 2,83 min.....	112
Figura 27. Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-MS/MS, para a fração em EtOAc do extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> . (A) Detecção no DAD em 210 nm; (B) íons totais (TIC) no modo negativo de ionização (ESI ⁻); (C) íons totais (TIC) no modo positivo de ionização (ESI ⁺).....	114
Figura 28. Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-MS/MS com detecção no DAD em 210 nm. (A) extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> ; (B) fração FR12C; (C) fração FR13C; (D) fração FR15C; (E) fração FR16C.....	117
Figura 29. Áreas médias sob os picos correspondentes à corilagina e à geraniina quantificadas nos extratos de DVCCB (A e B, respectivamente) e EECCB (C e D respectivamente) obtidos com diferentes misturas de acetona/água.....	123
Figura 30. Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-MS/MS com detecção em modo negativo de ionização (ESI ⁻) do íon negativo [M-H] ⁻ de <i>m/z</i> 633 (corilagina). (A) EECCB; (B) fração em EtOAc; (C) fração 16C; (D) extrato acetona/água 8:2 de EECCB; (E) extrato acetona/água 8:2 de DVCCB.....	125
Figura 31. Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-MS/MS com detecção em modo negativo de ionização (ESI ⁻) do íon negativo [M-H] ⁻ de <i>m/z</i> 951 (formas hemiacetálicas hidratadas A e B da geraniina). (A) EECCB; (B) fração em EtOAc; (C) fração 16C; (D) extrato acetona/água 8:2 de EECCB; (E) extrato acetona/água 8:2 de DVCCB.....	126
Figura 32. Espectro no UV obtido para SI-T1A.....	129
Figura 33. Perfis cromatográficos obtidos para SI-T1A por CLUE-ESI-MS, com detecção no UV (A) e por MS nos modos positivo (B) e negativo (C) de ionização....	130
Figura 34. Espectros de massas obtidos para SI-T1A por CLUE-ESI-MS nos modos positivo (A) e negativo (B) de ionização para os picos tR de 4,26 e 4,29 min, respectivamente.....	130
Figura 35. Espectro no UV obtido para SI-T2A.....	131
Figura 36. Perfis cromatográficos obtidos para SI-T2A por CLUE-ESI-MS, com detecção no UV (A) e por MS nos modos positivo (B) e negativo (C) de ionização....	132
Figura 37. Espectros de massas obtidos para SI-T2A por CLUE-ESI-MS nos modos positivo (A) e negativo (B) de ionização para os picos tR de 3,19 e 3,22 min, respectivamente.....	132

Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para T2A (100 MHz, CD_3COCD_3).....	134
Figura 39. Subespectro DEPT-135 obtido para T2A (100 MHz, CD_3COCD_3).....	136
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H obtido para T2A (400 MHz, CD_3COCD_3).....	138
Figura 41. Expansão do espectro de RMN de ^1H obtido para T2A (400 MHz, CD_3COCD_3).....	139
Figura 42. Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, CD_3COCD_3) obtido para T2A.....	141
Figura 43. Expansão do mapa de contornos HMQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T2A.....	142
Figura 44. Expansão do mapa de contornos HMQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T2A.....	142
Figura 45. Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3COCD_3) obtido para T2A.....	143
Figura 46. Estrutura cristalina (27) e formas hemiacetálicas hidratadas (27-A e 27-B) da geraniina.....	145
Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para T1A (150 MHz, CD_3COCD_3).....	146
Figura 48. Subespectro DEPT-135 obtido para T1A (150 MHz, CD_3COCD_3).....	150
Figura 49. Espectro de RMN de ^1H obtido para T1A (600 MHz, CD_3COCD_3).....	152
Figura 50. Expansão do espectro de RMN de ^1H obtido para T1A (600 MHz, CD_3COCD_3).....	153
Figura 51. Expansão do mapa de contornos COSY (600 MHz, CD_3COCD_3) obtido para T1A, evidenciando as correlações entre os hidrogênios da forma hemiacetálica A.....	156
Figura 52. Expansão do mapa de contornos COSY (600 MHz, CD_3COCD_3) obtido para T1A, evidenciando as correlações entre os hidrogênios da forma hemiacetálica B.....	156
Figura 53. Expansão do mapa de contornos HMQC (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T1A, evidenciando as correlações ^1H - ^{13}C da forma hemiacetálica A (δ_{C} de 40-80 ppm).....	157
Figura 54. Expansão do mapa de contornos HMQC (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T1A, evidenciando as correlações ^1H - ^{13}C da forma hemiacetálica A (δ_{C} de 85-135 ppm).....	157
Figura 55. Expansão do mapa de contornos HMQC (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T1A, evidenciando as correlações ^1H - ^{13}C da forma hemiacetálica B (δ_{C} de 40-80 ppm).....	158
Figura 56. Expansão do mapa de contornos HMQC (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T1A, evidenciando as correlações ^1H - ^{13}C da forma hemiacetálica B (δ_{C} de 85-140 ppm).....	158
Figura 57. Expansão do mapa de contornos HMBC (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T1A evidenciando as correlações de longa distância ^1H - ^{13}C da forma hemiacetálica A (δ_{C} de 110-195 ppm).....	159

Figura 58. Teste de tolerância ao amido com administração do extrato etanólico e frações de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> . (A) Extrato etanólico (EECCB) e fração em acetato de etila (EtOAc). (B) Frações cromatográficas 15C e 16C obtidas a partir de EECCB.....	161
Figura 59. Efeito do extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> (EECCB) e da fração em acetato de etila (EtOAc) sobre a glicemia de jejum em camundongos com DMT2.....	163

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Recomendação para rastreamento do DMT2 em adultos assintomáticos.....	35
Quadro 2. Critérios adotados pela SBD para diagnóstico de normoglicemia, pré-diabetes e DMT2.....	36
Quadro 3. Dados de aquisição ou coleta das plantas selecionadas para estudo.....	59
Quadro 4. Massa seca dos extratos etanólicos brutos e respectivos rendimentos extrativos.....	59
Quadro 5. Fracionamento preliminar dos extratos secos (2 g cada) por partição entre solventes imiscíveis.....	60
Quadro 6. Gradiente de eluição empregado para obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE.....	61
Tabela 1. Fracionamento do extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> em coluna Sephadex-LH20.....	63
Quadro 7. Gradiente de eluição empregado no fracionamento 1 por CLAE em escala preparativa.....	66
Tabela 2. Fracionamento 1 da fração enriquecida em taninos (FR16C) por CLAE em escala preparativa.....	66
Tabela 3. Fracionamento 2 da subfração T11 por CLAE em escala preparativa	67
Quadro 8. Gradiente de eluição empregado para obtenção dos perfis cromatográficos por CLUE-ESI-MS/MS.....	69
Quadro 9. Composição química, dados espectrométricos e atividades biológicas descritos na literatura para espécies do gênero <i>Caryocar</i>	98
Tabela 4. Resultados da análise do extrato de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> por CLUE-ESI-MS/MS.....	102
Tabela 5. Resultados da análise da fração em EtOAc do extrato de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> por CLUE-ESI-MS/MS.....	115
Tabela 6. Substâncias majoritárias identificadas nas frações FR13C, FR15C e FR16C.....	119
Tabela 7. Identificação por CLUE-ESI-MS das substâncias majoritárias nas subfrações (SFR) T11, T13 e T14.....	128
Tabela 8. Atribuições dos sinais de RMN de ¹³ C obtidos para T2A (100 MHz, CD ₃ COCD ₃).....	135
Tabela 9. Atribuições dos sinais de RMN de ¹ H obtidos para T2A (400 MHz, CD ₃ COCD ₃).....	140
Tabela 10. Atribuições dos sinais de RMN de ¹³ C obtidos para T1A (150 MHz, CD ₃ COCD ₃).....	148
Tabela 11. Atribuições dos sinais de RMN de ¹ H obtidos para T1A (600 MHz, CD ₃ COCD ₃).....	154
Tabela 12. Efeitos do tratamento dos camundongos em modelo de DMT2 com EECCB e com a fração em EtOAc sobre HbA1c, perfil lipídico, marcadores hepáticos e ácido úrico.....	167

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
acetona- d_6	acetona deuterada
ADA	<i>American Diabetes Association</i> (Associação Americana de Diabetes)
ADA RT	<i>American Diabetes Association Risk Test</i> (teste de risco da Associação Americana de Diabetes)
AEHRS	fração em acetato de etila de pétalas de <i>Hibiscus rosa-sinensis</i>
AGI	<i>α-glucosidase inhibitor</i> (inibidor de α -glicosidase)
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (albumina de soro bovino)
CT	colesterol total
CC	controle de toxicidade do solvente
CCD	cromatografia em camada delgada
CD ₃ COCD ₃	acetona deuterada
CE	controle de toxicidade dos extratos
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CE ₅₀	concentração da substância na qual 50% do efeito é observado
CI ₅₀	concentração da amostra na qual 50% da inibição é observada
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	cromatografia líquida de ultra eficiência
COSY	<i>correlation spectroscopy</i> (espectroscopia de correlação)
DAD	<i>diode array detector</i> (detector de arranjo de diodos)
DCM	diclorometano
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i> (intensificação sem distorção por transferência de polarização)
DHHDP	<i>dehydrohexahydroxydiphenoyl</i> (desidrohexaidroxidifenoila)
DHL	dieta hiperlipídica
DM	diabetes mellitus
DMG	diabetes mellitus gestacional
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO- d_6	dimetilsulfóxido deuterado
DMT1	diabetes mellitus tipo 1

DMT2	diabetes mellitus tipo 2
DNSA	<i>3,5-dinitrosalicylic acid</i> (ácido 3,5-dinitrosalicílico)
NDPP	<i>National Diabetes Prevention Program</i> (Programa Nacional de Prevenção ao Diabetes)
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
DPP-4	dipeptidil peptidase-4
DVCCB	droga vegetal de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i>
D ₂ O	água deuterada
EAP	extração sob alta pressão
ECA	enzima conversora de angiotensina-2
EECCB	extrato etanólico de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i>
EECR	extrato etanólico de cascas do fruto de <i>Citrus reticulata</i>
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
EPM	erro padrão da média
ERXA	extrato metanólico de raízes de <i>X. americana</i>
ESI	<i>electrospray ionization</i> (ionização por <i>electrospray</i>)
EtOAc	acetato de etila
FINDRISC	<i>Finnish Diabetes Risk Score</i> (Pontuação Finlandesa de Risco de Diabetes)
Gal	galoíla
GIP	<i>glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i> (polipeptídeo insulinoatrópico dependente de glicose)
GJ	glicemia de jejum
GJP	glicemia de jejum prejudicada
Glc	porção glicosídica
GLP-1	<i>glucagon-like peptide-1</i> (peptídeo-1 tipo glucagon)
GK	<i>Goto-Kakisaki</i>
HbA1c	hemoglobina glicada
HDL-c	<i>high density lipoprotein cholesterol</i> (colesterol da lipoproteína de alta densidade)
HEX	hexano
HFD	<i>high-fat diet</i> (dieta hiperlipídica)
HFD/LD-STZ	<i>high-fat diet/low dose streptozotocin</i> (dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina)
HHDP	<i>hexahydroxydiphenoyl</i> (hexahidroxidifenoila)
HMBC	<i>heteronuclear multiple-bond correlation</i> (correlação heteronuclear a múltiplas ligações)

HMQC	<i>heteronuclear multiple-quantum correlation</i> (correlação heteronuclear de quantum múltiplo)
HOMA-IR	<i>homeostatic model assessment for insulin resistance</i> (índice de resistência à insulina)
Hz	hertz
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IDF	<i>International Diabetes Federation</i> (Federação Internacional de Diabetes)
IKK/NF-κB	complexo enzimático IKK regulador do fator de transcrição nuclear kappa B
IL-1β	interleucina-1 beta
IL-6	interleucina-6
IL-10	interleucina-10
IMC	índice de massa corporal
In	integral
i.p.	intraperitoneal
<i>J</i>	constante de acoplamento escalar
LDL-c	<i>low density lipoprotein cholesterol</i> (colesterol da lipoproteína de baixa densidade)
LD-STZ	<i>low dose streptozotocin</i> (baixa dose de estreptozotocina)
LD-STZ-NA	<i>low dose streptozotocin with nicotinamide supplementation</i> (baixa dose de estreptozotocina com suplementação de nicotinamida)
LPS	lipopolissacarídeo
MAFA	família de oncogene fibrosarcoma musculoaponeurótico A
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i> (proteína quimiotática de monócitos-1)
MeOH	metanol
metanol- <i>d</i> ₄	metanol deuterado
MM	massa molecular
MS	<i>mass spectrometry</i> (espectrômetro de massas)
MTF	metformina
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide</i> (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
<i>m/z</i>	<i>mass-to-charge ratio</i> (razão massa-carga)
NA	<i>nicotinamide</i> (nicotinamida)
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
ND	nefropatia diabética
NFκB	fator de transcrição nuclear kappa B

NKX6.1	homeobox 1 NK6
OLEFT	<i>Otsuka Long Evans Tokushima Fatty</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	<i>o-phenylenediamine</i> (o-fenilenodiamina)
P.A.	para análise
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato salino)
p.c.	peso corporal
PDX1	proteína homeobox 1 pancreático duodenal
pH	potencial hidrogeniônico
pCI ₅₀	logaritmo negativo da concentração de amostra que inibe 50% da atividade biológica
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i> (forbol 12-miristato-13-acetato)
PN	produto natural
pNPG	<i>p-nitrophenyl β-D-glucopyranoside</i> (p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo)
PPM	parte por milhão
PTFE	politetrafluoretileno
RDNP	retinopatia diabética não proliferativa
RDP	retinopatia diabética proliferativa
Rf	<i>retention factor</i> (fator de retenção)
RI	resistência à insulina
RMN	ressonância magnética nuclear
RPM	rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SFB	soro fetal bovino
SGLT2	cotransportador sódio-glicose 2
STZ	<i>streptozotocin</i> (estreptozotocina)
SU	sulfonilureia
TG	triglicerídeos
TGP	tolerância à glicose prejudicada
THP-1	células de leucemia monocítica humana aguda
TIC	<i>total ion chromatogram</i> (cromatograma de íons totais)
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i> (receptor tipo Toll 4)
TMS	tetrametilsilano
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i> (fator de necrose tumoral-α)

TOTG	teste oral de tolerância à glicose
TQD	<i>triple quadrupole detector</i> (detector triplo quadrupolo)
tR	tempo de retenção
TTA	teste de tolerância ao amido
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNIMONTES	Universidade Estadual de Montes Claros
UPLC	<i>ultra performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra eficiência)
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos da América)
UV	ultravioleta
ZF	<i>Zucker fatty</i>
λ_{\max}	comprimento de onda máximo
1C_4	unidade glicopiranosídica na conformação de cadeira invertida
1H -RMN	ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
$^2J_{CH}$	acoplamento de longa distância ^{13}C - 1H a duas ligações
4C_1	unidade glicopiranosídica na conformação de cadeira
$^4J_{HH}$	acoplamento 'W' de longa distância
^{13}C -RMN	ressonância magnética nuclear de carbono-13

LISTA DE FÓRMULAS ESTRUTURAIS

1. Ácido asiático.....	43
2. Ácido abscísico.....	43
3. Berberina.....	43
4. Vindolina.....	44
5. Galantamina.....	44
6. Reína.....	44
7. Crisofanol.....	44
8. Resveratrol.....	44
9. Curcumina.....	45
10. Rutina.....	45
11. Canferol.....	45
12. Lagerstroemina.....	46
13. Acertanina.....	46
14. Hexanoato de etila.....	49
15. Octanoato de etila.....	49
16. β -ocimeno.....	49
17. Ácido hexanóico.....	49
18. Galato de etila.....	49
19. Hidroximetilfurfural.....	49
20. Ácido gálico.....	49
21. Chiquimato de metila.....	49
22. Ácido oléico.....	50
23. Ácido quínico.....	50
24. Quercetina-3- <i>O</i> -arabinose.....	50
25. Breviscapina.....	88
26. Corilagina.....	133
27. Geraniina.....	145

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	29
3.1 DIABETES: ASPECTOS GERAIS.....	29
3.2 PRÉ-DIABETES.....	30
3.3 DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	31
3.3.1 Fisiopatologia.....	31
3.3.2 Rastreamento.....	34
3.3.3 Diagnóstico.....	35
3.3.4 Tratamento.....	36
3.3.4.1 Tratamento não farmacológico.....	36
3.3.4.2 Tratamento farmacológico.....	38
3.4 PRODUTOS NATURAIS POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA O DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	39
3.4.1 Modelos experimentais de DMT2.....	40
3.4.2 Compostos fitoquímicos potencialmente ativos contra o DMT2.....	40
3.5 ESPÉCIES VEGETAIS SELECIONADAS PARA ESTUDO.....	47
3.5.1 <i>Caryocar brasiliense</i>	47
3.5.2 <i>Leea rubra</i>	50
4. EXPERIMENTAL.....	52
4.1 EQUIPAMENTOS, SOLVENTES, REAGENTES, MATERIAIS DE CONSUMO, VIDRARIAS E MATERIAIS DIVERSOS.....	52
4.1.1 Equipamentos.....	52
4.1.2 Solventes, reagentes e materiais de consumo.....	53
4.1.3 Vidrarias e materiais diversos.....	56
4.2 ELUENTES PARA CCD.....	57
4.2.1 Eluente tolueno/acetona/metanol (10:4:2).....	57
4.2.2 Eluente tolueno/acetona/metanol (7:4:3).....	57
4.2.3 Eluente tolueno/acetona/metanol (7:4:5).....	57
4.2.4 Eluente n-butanol/ácido acético/água (40:15:60).....	57

4.3 REVELADORES PARA CCD.....	57
4.3.1 Reagente vanilina-ácido sulfúrico.....	58
4.3.2 Reagente anisaldeído-ácido sulfúrico.....	58
4.3.3 Solução de cloreto de alumínio.....	58
4.4 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	58
4.5 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	59
4.6 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	59
4.7 ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	61
4.7.1 Preparo das amostras.....	61
4.7.2 Condições cromatográficas.....	61
4.8 FRACIONAMENTO DO EXTRATO DE CASCAS DO FRUTO DE <i>C. brasiliense</i>	61
4.8.1 Esquema geral do fracionamento realizado.....	61
4.8.1.1 Fracionamento em coluna de Sephadex-LH-20.....	62
4.8.2 Teste de extração das substâncias corilagina e geraniina.....	64
4.9 FRACIONAMENTO DE FR16C POR CLAE EM ESCALA PREPARATIVA.....	64
4.9.1 Esquema geral do fracionamento realizado.....	64
4.9.1.1 Fracionamento 1 por CLAE em escala preparativa.....	65
4.9.1.1.1 Preparo das amostras.....	65
4.9.1.1.2 Condições cromatográficas.....	65
4.9.1.2 Fracionamento 2 por CLAE em escala preparativa.....	67
4.9.1.2.1 Preparo das amostras.....	67
4.9.1.2.2 Condições cromatográficas.....	67
4.10 ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS.....	68
4.10.1 Análises por cromatografia a líquido de ultra-eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLUE-ESI-MS/MS).....	68
4.10.1.1 Preparo das amostras.....	68
4.10.1.2 Condições cromatográficas.....	68
4.10.1.3 Parâmetros do espectrômetro de massas.....	69
4.10.2 Análises por ressonância magnética nuclear (RMN).....	69
4.11 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	69
4.11.1 Avaliação do efeito de extratos e frações sobre a liberação de IL-1 β , TNF- α e MCP-1.....	69
4.11.1.1 Preparo de meio RPMI incompleto.....	70

4.11.1.2 Cultivo de células THP-1.....	70
4.11.1.3 Ensaio do MTT para avaliação da viabilidade celular.....	70
4.11.1.4 Determinação de citocinas por ELISA.....	71
4.11.1.4.1 Protocolo de ELISA para ensaios <i>in vitro</i>	72
4.11.2 Ensaio de inibição de α -amilase <i>in vitro</i>	72
4.11.3 Ensaio de inibição de α -glicosidase <i>in vitro</i>	73
4.12 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	74
4.12.1 Animais.....	74
4.12.2 Teste de tolerância a carboidrato <i>in vivo</i>	75
4.12.2.1 Teste de tolerância oral ao amido.....	75
4.12.3 Ensaio para avaliação do perfil glicêmico e dos parâmetros bioquímicos em camundongos com diabetes mellitus tipo 2.....	75
4.12.3.1 Indução do diabetes mellitus tipo 2.....	75
4.12.3.2 Delineamento experimental.....	76
4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	76
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
5.1 Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade celular.....	78
5.2 Avaliação <i>in vitro</i> do efeito de extratos e frações sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios.....	82
5.2.1 Avaliação dos extratos nos modelos <i>in vitro</i> de inibição da liberação de IL-1 β , TNF- α e MCP-1.....	83
5.2.2 Atividade <i>in vitro</i> das frações de <i>C. brasiliense</i> sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias.....	88
5.3 Avaliação do extrato e frações EtOAc, 15C e 16C de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i> sobre a atividade das enzimas α -glicosidase e α -amilase.....	91
5.4 Avaliação fitoquímica das cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i>	94
5.4.1 Análise do perfil cromatográfico.....	95
5.4.2 Caracterização por CLUE-ESI-MS/MS.....	97
5.4.2.1 Extrato de cascas do fruto de <i>C. brasiliense</i>	100
5.4.2.1.1 Identificação da glicogalina.....	103
5.4.2.1.2 Identificação do ácido gálico.....	103
5.4.2.1.3 Identificação da corilagina.....	106
5.4.2.1.4 Identificação da geraniina.....	106
5.4.2.1.5 Identificação do ácido elágico.....	111
5.4.2.2 Fração em acetato de etila.....	113

5.5 Fracionamento do extrato etanólico de cascas de <i>C. brasiliense</i> em coluna de Sephadex-LH20.....	116
5.5.1 Teste de extração dos taninos hidrolisáveis corilagina e geraniina.....	121
5.6 Isolamento dos elagitaninos, caracterização química por CLUE-ESI-MS/MS e confirmação estrutural inequívoca por RMN.....	127
5.6.1 Caracterização química por CLUE-ESI-MS/MS.....	127
5.6.2 Confirmação estrutural das substâncias isoladas por RMN	133
5.6.2.1 Confirmação estrutural da substância T2A.....	133
5.6.2.2 Confirmação estrutural da substância T1A.....	144
5.7 Ensaios <i>in vivo</i> para avaliação da atividade antidiabética.....	158
5.7.1 Teste de tolerância ao amido <i>in vivo</i>	160
5.7.2 Ensaio <i>in vivo</i> em modelo experimental de DMT2.....	162
6. CONCLUSÃO.....	170
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171

1. INTRODUÇÃO

A importância dos produtos naturais (PNs) para o desenvolvimento de novos fármacos é inquestionável. Os laboratórios de pesquisa acadêmicos e da indústria farmacêutica continuam a explorar uma variedade de substâncias naturais, a serem utilizadas como modelos para o desenvolvimento de fármacos (Butler, 2004). Segundo levantamento recente de Newman e Cragg (2020), de um total de 1394 novos fármacos baseados em micromoléculas, lançados no período de 1981 a 2019, 713 desses (53,1%) são provenientes de PNs e seus derivados. Exemplos de fármacos recentemente desenvolvidos a partir de PNs obtidos de plantas, introduzidos na terapêutica no período de 2015 a 2019 incluem irinotecano lipossomal, um derivado semissintético da camptotecina (*Camptotheca acuminata*), usado contra o adenocarcinoma de pâncreas metastático; fumarato de monometila, isolado da espécie herbácea *Fumaria indica*, para tratamento da esclerose múltipla; succinato de tafenoquina, um agente antimalárico similar à cloroquina e à quinina, obtida das cascas de *Cinchona sp.*; o antidiabético etabonato de remoglifozina, um análogo da florizina isolada da casca da raiz da macieira (*Malus sp.*); dentre outros (Agarwal et al., 2020; Newman & Cragg, 2020).

Em 2019, o diabetes foi estimado em 463 milhões de adultos com idade entre 20 e 79 anos, representando cerca de 9,3% da população mundial nessa faixa etária. Prevê-se que o número total aumente para 578 milhões (10,2%) até 2030 e para 700 milhões (10,9%) até 2045 (IDF, 2019a).

Em estágios mais avançados, o tratamento do diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) requer a utilização de terapia combinada, idealmente utilizando fármacos com mecanismos de ação distintos, sendo que o principal objetivo consiste em alcançar um controle metabólico satisfatório. Torna-se necessário, então, desenvolver novas alternativas terapêuticas que sejam seguras, efetivas e multifuncionais (Grundy, 2006). Essa necessidade representa um grande desafio mas, ao mesmo tempo, abre caminho para a busca de PNs que sejam capazes de tratar e controlar o DMT2, evitando assim a progressão da deterioração metabólica.

A literatura científica lista diversos extratos vegetais e PNs isolados de plantas com atividade hipoglicemiante relatada em modelos *in vitro* e *in vivo*. Neste contexto, propõe-se a investigação da potencial atividade antidiabética de extratos, frações e substâncias isoladas das espécies vegetais *Caryocar brasiliense* e *Leea rubra*, visando identificar moléculas bioativas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do DMT2.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de extratos de *Caryocar brasiliense* e *Leea rubra* em ensaio de tolerância oral ao amido e modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2, visando identificar substâncias bioativas e/ou frações caracterizadas com potencial terapêutico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter extratos etanólicos de *C. brasiliense* e *L. rubra* e realizar seu fracionamento por partição entre solventes imiscíveis;
2. Avaliar o efeito dos extratos e frações sobre a liberação das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) por células THP-1 estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS);
3. Avaliar a potencial atividade antidiabética dos extratos e frações em ensaio *in vitro* de inibição das enzimas α -amilase de pâncreas porcino e α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae*;
4. Selecionar o extrato com atividade mais promissora e realizar o seu fracionamento biomonitorado pelos ensaios *in vitro* supracitados;
5. Isolar os constituintes bioativos e realizar sua elucidação estrutural e/ou caracterização, no caso de misturas (frações);
6. Avaliar as frações selecionadas e/ou substâncias isoladas em modelo *in vivo* de diabetes mellitus tipo 2.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DIABETES: ASPECTOS GERAIS

O diabetes mellitus (DM) pode ser definido como um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente de deficiência na secreção de insulina, ou na sua ação ou em ambos os mecanismos (ADA, 2014a; SBD, 2019).

Indicadores recentes publicados pela *International Diabetes Federation* (IDF) revelam que cerca de 463 milhões de adultos com idade na faixa de 20-79 anos foram diagnosticados com diabetes em 2019, sendo que desse total 4,2 milhões de indivíduos morreram em todo mundo. De acordo com a projeção, estima-se que esse número atinja 578,4 milhões e 700,2 milhões de indivíduos adultos nos anos de 2030 e 2045, respectivamente (IDF, 2019a). Considerando os países da América Central e do Sul, o Brasil apresentou uma prevalência de diabetes em indivíduos adultos (20-79 anos) de cerca de 11,4%, em estimativa feita em 2019, estando inferior apenas a Cuba (13,2%) e Porto Rico (16,8%), mas em contrapartida à frente de vários países como Argentina (6,3%), Chile (9,8%), Colômbia (8,4%), Paraguai (8,8%) e Uruguai (8,3%). Além disso, nesse mesmo ano houve cerca de 135,2 mil mortes (20-79 anos) relacionadas ao diabetes no Brasil (IDF, 2019b).

A hiperglicemia crônica desencadeada pelo DM está associada a danos, disfunção e falência a longo prazo de diferentes órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2014b). Essas complicações do DM estão associadas, sobretudo, à disfunção endotelial induzida por hiperglicemia contínua provocada pela ativação da via do poli-ol, pela produção de espécies reativas de oxigênio e formação de produtos finais de glicação avançada (Chirayath, 2016).

Segundo a *American Diabetes Association* (ADA) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), o diabetes pode ser classificado, de acordo com sua etiologia, nas seguintes categorias: diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), diabetes mellitus gestacional (DMG) e tipos específicos de diabetes devido a outras causas (ADA, 2021, SBD, 2019).

O DMT1 é uma doença poligênica autoimune caracterizada pela destruição progressiva das células β pancreáticas, ocasionando uma deficiência completa na produção de insulina com sua consequente dependência exógena (Chiang et al., 2014). Estima-se que o DMT1 represente cerca de 5 a 10% de todos os casos de DM e embora seja mais frequentemente diagnosticado em crianças e adolescentes, pode ocorrer em qualquer idade (SBD, 2019).

O DMT2 é a forma mais prevalente de diabetes, correspondendo de 90 a 95% de todos os casos de DM no mundo. Do início da doença até o desenvolvimento dos sintomas, muitos

indivíduos com diabetes não diagnosticado podem apresentar complicações, como doença renal crônica, insuficiência cardíaca, retinopatia e neuropatia. Desta forma, a detecção precoce do DMT2, o seu diagnóstico e tratamento adequado podem salvar vidas e prevenir ou retardar significativamente o surgimento das complicações devastadoras relacionadas com a doença (IDF, 2017).

Além de ser o foco principal deste trabalho, o DMT2 se apresenta como um distúrbio metabólico silencioso, de alta complexidade, elevada prevalência e que pode levar a inúmeras complicações. Com base nessas premissas, essa doença deve ser abordada com maior profundidade e com uma visão multidimensional (Khan et al., 2019). A seguir serão discutidos com maior detalhamento o estágio de transição denominado “pré-diabetes” e os diversos aspectos relacionados ao DMT2.

3.2 PRÉ-DIABETES

O pré-diabetes é uma condição na qual o nível de glicose sanguínea encontra-se acima do normal, mas não o suficiente para ser diagnosticado como DMT2 (CDC, 2020). Um estudo transversal, conduzido em 345 municípios do Brasil, revelou uma prevalência de pré-diabetes de 18,4%, após monitoramento da glicemia de 17.580 pacientes com alto risco metabólico (Correr et al., 2020).

Considerado um indicador precoce do DMT2, o pré-diabetes ocorre quando o paciente é diagnosticado com a glicemia de jejum prejudicada (GJP) e/ou tolerância à glicose prejudicada (TGP) e/ou resultado alterado de hemoglobina glicada (HbA1c) (Khan et al., 2019). Dois dos principais fatores envolvidos na gênese da GJP e da TGP são a resistência à insulina (RI) e a diminuição na função das células β pancreáticas (Kanat et al., 2015).

Os diagnósticos da GJP e TGP são confirmados quando os níveis de glicemia de jejum (GJ) e glicose plasmática medida 2 horas após teste oral de tolerância à glicose (TOTG) encontram-se na faixa de 100-125 mg/dL (5,6-6,9 mmol/L) e 140-199 mg/dL (7,8-11,0 mmol/L), respectivamente. A hemoglobina glicada encontra-se alterada quando o nível de HbA1c está na faixa de 5,7-6,4% (39-47 mmol/mol) (ADA, 2021).

Um indivíduo pode ter pré-diabetes por anos sem, todavia, apresentar sintomas claros. A condição clínica geralmente não é detectada até que problemas de saúde mais sérios, como o DMT2, apareçam. Os principais fatores de risco para desenvolvimento do pré-diabetes incluem: sobrepeso; idade igual ou superior a 45 anos; parentes de primeiro grau com DMT2; atividade física com frequência inferior a 3 vezes por semana; mulheres que foram diagnosticadas com DMG; mulheres com a síndrome do ovário policístico; e raça/etnia afro-americana,

hispano/latino-americana, indígena-americana, pacífico-irlandesa ou asiático americana (CDC, 2020).

Vários trabalhos recentemente publicados envolvendo indivíduos adultos com pré-diabetes, demonstraram que intervenções no estilo de vida podem reduzir em até 70% o risco de desenvolver DMT2. O principal objetivo dos programas de intervenção no estilo de vida consiste em intervir em fatores de risco do pré-diabetes que possam ser mitigados (Bansal, 2015).

Um importante estudo denominado *National Diabetes Prevention Program* (NDPP) demonstrou os efeitos benéficos das intervenções no estilo de vida sobre a prevenção do diabetes em cidadãos norte-americanos (Knowler et al., 2002). No NDPP, após um acompanhamento de três anos, as intervenções intensivas no estilo de vida levaram a uma redução de risco de 58%. Essas intervenções envolveram mudanças na dieta e na atividade física visando à redução de peso. Este estudo mostrou que para cada redução de 1 kg no peso, o risco de desenvolver diabetes no futuro foi diminuído em 16% (Hamman et al., 2006).

Embora haja evidências comprovando a eficácia da farmacoterapia com metformina na prevenção do DMT2, outras opções farmacológicas também se encontram disponíveis. No entanto, essas alternativas estão geralmente associadas a efeitos adversos que limitam sua utilização em adultos com pré-diabetes (Bansal, 2015). A metformina tem sido usada por várias décadas para o tratamento do diabetes e observou-se que apresenta resultados favoráveis adicionais, como redução do índice de massa corporal (IMC) e melhora do perfil de colesterol. A evidência coletiva de estudos entre indivíduos com TGP, sugere uma redução de 45% no risco de desenvolvimento de DMT2 (Lily & Godwin, 2009).

3.3 DIABETES MELLITUS TIPO 2

O DMT2 pode ser definido como uma doença complexa que se desenvolve ao longo de um espectro de disfunções metabólicas e hormonais, que ocorrem no contexto de influências genéticas e ambientais (ADA, 2019; Skyler et al., 2017). Agora é bem aceito que a GJP, TGP e o pré-diabetes precedem o desenvolvimento do DMT2. O rastreamento e o diagnóstico precoce em populações de risco possibilitam retardar a progressão da doença e melhorar os resultados do tratamento a longo prazo. A compreensão da fisiopatologia do DMT2 pode auxiliar os médicos na identificação de múltiplas abordagens para desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (Kelly & Neary, 2020).

3.3.1 Fisiopatologia

As causas primárias da fisiopatologia da RI e do DMT2 estão centradas em oito deficiências principais. Defronzo (2009) foi o primeiro a denominá-las pelo termo “octeto destruidor”, em 2009. Essa disfunção fisiopatológica observada no DMT2 ocorre a partir da interação entre vários sistemas de órgãos do corpo, envolvendo grandes déficits observados no fígado, cérebro, tecido muscular, tecido adiposo, rins, trato gastrointestinal e pâncreas (células α e β) (Kelly & Neary, 2020).

A RI é uma característica marcante do DMT2 sendo observada principalmente no fígado, músculos, cérebro e tecido adiposo. A insulina é um hormônio anabólico responsável pelas seguintes atividades: regulação da produção e armazenamento da glicose, controle da captação de glicose nos tecidos musculares, supressão da lipólise, modulação do metabolismo e ação sobre o apetite no sistema nervoso central (Costanzo, 2018a).

No fígado saudável, a insulina inibe a gliconeogênese enquanto, no tecido muscular, aumenta a captação de glicose e promove a síntese do glicogênio (Vargas et al., 2021). No tecido adiposo, a insulina suprime a lipólise e estimula a lipogênese por meio da captação de glicose pelos adipócitos e sua conversão em ácidos graxos (Petersen & Shulman, 2018). No cérebro, a insulina e outros hormônios periféricos regulam a produção hepática de glicose e atuam na modulação do apetite (Lundqvist et al., 2019).

Nos pacientes com DMT2, os hepatócitos não regulam a produção de glicose; as células musculares não absorvem a glicose de forma eficiente; a lipólise não é suprimida; e a disfunção do sistema nervoso central se manifesta, levando a uma regulação inadequada do apetite e do metabolismo (Petersen & Shulman, 2018).

Os distúrbios no tecido adiposo visceral desempenham papéis importantes na patogênese do DMT2. A lipotoxicidade, fruto do excesso de ácidos graxos livres circulantes, promove a RI no fígado, músculo, cérebro e pâncreas, e se apresenta como hipertrigliceridemia e doença hepática gordurosa não alcoólica, comorbidades precipitantes comuns para DMT2 (Kelly & Neary, 2020).

O acúmulo de tecido adiposo está associado ao estado pró-inflamatório e à redução da produção de adiponectina pelos adipócitos, que em níveis fisiológicos auxilia na sensibilização à insulina, homeostase da glicose e proteção contra inflamação (Burhans et al., 2018; Wang & Scherer, 2016). A obesidade eleva a produção de mediadores pró-inflamatórios, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (Shoelson et al., 2006). A IL-6, por exemplo, é responsável pelo recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo em indivíduos obesos, levando ao desenvolvimento de inflamação, RI e DMT2 (Akbari & Hassan-Zadeh, 2018).

Os rins participam da homeostase da glicose por meio de três funções principais: liberação de glicose diretamente no plasma através da gliconeogênese; retirada de glicose da circulação para suprir suas necessidades energéticas; e reabsorção de glicose do filtrado glomerular, devolvendo glicose à circulação plasmática (Alsahli & Gerich, 2017).

Na patogênese do DMT2, os rins produzem indevidamente mais glicose por meio da gliconeogênese, de forma semelhante ao que ocorre no fígado (Meyer et al., 2004). Em relação à reabsorção fisiológica de glicose, à medida que os níveis de glicose aumentam no sangue, o limiar para sua reabsorção também se eleva, agravando ainda mais a hiperglicemia (Kelly & Neary, 2020).

Os principais hormônios intestinais incluem o polipeptídeo insulino-trópico dependente de glicose (GIP) e o peptídeo 1 tipo glucagon (GLP-1), que são secretados em resposta à ingestão de nutrientes, principalmente carboidratos (Costanzo, 2018c). À medida que o nível glicêmico aumenta após uma refeição, o GIP e o GLP-1 se ligam aos receptores nas células β , aumentando a secreção de insulina e inibindo a secreção de glucagon (Nauck & Meier, 2018).

Estudos realizados em pacientes com DMT2 não mostraram redução consistente na secreção de GIP e GLP-1 em resposta aos testes orais de tolerância à glicose e de refeição mista, quando comparados com indivíduos saudáveis. No entanto, há evidências que sustentam o desenvolvimento de resistência ao GIP e GLP-1 em indivíduos com DMT2, especialmente em pacientes diabéticos de longa data (Calanna et al., 2013).

A porção endócrina do pâncreas é constituída principalmente pelas células α e β -pancreáticas (Saisho, 2016). As células β secretam a insulina, que reduz os níveis de glicose e promove sua captação e armazenamento nos tecidos periféricos. O glucagon secretado pelas células α atua, em contrapartida, elevando os níveis glicêmicos por meio da estimulação da gliconeogênese no fígado e nos rins (Costanzo, 2018b).

No pâncreas saudável, existem vários fatores de transcrição envolvidos na diferenciação, proliferação e maturação das células β , incluindo as proteínas homeobox 1 pancreático duodenal (PDX1), homeobox 1 NK6 (NKX6.1) e família de oncogene fibrosarcoma musculoaponeurótico A (MAFA) (Zhu et al., 2017; Aigha et al., 2020).

Em condições normais, os fatores PDX1, NKX6.1 e MAFA são capazes de manter a função e a diferenciação das células β . Por sua vez, em um cenário de estresse metabólico a hiperglicemia e dislipidemia reduzem a expressão desses fatores de transcrição, provocando o retorno das células β ao seu estágio não diferenciado (Guo et al., 2013). Na condição de supernutrição e obesidade, o aumento da demanda metabólica leva à exaustão do retículo endoplasmático e ao estresse das células β , que podem se desdiferenciar em células α e produzir

glucagon, exacerbando ainda mais a hiperglicemia, ou prosseguir para a fase de apoptose (White et al., 2016).

3.3.2 Rastreamento

O rastreamento consiste em um conjunto de procedimentos cujo objetivo é diagnosticar o DMT2 ou a condição de pré-diabetes em indivíduos assintomáticos. Essa atividade é de grande importância para a saúde pública, pois impacta diretamente na possibilidade de diagnóstico e tratamento precoces (Herman et al., 2015).

Com menor frequência, indivíduos com DMT2 podem apresentar sinais e sintomas clássicos de hiperglicemia, como poliúria, polifagia e emagrecimento inexplicado. Nesses indivíduos, é mandatória a coleta de material para realização de exames diagnósticos confirmatórios. Porém, na maioria das vezes, o DMT2 é assintomático, sendo o diagnóstico realizado por exames laboratoriais de rotina ou manifestações das complicações crônicas da doença. Nesse sentido, a maioria das diretrizes recomenda o rastreamento do DMT2 em pessoas acima de 40 a 45 anos de idade e/ou com presença de fatores de risco (SBD, 2019).

As ferramentas de triagem para determinação do risco de DMT2 vem sendo amplamente utilizadas para orientar os provedores sobre a real necessidade da realização dos testes diagnósticos. O ideal é que a triagem não inclua exames de sangue, pois um de seus objetivos é reduzir o número de pessoas que precisam de exames laboratoriais (ADA, 2021).

Os questionários de triagem estão se tornando amplamente utilizados porque incluem os principais fatores de risco e podem ser facilmente realizados por pessoal treinado e até mesmo pelo indivíduo que está sendo triado (IDF, 2017). Como exemplo dessas ferramentas, temos o *Finnish Diabetes Risk Score* (FINDRISC), ou o *American Diabetes Association Risk Test* (ADA RT) que consistem em questionários de 7 a 10 itens, os quais fornecem escores ou medidas do risco de desenvolver DMT2 (Janghorbani et al., 2013; Armstrong, 2017).

Pessoas com escores considerados de alto risco nos questionários de triagem devem ser submetidas ao teste diagnóstico recomendado. O procedimento mais utilizado é a glicemia de jejum, que identifica pessoas com DMT2 não diagnosticado e, também, pessoas com pré-diabetes, que devem ser orientadas a seguir um estilo de vida saudável, por meio de um programa estruturado, a fim de reduzir o risco de progressão para DMT2 (IDF, 2017).

Se o rastreamento for realizado sem a utilização prévia de questionários, deve-se adotar a triagem de acordo com a idade e/ou fatores de risco presentes nos indivíduos avaliados. No quadro 1 é apresentada a proposta da ADA para o rastreamento do DMT2 (ADA, 2021).

A maioria das diretrizes recomenda repetir o teste de triagem pelo menos a cada três anos. Se a triagem foi positiva, mas o teste diagnóstico foi negativo, o indivíduo deve ser orientado sobre como seguir um estilo de vida saudável e o procedimento diagnóstico deve ser repetido anualmente (SBD, 2019).

Quadro 1 – Recomendação para rastreamento do DMT2 em adultos assintomáticos

Critérios para rastreamento do DMT2 em adultos assintomáticos
<p>Indivíduos com idade superior a 45 anos; sugere-se o rastreamento do DMT2 em indivíduos com sobrepeso ou obesidade e que apresentem mais um fator de risco para DM dentre os seguintes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pré-diabetes; • História familiar de DM (parente de primeiro grau); • Raça/etnia de alto risco para DM (negros, hispânicos ou índios Pima); • Mulheres com diagnóstico prévio de DMG; • História de doença cardiovascular; • Hipertensão arterial; • HDL-c < 35 mg/dL e/ou triglicérides > 250 mg/dL; • Síndrome de ovários policísticos; • Sedentarismo; • Acantose nigricans.

DM: *diabetes mellitus*; DMG: *diabetes mellitus* gestacional; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade. Adaptado de *American Diabetes Association*, 2021 (ADA, 2021)

3.3.3 Diagnóstico

Na maioria dos casos de pré-diabetes ou DMT2, a condição é assintomática e o diagnóstico é realizado por meio de exames laboratoriais (SBD, 2019). Diretrizes recentes e consagradas da *International Diabetes Federation* (IDF) e Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendam as seguintes opções de exames laboratoriais: glicemia de jejum (GJ); glicemia medida 2 horas após teste oral de tolerância à glicose (TOTG); e teste de hemoglobina glicada (HbA1c) (IDF, 2017; WHO, 2020).

A GJ é realizada após coleta de sangue periférico do indivíduo sob jejum calórico de no mínimo 8 horas; no TOTG, previamente à ingestão de 75 g de glicose dissolvida em água, coleta-se uma amostra de sangue em jejum e outra amostra de sangue 2 horas após a sobrecarga oral para avaliação da glicemia. O teste de HbA1c oferece vantagens por refletir níveis glicêmicos dos últimos 3 a 4 meses, sofrer menos variabilidade dia a dia e independe do estado de jejum para sua determinação; por outro lado, possui limitações por se tratar de medida indireta da glicemia que pode sofrer interferência de algumas condições clínicas como anemias, hemoglobinopatias, uremia, e outros fatores como idade e etnia (IDF, 2017).

No caso de um primeiro diagnóstico positivo para DMT2 e na ausência de sintomas inequívocos de hiperglicemia, o indivíduo deve repetir o mesmo exame em uma segunda amostra de sangue a fim de se confirmar o resultado alterado. Pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia, tais como poliúria, polidipsia, polifagia e emagrecimento, devem ser submetidos à dosagem de glicemia ao acaso e independente do jejum, não havendo necessidade de confirmação por meio de segunda dosagem caso se verifique glicemia aleatória ≥ 200 mg/dL (WHO, 2020).

No quadro 2 encontram-se descritos os valores de normalidade para os respectivos exames, bem como os critérios diagnósticos para pré-diabetes e DMT2 mais aceitos, de acordo com guias internacionalmente reconhecidos como IDF e OMS, e que foram adotados pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2019).

Quadro 2 – Critérios adotados pela SBD para diagnóstico de normoglicemia, pré-diabetes e DMT2.

	Glicemia de jejum (mg/dL)	Glicemia medida 2h após TOTG (mg/dL)	Glicemia ao acaso (mg/dL)	HbA1c (%)	Observações
Normoglicemia	< 100	< 140	-	< 5,7	OMS emprega valor de corte de 110 mg/dL para normalidade da glicemia de jejum
Pré-diabetes ou risco aumentado para DM	≥ 100 e < 126*	≥ 140 e < 200#	-	$\geq 5,7$ e < 6,5	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de pré-diabetes.
Diabetes estabelecido	≥ 126	≥ 200	≥ 200 com sintomas de hiperglicemia	$\geq 6,5$	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de DMT2. Método HbA1c deve ser padronizado. Na ausência de sintomas de hiperglicemia, é necessário confirmar o diagnóstico pela repetição de testes.

DM: *diabetes mellitus*; HbA1c: hemoglobina glicada; OMS: Organização Mundial da Saúde.* Categoria também conhecida como glicemia de jejum alterada; # Categoria também conhecida como intolerância oral à glicose
Adaptado de Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019 (SBD, 2019)

3.3.4 Tratamento

3.3.4.1 Tratamento não farmacológico

Uma dieta saudável para atingir ou manter o peso corporal normal, atividades físicas regulares, e o abandono de alguns maus hábitos constituem os pilares para o controle do DMT2 (WHO, 2020).

Todas as diretrizes recomendam uma dieta hipocalórica para pessoas com sobrepeso ou obesas com DMT2, a fim de se alcançar uma redução de peso significativa ou peso corporal normal. Isso significa que pessoas moderadamente obesas precisam perder pelo menos 10 kg e, portanto, algumas diretrizes recomendam uma ingestão calórica diária limitada na faixa de 800 a 1200 calorias a fim de se atingir a perda de peso desejada dentro de 6 meses (IDF, 2017).

Os planos alimentares a serem utilizados para melhorar o padrão de vida e diminuir o peso do paciente podem variar de acordo com suas preferências ou necessidades. O paciente deve ser aconselhado a consumir alimentos ricos em fibras e com baixo índice glicêmico. Deve-se dar preferência a alimentos nutritivos, como, por exemplo, frutas, vegetais, laticínios com baixo teor de gordura, leguminosas como grãos inteiros e feijão, sementes, carnes magras e nozes (Khursheed et al., 2019).

Todos os pacientes devem ser aconselhados a praticar atividades físicas diárias regulares e adequadas às suas capacidades cardiorrespiratórias, como por exemplo, caminhar, trotar ou correr. A maioria dos adultos deve realizar pelo menos 150 min de atividade aeróbica de intensidade moderada ou vigorosa por semana, durante pelo menos três dias (WHO, 2020).

Durante o exercício, os níveis glicêmicos mudam rapidamente à medida que os músculos em contração aumentam a captação de glicose (Awotidebe et al., 2016). A prática de atividades físicas melhora a aptidão muscular e cardiorrespiratória; acelera o metabolismo da glicose e dos lipídeos; diminui a pressão arterial e reduz alguns mediadores inflamatórios, como a leptina e as citocinas. A melhora do condicionamento físico está diretamente relacionada à redução na frequência de DMT2, mortalidade e doenças cardíacas (Yanai et al., 2018).

O risco de desenvolver DMT2 é 30 a 40% maior para os fumantes atuais do que para os não fumantes (CDC, 2020). Foi demonstrado que o tabagismo tem conexão com o desenvolvimento do DMT2 e com a progressão das complicações do diabetes (Liu et al., 2018). Embora os fumantes possam ter menor acúmulo de gordura abdominal do que os não fumantes, a interrupção do tabagismo é um fator essencial na diminuição dos níveis glicêmicos elevados dos pacientes com DMT2 (Sliwinska-Mosson & Milnerowicz, 2017).

O álcool quando ingerido em excesso e não pode ser autocontrolado deve ser interrompido. A ingestão de álcool deve ser evitada no planejamento de uma dieta hipocalórica, pois possui um valor calórico considerável (7 kcal/g), principalmente a cerveja, que possui

calorias adicionais. Pessoas com níveis muito altos de triglicerídeos ou sinais de inflamação do fígado devem evitar o álcool completamente (IDF, 2017).

3.3.4.2 Tratamento farmacológico

A terapia farmacológica, que inclui certos agentes hipoglicemiantes, também é vital para a manutenção do controle glicêmico quando aliada à adoção de medidas para obtenção de um estilo de vida saudável (Seino et al., 2015).

Todos esses medicamentos antidiabéticos são administrados por via oral, exceto exenatida, pramlintida e insulina e, portanto, são chamados de hipoglicemiantes orais (Scheen, 2017). A seleção de um agente hipoglicemiante específico deve ser feita somente após ouvir e conscientizar o paciente sobre os cuidados com a própria saúde. O médico deve considerar alguns fatores como idade, risco de hipoglicemia, história aterosclerótica e cardiovascular, eficácia, possíveis efeitos adversos, via de administração, preço e preferências do paciente ao prescrever um determinado medicamento hipoglicemiante (Freeman, 2015).

Vários medicamentos antidiabéticos orais vêm sendo desenvolvidos para tratamento do DMT2. Esses agentes hipoglicemiantes encontram-se categorizados nas seguintes classes: sulfonilureias (SUs); biguanidas; meglitinidas; tiazolidinedionas; inibidores da dipeptidil peptidase IV (DPP-4); inibidores de α -glicosidase (AGI); inibidores do cotransportador sódio-glicose 2 (SGLT2); e agonistas do peptídeo-1 tipo glucagon (GLP-1) (Padhi et al., 2020).

A monoterapia para tratamento do DMT2 tem como objetivo alcançar uma redução de 0,5 a 1,5% na HbA1c (Rhee et al., 2017). Um controle adicional da glicemia pós-prandial, para valores inferiores a 7%, pode ser realizado para auxiliar na redução da HbA1c (Monnier et al., 2003). A metformina (MTF) é o fármaco de escolha para iniciar a monoterapia, sendo que o médico pode maximizar sua tolerância ajustando a dose para 500 a 2000 mg por dia ou usar formulações de liberação controlada. Caso a MTF não seja bem tolerada, outros hipoglicemiantes podem ser usados, preferencialmente as SUs (tolbutamida, glipizida, glicazida), AGIs (miglitol, acarbose, voglibose) ou inibidores da DPP-4 (vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina, linagliptina) (IDF, 2017).

Quando a monoterapia falha no controle dos parâmetros glicêmicos dos pacientes tratados, recomenda-se o uso da terapia combinada. Pode-se adotar uma terapia de dupla ou tripla combinação de fármacos. Em certas circunstâncias, os hipoglicemiantes orais também são combinados com a terapia insulínica (Cahn & Cefalu, 2016; Vos et al., 2016).

Na terapia dupla, as melhores opções de adição à metformina são as SUs, inibidores da DPP-4 ou inibidores do SGLT2 (canaglifozina, dapaglifozina, empaglifozina, ertuglifozina).

Um AGI também pode ser utilizado; no entanto, distúrbios gastrointestinais podem ser potencializados quando se combina um AGI com MTF, mas menos graves se combinado com MTF de liberação controlada. Fármacos agonistas do receptor GLP1 (exenatida, liraglutida, lixisenatida, dulaglutida) também podem ser usados, caso a perda de peso seja uma prioridade e os medicamentos estejam disponíveis. Porém, deve-se ressaltar o custo elevado do tratamento com esses fármacos, não sendo, portanto, uma terapia acessível a todos os pacientes (IDF, 2017).

Algumas diretrizes sugerem que a terapia tripla possa ser uma alternativa antes de iniciar o tratamento com insulina injetável. As combinações triplas de hipoglicemiantes orais mais empregadas são: MTF + SU + pioglitazona ou MTF + SU + inibidor da DPP-4. A combinação tripla MTF + inibidor do SGLT2 + agonista do receptor de GLP1 pode ser uma terapia útil para aqueles pacientes que não perderam peso suficiente (Padhi et al., 2020).

Quando a terapia com hipoglicemiantes orais, seja isoladamente ou em combinação dupla ou tripla, não for mais eficiente na manutenção do controle glicêmico do paciente, preconiza-se a introdução da insulinoterapia por meio de esquema terapêutico utilizando insulina isolada ou associada com fármacos hipoglicemiantes (Turner et al., 2005).

A combinação de um ou mais fármacos hipoglicemiantes com insulina pode melhorar o controle glicêmico, evitar ou amenizar o ganho de peso e diminuir a frequência de injeções diárias assim como a quantidade de insulina necessária em comparação à insulinoterapia isolada. A eficácia dos resultados dependerá, entretanto, das características clínicas e fisiológicas do paciente, tendo em vista, também, os potenciais efeitos individuais dos diferentes antidiabéticos orais (Van Baar et al., 2018).

Yki-Järvinen (2001) enfatizou o emprego da terapia combinada de insulina com hipoglicemiantes orais, especialmente o uso da metformina com insulina em uma dose noturna ao deitar (insulina *bedtime*), o que apresentou não somente maior eficácia, mas também menor risco de hipoglicemia e de ganho de peso, além de maior receptividade dos pacientes à nova terapia, em comparação com uma terapia exclusiva com insulina.

Em outro estudo a terapia tripla de insulina glargina combinada com metformina e sitagliptina foi avaliada em 74 pacientes com DM2 por 12 semanas e comparada à mesma terapia sem os hipoglicemiantes orais. Os autores relataram redução de 1% na HbA1c, ganho de peso de 1,3 kg e diminuição do número de episódios hipoglicêmicos (Chan et al., 2015).

3.4 PRODUTOS NATURAIS POTENCIALMENTE ATIVOS CONTRA O DIABETES MELLITUS TIPO 2

3.4.1 Modelos experimentais de DMT2

Alguns modelos com animais foram desenvolvidos para demonstrar a fisiopatologia e as complicações do DMT2. Por meio desses, pode-se combinar as características genéticas e funcionais do diabetes com o propósito de realizar uma triagem pré-clínica de candidatos a fármacos antidiabéticos mais seguros e eficazes. Os modelos de DMT2 mais frequentes incluem o modelo de ratos *Zucker fatty* (ZF), monogênico de obesidade; modelo de ratos *Otsuka Long Evans Tokushima Fatty* (OLEFT), poligênico de obesidade; modelo de ratos *Goto-Kakisaki* (GK), não-obeso de DMT2; modelo de ratos ou camundongos High-Fat Diet (HFD), induzido por dieta hiperlipídica; modelo de ratos ou camundongos Low Dose Streptozotocin (LD-STZ), induzido por injeção de baixa dose de estreptozotocina, uma substância tóxica para o pâncreas; e modelo de ratos ou camundongos High-Fat Diet/Low Dose Streptozotocin (HFD/LD-STZ), induzido por dieta hiperlipídica e injeção de baixa dose de estreptozotocina (Cefalu, 2006; Srinivasan & Ramarao, 2007; Guo et al., 2018).

3.4.2 Compostos fitoquímicos potencialmente ativos contra o DMT2

Vários fármacos sintéticos com efeitos antidiabéticos estão disponíveis para utilização na clínica. No entanto, esses fármacos podem causar alguns efeitos adversos incluindo ganho de peso, hipoglicemia, retenção de líquidos e até mesmo insuficiência cardíaca. Dada a impossibilidade da terapia convencional de responder a todos desafios que o DMT2 impõe, torna-se importante o desenvolvimento de novas terapêuticas. Ante o exposto os constituintes químicos isolados de plantas com propriedades antidiabéticas se apresentam como alternativas promissoras (Xu et al., 2018). Dentre as principais classes de compostos fitoquímicos potencialmente ativos contra o DMT2 podem citar-se como exemplos os terpenoides, alcaloides, quinonas e o grande grupo de compostos polifenólicos, que incluem os estilbenos, flavonoides, taninos dentre outros (Cardullo et al., 2020; Yang et al., 2020).

Os terpenos são um grupo diverso de compostos naturais que podem ser encontrados em várias espécies vegetais (Ludwiczuk et al., 2017). De acordo com estudo realizado em modelo de ratos GK, o tratamento com ácido asiático (1) na dose de 25 mg/kg/dia por 4 semanas reduziu a glicemia de jejum ($P < 0,01$) e aumentou a sensibilidade à insulina ($P < 0,05$) em comparação ao grupo controle diabético. Além disso, os resultados da coloração imunohistoquímica para fibronectina indicaram que o tratamento com ácido asiático reduziu significativamente a fibrose das ilhotas β pancreáticas em ratos GK (Wang et al., 2015). O ácido abscísico (2) estimulou significativamente a liberação de insulina em células β pancreáticas murinas e humanas estimuladas por glicose *in vitro* (Bruzzone et al., 2008). De acordo com

estudo realizado por Magnone et al. (2015), baixas doses de ácido abscísico melhoraram significativamente a tolerância à glicose em ratos e pacientes saudáveis, sugerindo sua potencial utilização no tratamento de pacientes diabéticos com resistência ou deficiência na produção de insulina.

As substâncias alcaloídicas têm uma ampla gama de funções biológicas, incluindo atividade antimalárica, anticâncer, antibacteriana e anti-hiperglicêmica (Jiang et al., 2015). O tratamento com berberina (3), um alcaloide benzilisoquinolínico de *Rhizoma coptidis*, nas doses de 150 e 300 mg/kg administradas diariamente por 12 semanas, aumentou a secreção de insulina e reduziu os níveis sanguíneos de HbA1c, colesterol total e glicose de jejum em comparação ao grupo diabético não tratado ($p < 0,05$) em estudo realizado com modelo de ratos ZF (Dong et al., 2016). Recentemente, Goboza et al. (2019) relataram que a vindolina (4), um alcalóide indólico proveniente da espécie vegetal *Catharanthus roseus*, foi capaz de reduzir significativamente a glicose de jejum, a alanina transferase sérica e os níveis das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina em comparação com os controles diabéticos em modelo de ratos LD-STZ. Um estudo clínico duplo cego randomizado e controlado por placebo foi conduzido com 60 pacientes com síndrome metabólica para avaliar o efeito da administração oral da galantamina (5), um alcaloide natural terciário obtido de espécies de plantas da família Amaryllidaceae. O grupo de pacientes ($n = 30$) tratado com galantamina na dose de 8 mg/dia durante 4 semanas, seguido de 16 mg/dia por 8 semanas, apresentou redução significativa no nível de insulina plasmática e no valor do índice de resistência à insulina (HOMA-IR) em comparação ao grupo placebo ($n = 30$), comprovando sua potencial utilização no tratamento do DMT2 (Consolim-Colombo et al., 2017).

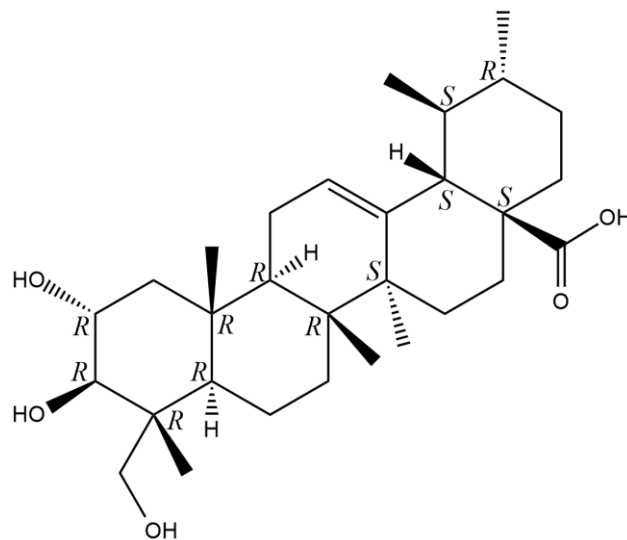
As quinonas, uma classe de substâncias aromáticas dicarbonílicas, são encontradas predominantemente em fungos e plantas com flores. As antraquinonas são a maior classe de quinonas de ocorrência natural, tendo como representantes bem conhecidos a reína (6) e o crisofanol (7), os quais vem sendo amplamente estudados devido às suas propriedades antidiabéticas (Gong et al., 2014). O tratamento com lisinato de reína reduziu os níveis de glicose de jejum, triglicerídeos e colesterol total, além de atenuar o estresse oxidativo e a esteatose hepática em modelo de camundongos HFD/LD-STZ (Lin et al., 2014). O crisofanol, uma antraquinona isolada de *Rheum rhabarbarum*, reduziu os níveis séricos de glicose de jejum e triglicerídeos, inibiu o acúmulo de lipídios nos hepatócitos e diminuiu o peso corporal em modelo de ratos HFD comparado ao grupo controle não tratado. Além disso, essa substância provocou redução dos níveis de IL-6 e IL-1 β e aumentou a expressão de IL-10 melhorando o processo inflamatório induzido nos animais (Zhang et al., 2018).

Os compostos polifenólicos são benéficos no controle de muitas doenças devido às suas funções antioxidantes, anti-inflamatórias e reguladoras do metabolismo (Ly et al., 2014). O resveratrol (8), um polifenol natural amplamente encontrado em uvas e mirtilos, reduziu de maneira significativa a RI em modelo de camundongos HFD (Kim et al., 2011); modelo de ratos HFD/LD-STZ (Yang et al., 2020; Zheng et al., 2013); modelo de ratos ZF (Rivera et al., 2009); e modelo suíno (Burgess et al., 2011). Além disso, comprovou-se em estudo clínico realizado em pacientes com DMT2, que o resveratrol reduz marcadamente os níveis insulínicos, a RI, a glicemia e a produção de mediadores inflamatórios (Brasnyó et al., 2011; Bhatt et al., 2012). A curcumina (9), obtida de uma planta herbácea asiática da família Zingiberaceae conhecida cientificamente como *Curcuma longa*, demonstrou efeito significativo na redução dos níveis de glicose sanguínea de jejum e HbA1C, além de aumentar a sensibilidade à insulina em pacientes obesos com DMT2 (He et al., 2012; Na et al., 2012). Os possíveis mecanismos envolvidos nas atividades antidiabéticas dessa substância incluem a inibição da peroxidação lipídica e menor ativação do NF- κ B (Suryanarayana et al., 2007; Soetikno et al., 2011).

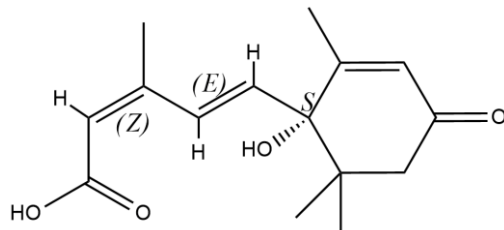
Flavonoides é a designação dada a um grande grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis. Esses compostos bioativos podem ser encontrados nas partes aéreas de diversas espécies vegetais; vários pesquisadores têm se concentrado na investigação de suas propriedades antidiabéticas (Testa et al., 2016). Estudos recentes sugeriram que várias substâncias flavonoídicas incluindo a rutina (10) e o canferol (11), na forma isolada ou em combinação com outros fármacos, podem melhorar e estabilizar a secreção de insulina das células β pancreáticas. Em um estudo anti-DMT2 *in vivo*, a administração de rutina (50 e 100 mg/kg) e pioglitazona (10 mg/kg) por via oral durante três semanas melhorou significativamente o peso corporal, reduziu a glicemia de jejum e a hemoglobina glicada, e inibiu a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α em modelo de ratos HFD/LD-STZ (Niture et al., 2014). Luo e colaboradores (2015) investigaram se o canferol poderia melhorar a RI por meio da inibição das respostas inflamatórias em modelo de ratos HFD/LD-STZ. Nesse estudo, ratos diabéticos foram tratados oralmente com canferol (50 ou 100 mg/kg) e aspirina (100 mg/kg) por 10 semanas. Os resultados mostraram que, ao final do tratamento, o canferol aumentou a sensibilidade à insulina nos ratos com DMT2. Os possíveis mecanismos podem estar relacionados com a regulação negativa do sinal hepático IKK/NF- κ B com a consequente inibição da produção dos mediadores inflamatórios TNF- α e IL-6.

Os taninos são polifenóis de origem vegetal que apresentam estruturas complexas e elevada massa molar. Esses fitocompostos têm atraído o interesse científico devido às suas promissoras propriedades biológicas incluindo atividade anti-inflamatória, antioxidante e

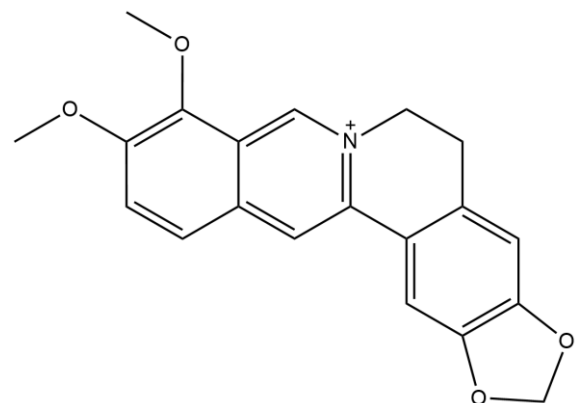
antidiabética (Lorenzo et al., 2018). O elagitanino lagerstroemina (12), isolado das folhas da planta medicinal filipina *Lagerstroemia speciosa* (Banaba), estimulou a captação de glicose em adipócitos de ratos de maneira concentração dependente, sendo obtido um valor de CE_{50} de 0,08 mM (Hayashi et al., 2002). O provável mecanismo envolvido na atividade antidiabética da lagerstroemina se deve ao aumento da fosforilação da tirosina na subunidade β dos receptores de insulina (Hattori et al., 2003). Por sua vez, a acertanina (13), um galotanino obtido das folhas de *Acer saccharum*, inibiu a atividade de α -glicosidase *in vitro* empregando a sacarose e maltose como substratos, com valores de CI_{50} (μ M) correspondentes a $29,2 \pm 4,9$ e $200 \pm 19,6$, respectivamente. Adicionalmente, a administração da acertanina na dose de 15 mg/kg reduziu significativamente os níveis de glicose sanguínea do grupo tratado após 30, 60, e 90 min em comparação ao grupo controle ($p < 0,005$; $p < 0,005$; e $p < 0,05$ respectivamente) no teste de tolerância à sacarose com camundongos normoglicêmicos ddY (Honma et al., 2010).



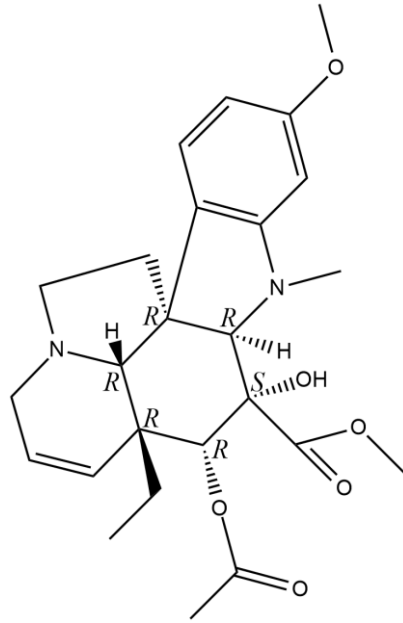
(1)



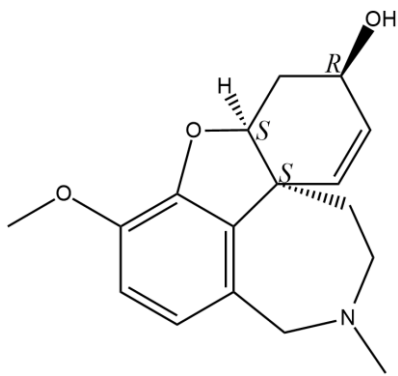
(2)



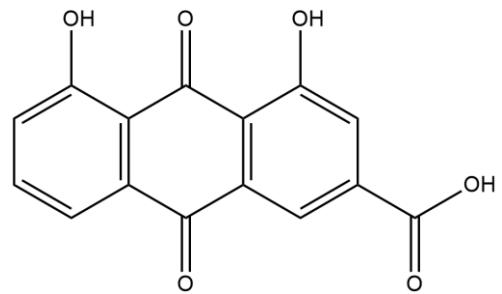
(3)



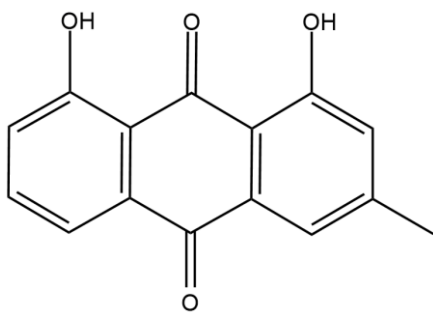
(4)



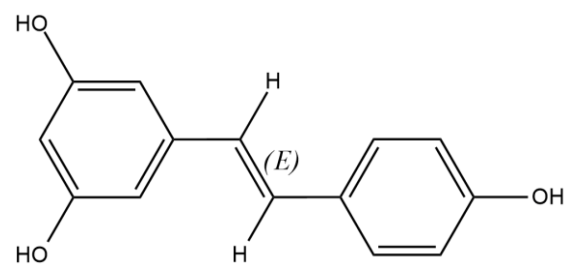
(5)



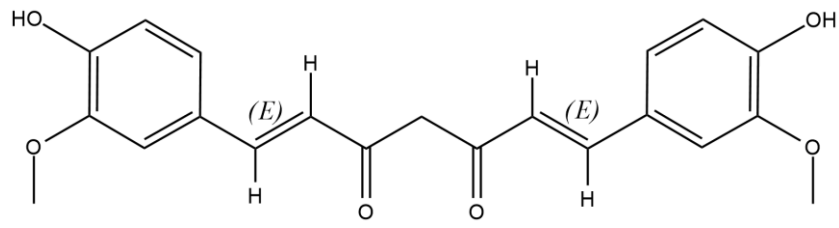
(6)



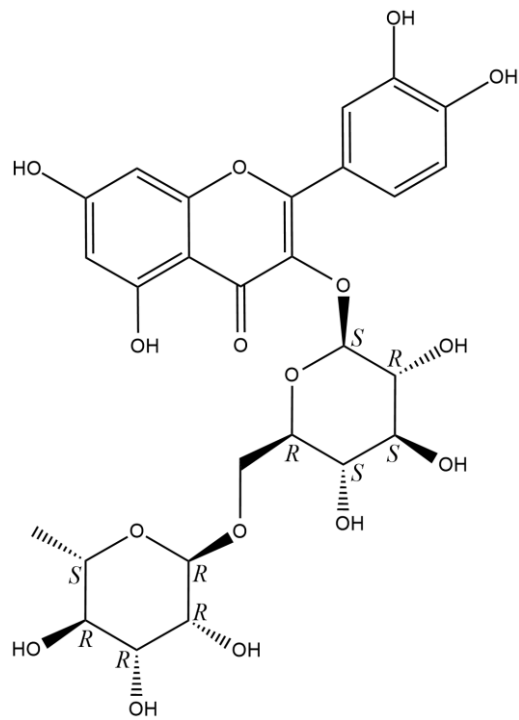
(7)



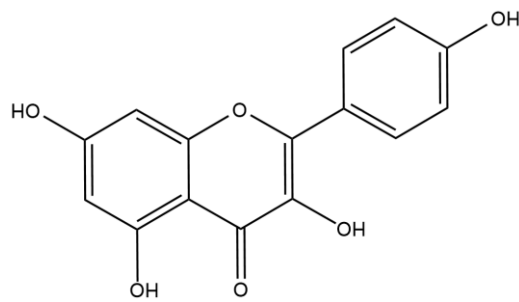
(8)



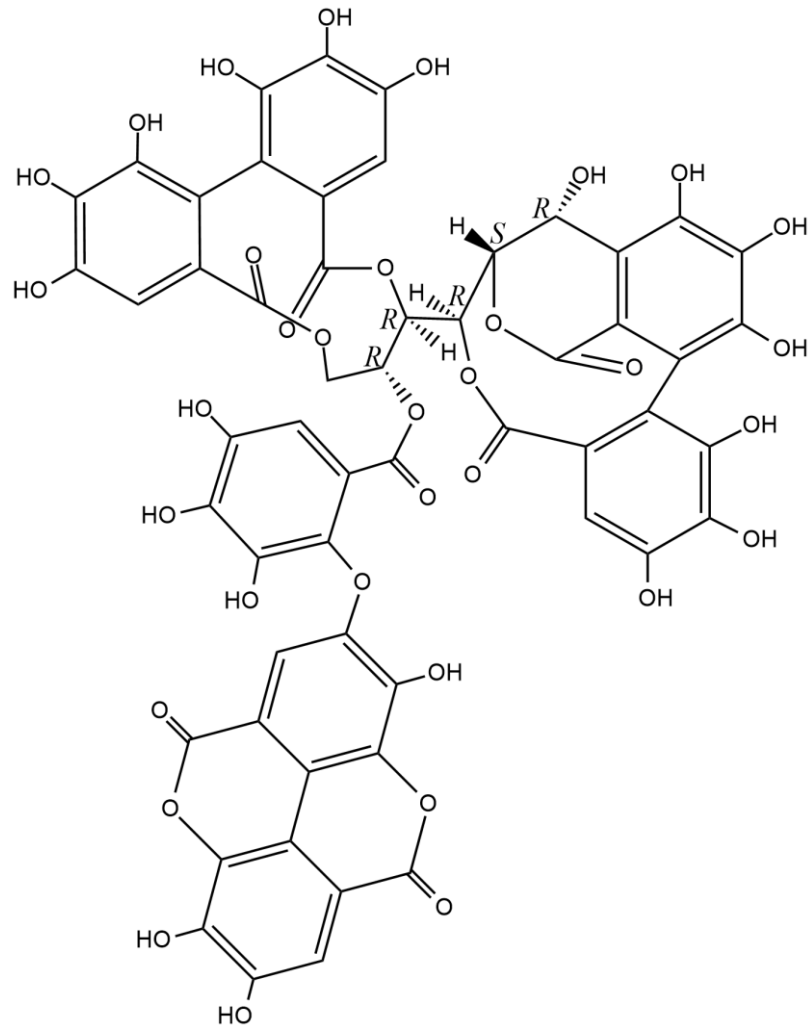
(9)



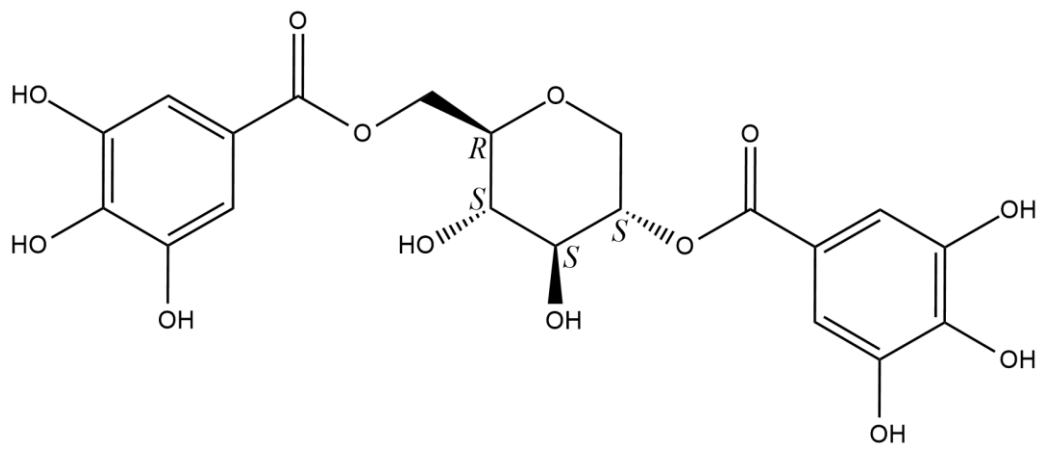
(10)



(11)



(12)



(13)

3.5 ESPÉCIES VEGETAIS SELECIONADAS PARA ESTUDO

3.5.1 *Caryocar brasiliense*

Caryocar brasiliense Cambess (Caryocaraceae) é uma espécie arbórea cujo fruto é popularmente conhecido como pequiá, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo-pequi, amêndoa-do-brasil e pequi, sendo esta última a denominação mais comumente utilizada (Silva et al., 2012).

A árvore do pequi é frondosa, esgalhada, de altura variável, podendo ultrapassar 10 metros. A espécie é comum nos cerrados brasileiros, ocorrendo na Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (Melo Jr et al., 2004).

O pequi é uma fruta verde esférica, que apresenta quatro segmentos. Sua estrutura é composta pelo epicarpo (muito fino e esverdeado), mesocarpo externo (polpa branca com coloração pardo acinzentada), mesocarpo interno (muita polpa, cor amarelo-clara, rica em óleo, vitaminas e proteínas), que envolve uma camada fina e rígida de endocarpo espinhoso (cerca de 2-5 mm de largura), e uma semente branca (Damiani, 2006).

Na medicina popular, o fruto é empregado para tratar gripes e resfriados; a gordura da semente é utilizada no tratamento de doenças do trato respiratório, tais como asma e bronquite, enquanto o decocto das folhas e flores é usado como afrodisíaco, para aumentar a energia e no tratamento de doenças do fígado. As cascas da árvore e dos frutos também são utilizadas como antitérmicos e diuréticos (de Paula et al., 2000).

O óleo extraído dos frutos (mesocarpo interno) de *C. brasiliense* possui várias atividades biológicas relatadas, incluindo atividade antifúngica (Passos et al., 2002), contra *Trypanosoma cruzi* (Herzog-Soares et al., 2002) e contra *Biomphalaria glabrata* (Bezerra et al., 2002). Além disso, o óleo demonstrou ser um efetivo agente antioxidante (Paula-Junior et al., 2006).

O extrato etanólico das cascas do fruto (epicarpo e mesocarpo externo) foi avaliado quanto ao seu potencial biológico, sendo comprovada a atividade antioxidante, antimicrobiana e alelopática (Ascari et al., 2010). Em outro estudo, extratos aquosos e hidroetanólicos do epicarpo foram avaliados quanto à sua capacidade de captação de radicais livres empregando o método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e sistema β -caroteno/ácido linoléico, os quais demonstraram sua alta atividade antioxidante (Monteiro et al., 2015).

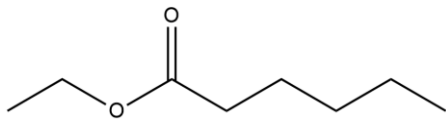
O extrato hidroetanólico de folhas de *C. brasiliense* apresentou efeito leishmanicida sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e atividade bactericida contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus*.

Além disso, o extrato provou ter relevante capacidade antioxidante, similar às atividades da vitamina C e da rutina (Paula-Junior et al., 2006). Em outros estudos, extratos hidroalcoólicos de folhas de *C. brasiliense* demonstraram atividade citotóxica contra o sarcoma 180 (Oliveira et al., 1968), atividade moluscicida (Lopes et al., 2011) e atividade vasodilatadora em aorta torácica de ratos (Oliveira et al., 2012).

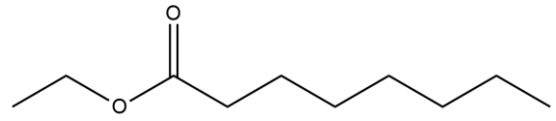
A análise fitoquímica do mesocarpo interno (polpa amarela) de *C. brasiliense* indicou a presença de hidrocarbonetos, ácidos graxos e terpenóides no óleo essencial, sendo que os ésteres de ácidos graxos são as substâncias predominantes nesta fração (Geócze et al., 2013). Importante salientar que o sabor da polpa amarela do pequi é decorrente da combinação das moléculas voláteis presentes em seu óleo essencial. Os ésteres hexanoato de etila (14), octanoato de etila (15) e o monoterpene acíclico β -ocimeno (16) são os principais componentes do óleo. O ácido hexanóico (17) também foi identificado no óleo essencial do pequi, sendo que sua presença confere um ligeiro sabor de queijo ao característico aroma de fruta do pequi (Geócze et al., 2013).

Estudos sobre a composição fitoquímica do epicarpo (fino e esverdeado) e mesocarpo externo (polpa branca) dos frutos de *C. brasiliense* indicam um alto teor de polifenóis e menores concentrações de beta-caroteno (Monteiro et al., 2015). Galato de etila (18), hidroximetilfurfural (19), ácido gálico (20), chiquimato de metila (21) e ácido oléico (22) foram detectados em frações cromatográficas do extrato etanólico da casca e polpa branca do pequi, através de análises por ressonância magnética nuclear (RMN) (Ascari et al., 2010). Também foram encontrados, no extrato etanólico da casca do pequi, ácido gálico (20), ácido quínico (23) e quercetina-3-*O*-arabinose (24), os quais são responsáveis pela atividade captadora de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica (Roesler et al., 2008).

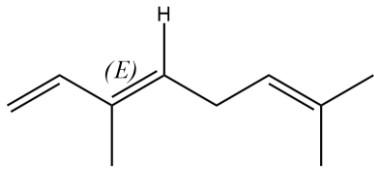
Em uma triagem realizada por nosso grupo de pesquisa para identificar espécies vegetais com potencial atividade anti-inflamatória, os extratos etanólicos de folhas e cascas do fruto (epicarpo e mesocarpo externo) de *C. brasiliense* inibiram, de forma concentração dependente, a produção de TNF- α por células THP-1 estimuladas por LPS (Gusman et al., 2015). Extratos etanólicos de folhas e cascas do fruto de *C. brasiliense* foram avaliados preliminarmente por nosso grupo de pesquisa em modelos *in vitro* relacionados à diabetes. Ambos os extratos induziram um aumento significativo na utilização de glicose por células de fígado Chang ($282,2 \pm 3,4\%$ e $138,0 \pm 7,0\%$, respectivamente) e o extrato das cascas do fruto também induziu um aumento expressivo na utilização de glicose por mioblastos L6 ($201,2 \pm 7,9\%$) (Caldeira et al., 2021). Esses resultados indicam a espécie como uma fonte de substâncias bioativas com potencial atividade antidiabética.



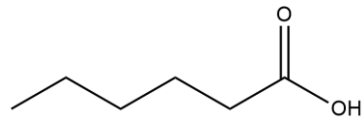
(14)



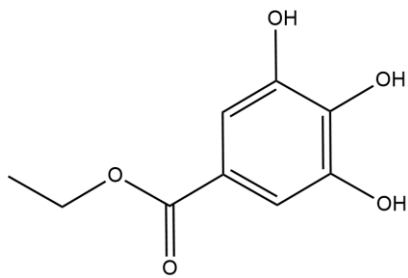
(15)



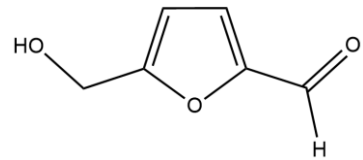
(16)



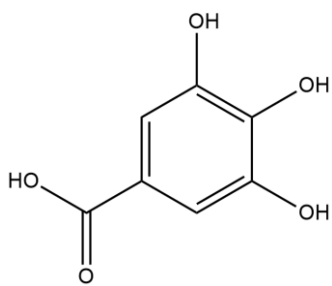
(17)



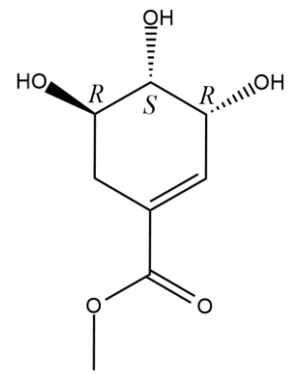
(18)



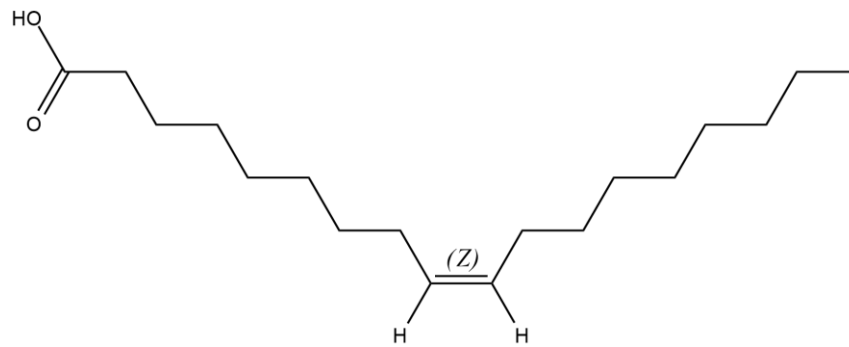
(19)



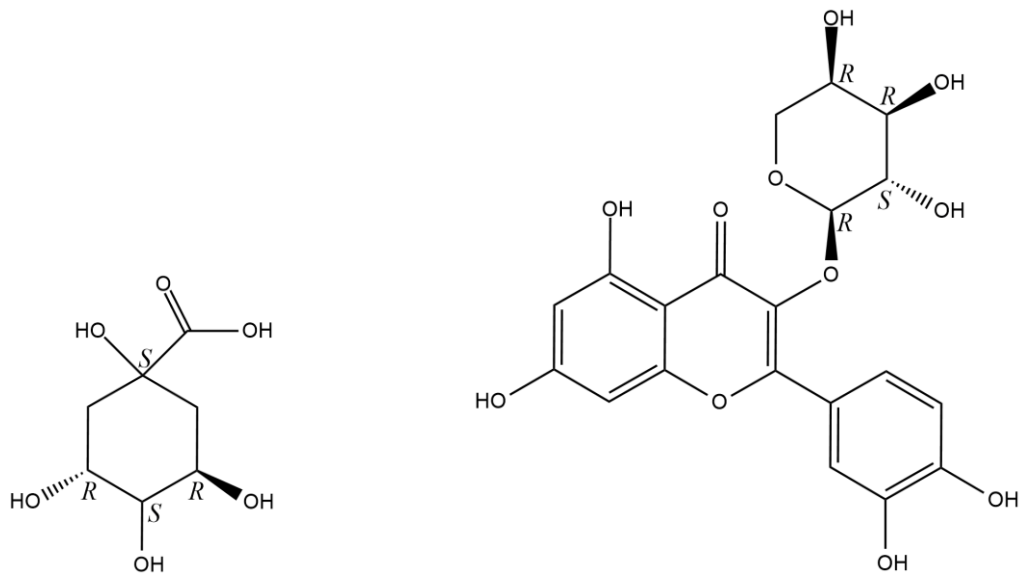
(20)



(21)



(22)



(23)

(24)

3.5.2 *Leea rubra*

Leea rubra Blume ex Spreng. (Vitaceae), conhecida popularmente como léia-rubra, léia-vermelha, café-de-salão e cafezinho, é uma espécie semi-herbácea, de 2,0-2,5 m de altura, com folhagem arroxeadada, nativa da Índia, Burma e Malásia. Suas folhas são bronzeadas, escuras, compostas e divididas em folíolos lanceolados. Possui inflorescências densas quase escondidas entre as folhas, com numerosas flores vermelhas em botão e róseas quando abertas (Lorenzi & Souza, 2001). A espécie tem uso ornamental, com cultivo bastante frequente no país (Moura & Andrade, 2007).

As raízes e caules de *L. rubra* são empregadas na medicina popular da Tailândia como anti-hemorroidal, antipirética, anti-inflamatória e analgésica (Kadchumsang, 2008).

Em um estudo conduzido com extratos etanólicos das cascas e caules, foi demonstrado que *L. rubra* possui maior atividade captadora de radicais livres que outras plantas medicinais da região de Lanna, na Tailândia (Saenjum et al., 2007). Em outro estudo, extratos do caule obtidos com acetato de etila, álcool etílico e água foram testados quanto à atividade anti-inflamatória e antioxidante. Todos os extratos demonstraram potencial anti-inflamatório, enquanto apenas os extratos etanólico e aquoso apresentaram forte atividade antioxidante quando avaliados pelos métodos de inibição do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e do óxido nítrico, respectivamente (Kadchumsang, 2008).

Triagens fitoquímicas de folhas de *L. rubra* indicaram resultados positivos para alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides, triterpenos e glicosídeos em extratos obtidos com acetato de etila e etanol, enquanto saponinas foram encontradas apenas no extrato etanólico. A quantificação espectrofotométrica de fenóis totais indicou elevada concentração de substâncias dessa classe, expressas como quercetina ($663,59 \pm 3,62$ mg de quercetina/g de extrato), o que explicaria o potencial antioxidante da espécie (Chattiranan et al., 2012).

A potencial atividade anti-hipertensiva da espécie foi avaliada em ensaio *in vitro* de inibição da enzima conversora de angiotensina-2 (ECA). Neste estudo, o extrato hidroetanólico das partes aéreas de *L. rubra*, ensaiado na concentração de 0,10 mg/mL, inibiu a ECA em $57,0 \pm 12,5\%$ (Braga et al., 2007). A potencial atividade antidiabética do extrato etanólico de folhas da espécie foi demonstrada em uma avaliação preliminar de nosso grupo de pesquisa, na qual a espécie inibiu significativamente as enzimas α -glicosidase ($95,3 \pm 0,1\%$) e α -amilase ($69,9 \pm 1,0\%$) em ensaios *in vitro* (resultados não publicados).

4. EXPERIMENTAL

4.1 EQUIPAMENTOS, SOLVENTES, REAGENTES, MATERIAIS DE CONSUMO, VIDRARIAS E MATERIAIS DIVERSOS

4.1.1 Equipamentos

- Agitador de tubos Thermolyne, modelo 16700.
- Agitador orbital New Brunswick, modelo Innova 2100.
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB204.
- Balança analítica Sartorius, modelo BP 211D.
- Balança semianalítica Núcleo, modelo NC 1000.
- Balança semianalítica Sartorius, modelo BP 3100 S.
- Banho-maria Fanem, modelo 146.
- Banho-maria Precision Scientific, modelo 385.
- Banho de ultrassom Altsonic, modelo Clean.
- Banho de ultrassom Unique, modelo USC 1400.
- Bomba peristáltica de bancada Watson Marlow, modelo 120S.
- Capela de fluxo laminar vertical Veco, modelo BioProtector 09.
- Capela de fluxo laminar vertical Veco, modelo BioProtector 12.
- Centrífuga Quimis, modelo Q222TM.
- Coletor de frações digital Gilson, modelo FC 203B.
- Concentrador a vácuo Thermo Savant, modelo SC250.
- Estufa de CO₂ Thermo Scientific Forma, modelo 3111.
- Estufa de cultura Fanem, modelo 502 A.
- Estufa de secagem com renovação de ar, Fanem.
- Estufa de secagem por convecção natural Fanem, modelo 515.
- Evaporador rotatório Buchi, modelo R-114.
- Glicosímetro Accu-CheK Active®, Roche.
- Lavador de microplacas Bio-Rad, modelo ImmunoWash 1575.
- Leitor de microplacas Tecan, modelo Infinite M200, com software i-control para processamento de dados.
- Liofilizador de bancada Liotop, modelo L101.
- Medidor de pH Digimed, modelo DM-22.
- Medidor de pH Metrohm, modelo 827 pH lab.

- Micropipeta automática monocanal de 20-200 μL , Brand, modelo Transferpette electronic.
- Micropipeta automática multicanal de 10-200 μL , Brand, modelo Transferpette electronic.
- Micropipeta automática multicanal de 20-300 μL , Eppendorf.
- Micropipeta manual multicanal de 20-300 μL , Eppendorf.
- Micropipetas manuais monocanais de 0,5-10 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , 1000-5000 μL , Eppendorf.
- Microscópio Olympus, modelo CKX41.
- Moinho de facas.
- Percolador em aço inox 304, com tampa e disco perfurado, capacidade para 3 litros.
- Pipetador automático Drummond, modelo Pipet Aid XP.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica Waters, modelo Alliance, equipado com injetor automático 2695, detector de arranjo de diodos (DAD) 2996 e software Empower para processamento dos dados.
- Sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) em escala preparativa Waters, equipado com sistema de bomba binária 1525, injetor automático 2707, detector no ultravioleta (UV) 2489, coletor automático de frações WFC III e software Empower para processamento dos dados.
- Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) Waters, modelo Acquity M-Class, equipado com injetor automático, detector de arranjo de diodos (DAD) 2996, espectrômetro de massas triplo quadrupolo Waters, modelo TQD, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e software MassLynx para processamento de dados.
- Sistema de purificação de água Tipo 1 (ultrapura) Millipore, modelo Direct-Q 3.
- Soprador térmico serigráfico Skil, modelo 8003 1800W.
- Ultra centrífuga Hermle LaborTechnik GmbH, modelo Z 323 K.
- Ultra freezer a -80°C , Liobrás.

4.1.2 Solventes, reagentes e materiais de consumo

- Acarbose ($\geq 95\%$), Sigma-Aldrich.
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA) P.A., Sigma-Aldrich.
- Acetato de etila grau P.A., Vetec.
- Acetona grau P.A., Vetec.
- Acetonitrila grau CLAE, Tedia.
- Ácido acético glacial grau P.A., Neon.

- Ácido cítrico grau P.A., Synth.
- Ácido clorídrico grau P.A., Alphatec.
- Ácido clorídrico grau P.A., Vetec.
- Ácido fórmico grau CLAE, Sigma-Aldrich.
- Ácido fosfórico grau CLAE, Merck.
- Ácido sulfúrico grau P.A., Isofar.
- Agulha hipodérmica estéril 25 × 7, Med Goldman.
- Albumina de soro bovino (BSA), Sigma.
- α -amilase de pâncreas porcino, Sigma.
- α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma.
- Amido solúvel P.A., Synth.
- Anisaldeído grau P.A., Vetec.
- Bicarbonato de sódio P.A., LS Chemicals.
- Brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT), Sigma Aldrich.
- Carbonato de sódio P.A., Synth.
- Citrato de amônio P.A., Synth.
- Cloreto de alumínio anidro grau P.A., Merck.
- Cloreto de sódio P.A., Synth.
- Coluna analítica para CLAE LiChrospher 100, RP-18, com partículas de 5 μ m, 250 × 4 mm d.i., Merck.
- Coluna analítica para CLUE Acquity UPLC HSS, C-18, com partículas de 1,8 μ m, 50 × 2,1 mm d.i., Waters.
- Coluna preparativa para CLAE Prep-C18 Zorbax, com partículas de 10 μ m, 250 × 21,2 mm d.i., Agilent.
- Coluna preparativa para CLAE C-18 X-Bridge, com partículas de 5 μ m, 150 × 19 mm d.i., Waters.
- Cromatofolhas (Al) de sílica gel 60, Merck.
- Dexametasona, Sigma.
- Diclorometano grau P.A., Neon.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) grau P.A., Sigma-Aldrich.
- Etanol Absoluto grau P.A., LS Chemicals.
- Etanol Absoluto grau P.A., Neon.

- Etanol 96° GL, Emfal.
- Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA - *Phorbol 12-myristate 13-acetate*), Sigma.
- Fosfato de sódio dibásico anidro P.A., Merck.
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A., Merck.
- Frutose P.A., Synth.
- Garrafas para cultura celular com tampa com filtro, não tratados, de 25 cm² e 75 cm², Corning.
- Glutationa reduzida ($\geq 98\%$), Sigma-Aldrich.
- Hidróxido de sódio P.A., Alphatec.
- Kit ELISA IL-1 β humano, DY201 Duo Set, R&D Systems.
- Kit ELISA MCP-1 humano, DY279 Duo Set, R&D Systems.
- Kit ELISA TNF- α humano, DY210 Duo Set, R&D Systems.
- Kit para quantificação de ácido úrico, INMESCO.
- Kit para quantificação de alanina aminotransferase, INMESCO.
- Kit para quantificação de aspartato aminotransferase, INMESCO.
- Kit para quantificação de colesterol total, INMESCO.
- Kit para quantificação de glicose sanguínea, INMESCO.
- Kit para quantificação de hemoglobina glicada, INMESCO.
- Kit para quantificação de triglicerídeos, INMESCO.
- Lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, Sigma.
- Meio de cultura RPMI-1640, R4130, Sigma.
- Metanol grau CLAE, Merck.
- Metanol grau P.A., Neon.
- Metformina (cloridrato), Supelco.
- Microplaca de 96 poços para cultivo celular, CellStar 655180, Greiner-Bio-One.
- Microplaca de 96 poços para imunoenensaio, Nunc F, MaxiSorp, Invitrogen.
- N-butanol grau P.A., Synth.
- N-hexano grau P.A., Neon.
- Nicotinamida ($\geq 99,5\%$), Sigma-Aldrich.
- O-fenilenodiamina (OPD), Aldrich.
- Pastilhas de tampão fosfato salino, Sigma.
- Peróxido de hidrogênio P.A., Synth.

- Pipetas sorológicas descartáveis, estéreis, de 5 mL, 10 mL e 25 mL, Sarstedt.
- P-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG)
- Ração padrão para ratos e camundongos, Labina Presence.
- Sephadex LH-20, Sigma.
- Seringa estéril para insulina descartável de 1 mL, SR.
- Sílica gel para cromatografia em camada delgada com indicador de fluorescência UV 254, Macherey-Nagel.
- Sistema de filtração esterilizante, descartável, membrana de 0,22 μ m, capacidade para 500 mL e 1000 mL, Corning.
- Soro fetal bovino (SFB) estéril, Gibco, Invitrogen.
- Estreptozotocina ($\geq 98\%$), Sigma.
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado P.A., Synth.
- Tolueno grau P.A., Vetec.
- Tubos de plástico tipo *safe-lock* de 2 mL, MDI.
- Tubos de ensaio de 12 \times 75 mm, em polipropileno, de 5 mL
- Tubos para centrífuga tipo Falcon, estéreis, em polipropileno, de 15 mL e 50 mL, Corning.
- Tubos para centrífuga tipo Falcon, estéreis, em polipropileno, de 15 mL e 50 mL, Sarstedt.
- Tween 20, Synth.
- Unidade filtrante com membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,22 e 0,45 μ m, Corning.
- Vanilina P.A., Isofar.

4.1.3 Vidrarias e materiais diversos

- Béqueres, provetas, e balões de fundo redondo de diferentes tamanhos.
- Borrifador de vidro.
- Câmara de *Neubauer*, Labor Optik.
- Coluna cromatográfica de vidro de 73 cm \times 3,5 cm d.i.
- Contador manual de células, Milky Way.
- Cromatoplasmas de vidro de 5 \times 10 cm e 10 \times 10 cm.
- Cubas cromatográficas de vidro, Pyrex.
- Dessecador de vidro com saída a vácuo, Pyrex.
- Erlenmeyers e funis de separação de diferentes tamanhos.
- Frascos de cintilação de vidro, com tampa, de 20 mL, Sigma Aldrich.

- Lamínulas para câmara de Neubauer.
- Pipeta de Pasteur de vidro.
- Vials de vidro de 2 mL com tampas e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de CLAE e CLUE-MS, Analítica.

4.2 ELUENTES PARA CCD

Os eluentes a seguir foram preparados de acordo com Wagner et al. (1996) com adaptações.

4.2.1 Eluente tolueno/acetona/metanol (10:4:2)

O eluente foi preparado pela adição de 100 mL de tolueno grau P.A., 40 mL de acetona grau P.A. e 20 mL de metanol grau P.A. em Erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente a solução foi homogeneizada e transferida para uma cuba cromatográfica de vidro para CCD.

4.2.2 Eluente tolueno/acetona/metanol (7:4:3)

O eluente foi preparado pela adição de 70 mL de tolueno grau P.A., 40 mL de acetona grau P.A. e 30 mL de metanol grau P.A. em Erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente a solução foi homogeneizada e transferida para uma cuba cromatográfica de vidro para CCD.

4.2.3 Eluente tolueno/acetona/metanol (7:4:5)

O eluente foi preparado pela adição de 70 mL de tolueno grau P.A., 40 mL de acetona grau P.A. e 50 mL de metanol grau P.A. em Erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente a solução foi homogeneizada e transferida para uma cuba cromatográfica de vidro para CCD.

4.2.4 Eluente n-butanol/ácido acético/água (40:15:60)

O eluente foi preparado pela adição de 40 mL de n-butanol grau P.A., 15 mL de ácido acético grau P.A. e 60 mL de água purificada grau 1 em funil de separação de 250 mL com tampa. Posteriormente a solução foi homogeneizada e a fase superior transferida para uma cuba cromatográfica de vidro para CCD.

4.3 REVELADORES PARA CCD

Os reveladores a seguir foram preparados de acordo com Wagner et al. (1996) seguindo as instruções descritas na seção “Appendix A: Spray Reagents”.

4.3.1 Reagente vanilina-ácido sulfúrico

A solução de ácido sulfúrico foi preparada pela adição de 10,0 mL de H₂SO₄ grau P.A. a 100 mL de etanol grau P.A. A solução foi armazenada, até o momento do uso, à 20 °C. Para a solução de vanilina dissolveu-se 1,0 g de vanilina grau P.A. em 100 mL de etanol grau P.A. A solução foi armazenada, até o momento do uso, à 20 °C. As duas soluções foram misturadas na proporção 1:1 no momento do uso.

4.3.2 Reagente anisaldeído-ácido sulfúrico

A solução de anisaldeído foi preparada pela mistura de 0,5 mL de anisaldeído grau P.A., 10 mL de ácido acético glacial grau P.A., 85 mL de metanol grau P.A. e 5 mL de ácido sulfúrico grau P.A. nesta ordem, sob resfriamento. A solução foi armazenada, até o momento do uso, à 20 °C.

4.3.3 Solução de cloreto de alumínio

Dissolveu-se 1 g de cloreto de alumínio anidro grau P.A. em 100 mL de etanol absoluto grau P.A., sob resfriamento. A solução foi armazenada, até o momento do uso, à 20 °C.

4.4 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As espécies vegetais utilizadas nesse trabalho foram adquiridas ou coletadas em diferentes localidades (Quadro 3). As espécies foram identificadas por botânicos do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) e do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os dados relativos à aquisição, coleta e identificação estão dispostos no Quadro 3. Após a aquisição ou coleta, o material foi lavado em água corrente, disposto em bandejas de aço inox e seco em estufa com ventilação forçada de ar à temperatura máxima de 40 °C por, no mínimo, 72 horas.

Quadro 3 – Dados de aquisição ou coleta das plantas selecionadas para estudo.

Espécie vegetal	Parte	Família	Localização	Exsicata
<i>Caryocar brasiliense</i>	Folhas	Caryocaraceae	Área rural (W 44° 04' 54"; S 16° 30' 93"), Montes Claros, MG, Brasil.	HMC338
<i>Caryocar brasiliense</i>	Cascas (epicarpo e mesocarpo externo) do fruto*	Caryocaraceae	Mercado Central Christo Raeff, R. Mal. Deodoro, 1460 - Centro, Montes Claros, MG, Brasil.	-
<i>Leea rubra</i>	Partes aéreas	Vitaceae	Jardim da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da UFMG, Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil	BHCB188466

*Obs: o termo “cascas do fruto de *C. brasiliense*” deverá ser interpretado como “epicarpo e mesocarpo externo do fruto de *C. brasiliense*” sempre que for mencionado no decorrer deste trabalho

4.5 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS

O material vegetal seco de cada espécie foi pulverizado em moinho de facas e, em seguida, uma porção de 150 g foi submetida à extração por percolação exaustiva com etanol 96° GL, durante sete dias (Quadro 4).

Quadro 4 – Massa seca dos extratos etanólicos brutos e respectivos rendimentos extrativos.

Espécie vegetal	Extrato seco (g)	Extrativos (% m/m)
<i>C. brasiliense</i> (folhas)	67,2	44,7
<i>C. brasiliense</i> (cascas do fruto)	75,4	49,9
<i>L. rubra</i> (partes aéreas)	23,2	15,4

Os extratos etanólicos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório à 50 °C, sob pressão reduzida, até resíduo. Os extratos secos foram mantidos em dessecador, sob vácuo, até completa eliminação do solvente residual.

4.6 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos vegetais secos de cada espécie foram inicialmente fracionados por partição entre solventes imiscíveis. Para tanto, uma porção de cada extrato (2 g) foi solubilizada em 100 mL de solução metanol/água (3:7) e submetida à partição sequencial com 3 porções de 50 mL de n-hexano, diclorometano e acetato de etila (Figura 1).

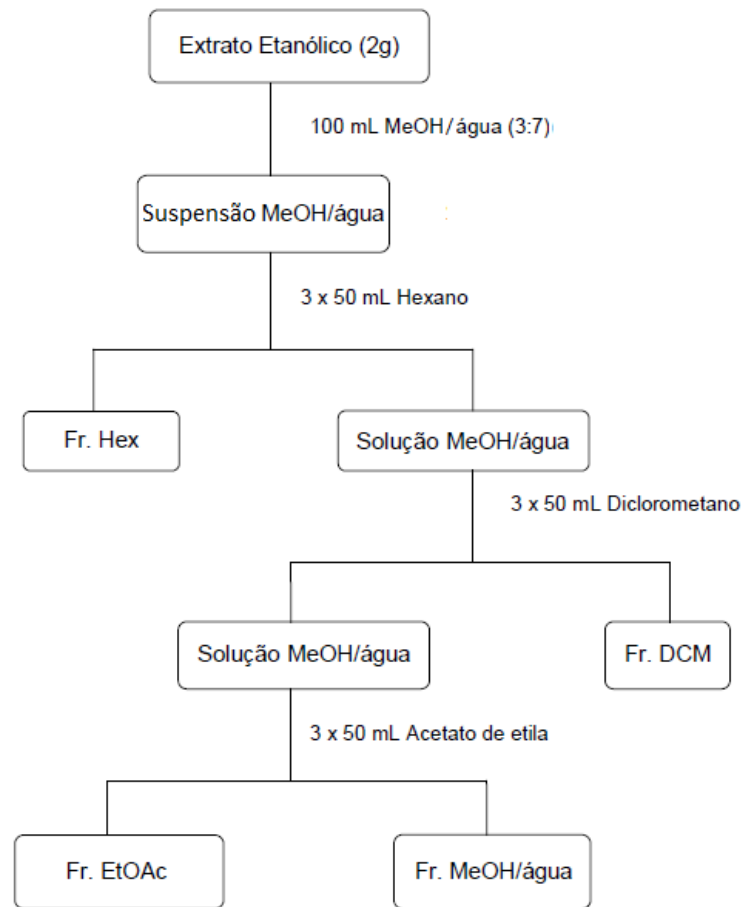


Figura 1 – Fluxograma do fracionamento dos extratos etanólicos por partição sequencial entre solventes imiscíveis. Suspensão MeOH/água, suspensão hidrometanólica; Fr. Hex, fração hexânica; Fr. DCM, fração diclorometânica; Fr. EtOAc, fração em acetato de etila; Fr. MeOH/água, fração hidrometanólica.

Após a remoção dos solventes em evaporador rotatório, à temperatura máxima de 50 °C, foram obtidas as frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e hidrometanólica. As massas e os respectivos rendimentos de cada fração estão dispostos no Quadro 5.

Quadro 5 – Fracionamento preliminar dos extratos secos (2 g cada) por partição entre solventes imiscíveis.

Espécie vegetal	Fração	Massa (mg)	Rendimento (% m/m)
<i>C. brasiliense</i> (folhas)	Hexânica	31,2	1,5
	Diclorometânica	48,8	2,4
	Acetato de etila	440,5	21,8
	Hidrometanólica	1320,5	65,4
<i>C. brasiliense</i> (cascas do fruto)	Hexânica	2,8	0,1
	Diclorometânica	14,5	0,7
	Acetato de etila	278,3	13,3
	Hidrometanólica	1524,2	72,9
<i>L. rubra</i> (partes aéreas)	Hexânica	500,1	24,25
	Diclorometânica	260,3	12,62
	Acetato de etila	438,0	21,24
	Hidrometanólica	521,8	25,30

4.7 ANÁLISE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

4.7.1 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas diretamente em tubos plásticos do tipo *safe lock* e solubilizadas em metanol grau CLAE. Foram empregadas concentrações de 10 mg/mL para os extratos e 5 mg/mL para as frações. Todas as amostras foram solubilizadas com auxílio de banho de ultrassom, durante 15 minutos, e em seguida foram centrifugadas a 10.000 rotações por minuto (rpm) ou $18480 \times g$, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram então transferidos, com auxílio de micropipetador, para vials de vidro com tampa, dos quais 10 μ L foram injetados de forma automática em sistema de CLAE.

4.7.2 Condições cromatográficas

Para obtenção dos perfis cromatográficos, empregou-se coluna Lichrospher 100, RP-18 (5 μ m, 250 \times 4 mm d.i.), detecção no DAD (detector de arranjo de diodos), com varredura de 200-400 nm, fluxo de 1 mL/min e temperatura de 40 °C. Foi utilizada eluição em gradiente de acetonitrila grau CLAE e água purificada grau 1, sendo ambos solventes acidificados com 0,1% v/v de ácido fosfórico (H₃PO₄) grau CLAE (Quadro 6). Foi inserido um intervalo de 15 minutos entre cada injeção, para reequilibrar a coluna. O ar dos solventes foi retirado por meio da ativação da função *degasser* do equipamento.

Quadro 6 – Gradiente de eluição empregado para obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE.

Tempo (min)	*Água (%)	*Acetonitrila (%)
0	95	5
60	5	95
65	05	95
70	95	5

* Os eluentes contêm 0,1% H₃PO₄

4.8 FRACIONAMENTO DO EXTRATO DE CASCAS DO FRUTO DE *C. brasiliense*

4.8.1 Esquema geral do fracionamento realizado

O esquema geral do fracionamento do extrato etanólico de cascas dos frutos de *C. brasiliense* está representado no fluxograma da figura 2. A descrição detalhada do fracionamento encontra-se no item 4.8.1.1. O extrato etanólico dessa espécie foi obtido por

meio de percolação exaustiva durante sete dias, conforme descrito no item 4.5. Foram obtidos cerca de 70 g de material. Destes foram empregados 2 g no fracionamento.

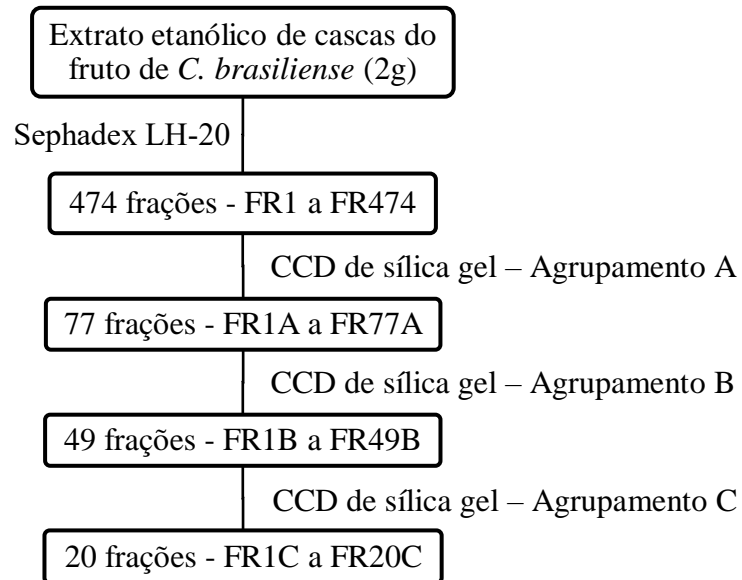


Figura 2 – Esquema geral do fracionamento do extrato etanólico das cascas do fruto de *C. brasiliense*.

4.8.1.1 Fracionamento em coluna de Sephadex-LH-20

Uma porção (2 g) do extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* foi suspensa em 10 mL de etanol 96° GL. Em seguida, a amostra foi colocada em banho de ultrassom por 20 minutos e centrifugada à 4000 RPM ($2509 \times g$) por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido, com auxílio de micropipetador, para frasco de cintilação identificado e tarado, previamente à aplicação na coluna. A solução resultante (10 mL de extrato na concentração de 0,198 g/mL) foi aplicada no topo de coluna aberta de Sephadex® LH-20 (730 mm \times 35 mm d.i.). Procedeu-se, então, à eluição com gradiente adaptado de Campana (2008), a uma vazão de 2 mL/min, sendo recolhidas frações de 25 mL. Após análise por CCD de sílica gel empregando-se como eluente tolueno/acetona/metanol (7:4:3) e como revelador vanilina-ácido sulfúrico, as 474 frações obtidas foram agrupadas segundo semelhança de seus perfis, gerando inicialmente 77 grupos de frações reunidas (agrupamento A). As frações FR1A a FR10A, que apresentaram manchas com altos valores de fator de retenção (R_f), ou seja, de menor polaridade, foram eluídas com tolueno/acetona/metanol (10:4:2) e reveladas com reagente vanilina-ácido sulfúrico, sendo obtida uma separação com boa resolução entre elas. Da fração FR11A em diante observou-se a presença de compostos polares bem retidos na base da cromatoplaça e desta forma utilizou-se como eluente tolueno/acetona/metanol (7:4:5). Desta forma, após análise por CCD de sílica gel empregando-se o eluente tolueno/acetona/metanol na

proporção de 10:4:2 para as frações FR1A-FR6A e na proporção de 7:4:5 para as frações FR7A-FR77A, e como revelador reagente vanilina-ácido sulfúrico, as 77 frações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos obtidos, gerando 49 grupos de frações reunidas (agrupamento B). As frações FR1B-FR49B foram novamente analisadas com o objetivo de se separar melhor as substâncias de elevada polaridade. Utilizou-se como eluente para as frações mais polares FR11B a FR49B n-butanol/ácido acético/água (40:15:60) (fase superior), e vanilina-ácido sulfúrico como revelador, sendo essas agrupadas de acordo com semelhanças nos seus perfis cromatográficos em CCD de sílica gel originando finalmente as 20 frações do agrupamento C (Tabela 1).

Adicionalmente, as frações FR12C, FR13C, FR15C e FR16C foram selecionadas para análise por CLUE-ESI-MS/MS conforme descrito a seguir na seção 4.10.1. Em virtude dos perfis químicos satisfatórios obtidos, as frações FR15C e FR16C foram avaliadas no teste de tolerância ao amido *in vivo* (item 5.7.1).

Tabela 1 – Fracionamento do extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* em coluna Sephadex-LH20.

Grupo	Eluente	Volume (mL)	Frações	Massa (mg)	Rendimento (% m/m)
FR1C	EtOH	30	1-2	5,6	0,3
FR2C	EtOH	45	3-5	13,1	0,7
FR3C	EtOH	15	6	7,3	0,4
FR4C	EtOH	60	7-10	35,3	1,8
FR5C	EtOH	30	11-12	19,5	1,0
FR6C	EtOH	30	13-14	45,9	2,3
FR7C	EtOH	30	15-16	45,9	2,3
FR8C	EtOH	30	17-18	43,5	2,2
FR9C	EtOH	45	19-21	74,3	3,8
FR10C	EtOH	45	22-24	123,8	6,3
FR11C	EtOH	195	25-38	864,5	43,7
FR12C	EtOH	195	39-52	97,4	4,9
FR13C	EtOH	255	53-70	186,3	9,4
FR14C	EtOH	900	71-131	126,3	6,4
	EtOH	3180	132-344		
	EtOH:Acetona (9:1)	165	345-356		
FR15C	EtOH:Acetona (7:3)	165	357-368	91,2	4,6
	EtOH:Acetona (1:1)	195	369-382		
	EtOH:Acetona (2:8)	165	383-394		
FR16C	EtOH:Acetona (2:8)	1125	395-470	129,0	6,5
FR17C	MeOH:Acetona (1:1)	100	471	14,0	0,7
FR18C	MeOH	100	472	2,6	0,1
FR19C	MeOH:EtOH (1:1)	100	473	1,7	0,1
FR20C	EtOH	100	474	1,5	0,1
TOTAL	-	-	-	1928,7	97,5

4.8.2 Teste de extração das substâncias corilagina e geraniina

Corilagina e geraniina foram identificadas como constituintes principais da fração bioativa FR16C após análise do perfil químico por CLUE-ESI-MS/MS (seção 4.10.1). Visando o isolamento desses constituintes, foram realizados ensaios extrativos para identificar a melhor condição para se obter um extrato enriquecido nesses taninos, a partir da droga vegetal (DVCCB) ou do extrato etanólico (EECCB) de cascas do fruto de *C. brasiliense*. Para tanto, foram pesados cerca de 150 mg de DVCCB ou EECCB para 5 tubos tipo *safe lock*, com o objetivo de avaliar, de maneira preliminar, a eficiência extrativa das substâncias corilagina e geraniina. Em seguida, em cada um dos tubos, foram adicionados, com auxílio de micropipeta, 2 mL de soluções de acetona/água nas seguintes proporções: 1:1, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. Na sequência, os eppendorfs foram colocados em banho de ultrassom por 30 minutos, seguindo-se centrifugação a 10.000 rpm ($18480 \times g$) por 20 minutos. Os sobrenadantes foram então transferidos para frascos de cintilação adequadamente rotulados. O solvente dos frascos foi completamente eliminado até *secura* com auxílio de vácuo e armazenados em dessecador a vácuo.

Foram preparadas, então, soluções metanólicas a 5 mg/mL do extrato etanólico de cascas de *C. brasiliense*; da fração FR16C; e das 10 amostras obtidas no teste extrativo de DVCCB/EECCB supracitado (4.10.1.1). Estas amostras foram então analisadas por CLUE-ESI-MS/MS (itens 4.10.1.2 e 4.10.1.3) com o objetivo de monitorar os íons desprotonados em m/z 633 (corilagina) e m/z 951 (geraniina). As amostras foram injetadas em triplicata. Finalizadas as análises, foi realizado o processamento dos cromatogramas e integração dos picos correspondentes à corilagina e geraniina.

4.9 FRACIONAMENTO DE FR16C POR CLAE EM ESCALA PREPARATIVA

4.9.1 Esquema geral do fracionamento realizado

O esquema geral do fracionamento por CLAE em escala preparativa da fração enriquecida em taninos (FR16C) está representado no fluxograma da figura 3 e descrito em detalhes nos itens 4.9.1.1 e 4.9.1.2. A fração FR16C foi obtida por meio de fracionamentos em coluna de sephadex LH-20 do extrato acetona/água de cascas do fruto de *C. brasiliense*, conforme descrito no item 4.8.1.1. Destes, 35 mg foram empregados em cada fracionamento, sendo que foram realizadas 25 repetições, sendo consumidos 875 mg de FR16C.

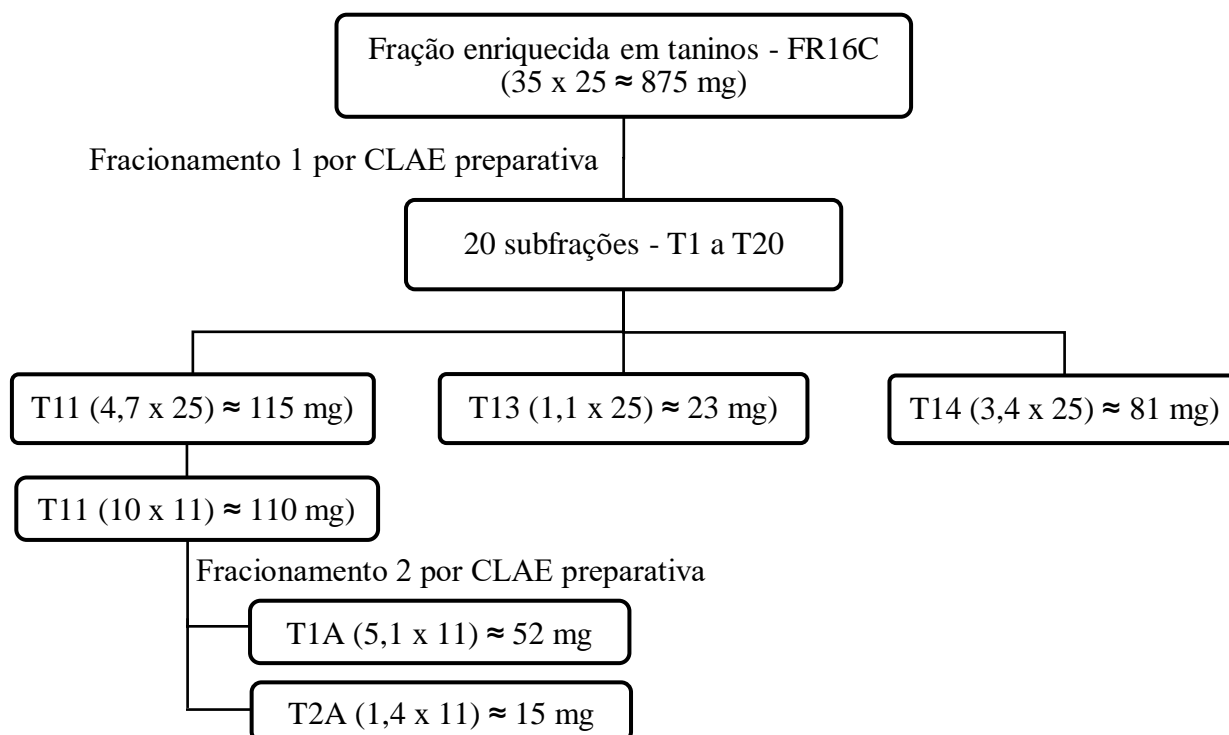


Figura 3 – Esquema geral do fracionamento por CLAE em escala preparativa da fração enriquecida em taninos (FR16C).

4.9.1.1 Fracionamento 1 por CLAE em escala preparativa

A seguir constam as etapas para preparo e fracionamento de uma amostra. Ao todo foram realizadas 25 repetições.

4.9.1.1.1 Preparo das amostras

Foram pesados cerca de 35 mg da fração FR16C para tubos plásticos do tipo *safe lock*, procedendo-se solubilização com 1,5 mL de solução de 90% de água purificada grau 1 e 10% de acetonitrila grau CLAE. As amostras foram solubilizadas com auxílio de banho de ultrassom, durante 10 minutos, e em seguida foram centrifugadas a 10.000 rpm ($18480 \times g$), por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados usando seringa descartável com agulha, e em seguida, transferidos para vials de vidro com tampa. Os volumes totais de cada vial foram injetados de forma automática em sistema de CLAE em escala preparativa Waters.

4.9.1.1.2 Condições cromatográficas

Para o fracionamento 1, empregou-se coluna Agilent Zorbax Prep-C18 (10 μ m, 250 mm \times 21,2 mm d.i.), detecção no UV em 210 e 280 nm, fluxo de 14 mL/min e temperatura ambiente (25 °C). Foi utilizada eluição em gradiente de acetonitrila grau CLAE e água purificada grau 1,

sem adição de ácido na fase móvel (Quadro 7). O ar dos solventes foi retirado por meio da função *degasser* do equipamento.

Quadro 7 – Gradiente de eluição empregado no fracionamento 1 por CLAE em escala preparativa.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
Inicial	95	5
50	76	24
55	5	95
65	5	95
70	95	5

Procedeu-se, então, à coleta das subfrações de forma manual por meio do monitoramento da absorbância dos picos cromatográficos no UV em 210 e 280 nm. As subfrações T1 a T20 foram coletadas em tubos falcon de 50 mL devidamente identificados. As subfrações foram então congeladas à -80 °C e em seguida liofilizadas para remoção completa do solvente aquoso. Ao final do processo foram obtidas as subfrações liofilizadas, as quais foram solubilizadas com auxílio de acetona e transferidas para frascos de cintilação tarados e identificados. As massas das subfrações nos frascos foram então determinadas com auxílio de balança analítica e em seguida foram calculados os rendimentos (Tabela 2).

Tabela 2 – Fracionamento 1 da fração enriquecida em taninos (FR16C) por CLAE em escala preparativa.

Subfração	Tempo de retenção (min)	Massa (mg)	Rendimento (%)
T1	4,97	0,3	1,0
T2	5,22	0,5	1,7
T3	6,24	1,1	3,7
T4	11,30	1,2	4,0
T5	20,05	1,3	4,3
T6	24,16	1,9	6,3
T7	26,00	1,6	5,3
T8	27,30	1,2	4,0
T9	29,10	1,8	6,0
T10	30,80	1,5	5,0
T11	32,10	4,7	15,7
T12	34,70	1,4	4,7
T13	36,60	1,1	3,7
T14	38,10	3,4	11,3
T15	42,70	0,8	2,7
T16	43,80	0,5	1,7
T17	45,70	1,6	5,3
T18	48,30	1,2	4,0
T19	50,30	1,2	4,0
T20	53,90	0,9	3,0
TOTAL	-	31,4	97,3

4.9.1.2 Fracionamento 2 por CLAE em escala preparativa

A seguir constam as etapas para preparo e fracionamento de uma amostra. Ao todo foram realizadas 11 repetições.

4.9.1.2.1 Preparo das amostras

Foram pesados cerca de 10 mg da subfração T11 para tubos plásticos do tipo *safe lock*, os quais foram solubilizados em 1,5 mL de solução diluente composta de 90,5% de água purificada grau 1 e 9,5% de acetonitrila grau CLAE. As amostras foram solubilizadas com auxílio de banho de ultrassom, centrifugadas e tiveram seus sobrenadantes coletados e transferidos para vials de vidro com tampa seguindo as mesmas condições descritas em 4.9.1.1.1. Os volumes totais de cada vial foram injetados de forma automática em sistema de CLAE em escala preparativa Waters.

4.9.1.2.2 Condições cromatográficas

Para o fracionamento 2 por CLAE em escala preparativa, empregou-se coluna Waters C-18 X-Bridge (5 μ m, 150 mm \times 19 mm d.i.), detecção no UV em 210 e 280 nm, fluxo de 18 mL/min e temperatura ambiente (25 °C). Foi utilizada eluição em modo isocrático de acetonitrila:água (9,5:90,5; v/v), sem adição de ácido na fase móvel. O ar dos solventes foi retirado por meio da função *degasser* do equipamento.

Procedeu-se, então, à coleta das subfrações de forma manual por meio do monitoramento da absorbância dos picos cromatográficos no UV em 210 e 280 nm. As subfrações T1A e T2A foram coletadas em tubos falcon de 50 mL devidamente identificados. Em seguida, as subfrações foram congeladas, liofilizadas, solubilizadas e transferidas para frascos de cintilação tarados e identificados, seguindo as mesmas condições descritas em 4.9.1.1.2. As massas das subfrações nos frascos foram então determinadas com auxílio de balança analítica e em seguida foram calculados os rendimentos (Tabela 3).

Tabela 3 – Fracionamento 2 da subfração T11 por CLAE em escala preparativa.

Subfração	Tempo de retenção (min)	Massa (mg)	Rendimento (%)
T1A	10,6	5,1	51,0
T2A	11,8	1,4	14,0
TOTAL	-	6,5	65,0

4.10 ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS

4.10.1 Análises por cromatografia a líquido de ultra-eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLUE-ESI-MS/MS)

Os perfis químicos do extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense*; das frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis (frações diclorometânica, em acetato de etila e hidrometanólica); das frações selecionadas no fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 (FR12C, FR13C, FR15C e FR16C); das amostras obtidas no teste de extração das substâncias corilagina e geraniina em diferentes proporções de acetona/água (1:1, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1); e das subfrações (T11, T13 e T14) e substâncias isoladas (T1A e T2A) provenientes, respectivamente, dos fracionamentos 1 e 2 por CLAE em escala preparativa, foram obtidos por CLUE-ESI-MS/MS.

4.10.1.1 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas diretamente em tubos plásticos do tipo *safe lock* e solubilizadas em metanol grau CLAE. Foram empregadas concentrações de 10 mg/mL para os extratos brutos e frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis. Para o extrato etanólico de cascas de *C. brasiliense*, FR16C e amostras de DVCCB/EECCB obtidas no teste de extração das substâncias corilagina e geraniina foram empregadas concentrações de 5 mg/mL. Para as frações oriundas do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 e subfrações provenientes das separações por CLAE preparativa, foram utilizadas concentrações de 5 mg/mL. As substâncias isoladas foram analisadas a 1 mg/mL. Todas as amostras foram solubilizadas com auxílio de banho de ultrassom, durante 15 minutos e, em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm ($18480 \times g$), por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados usando seringa descartável com agulha e, em seguida, filtrados em unidade filtrante de 0,22 μm PTFE para vials de vidro com tampa, dos quais 4 μL foram injetados de forma automática em sistema de CLUE.

4.10.1.2 Condições cromatográficas

Para obtenção dos perfis cromatográficos, empregou-se coluna Acquity UPLC HSS, C-18 (1,8 μm , $50 \times 2,1$ mm d.i.), detecção no DAD com varredura de 200-500 nm, fluxo de 0,3 mL/min e temperatura de 40 °C. Foi utilizada eluição em gradiente de acetonitrila grau CLAE e água purificada grau 1, sendo ambos solventes acidificados com 0,1% v/v de ácido fórmico grau CLAE (Quadro 8). O ar dos solventes foi retirado por meio da função *degasser* do equipamento.

Quadro 8 – Gradiente de eluição empregado para obtenção dos perfis cromatográficos por CLUE-ESI-MS/MS.

Tempo (minutos)	*Água (%)	*Acetonitrila (%)
Inicial	95	5
10	5	95
11	95	5
13	95	5

* Os eluentes contêm 0,1% HCOOH

4.10.1.3 Parâmetros do espectrômetro de massas

Foi empregado um espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo (TQD, Waters), com ionização por *electrospray*, operando com voltagem no cone de 33 V. A temperatura da fonte foi ajustada em 120 °C, enquanto a temperatura e o fluxo do gás de dessolvatação foram mantidos à 350 °C e 500 L/h, respectivamente. No modo *MS Scan*, foi monitorada uma faixa de massas de 100 a 1500 Daltons com ionização em modo positivo e negativo, para avaliar a intensidade dos picos dos íons desprotonados ou protonados obtidos após análise dos extratos e frações. No modo *Daughter Scan*, adotou-se uma faixa de massas variável (de acordo com a massa do íon precursor fragmentado), no modo de ionização negativo e energia de colisão com rampa de 5 a 75 V. O modo de ionização negativo foi selecionado por apresentar íons precursores desprotonados com intensidades significativas, favorecendo desta forma suas fragmentações.

4.10.2 Análises por ressonância magnética nuclear (RMN)

A caracterização estrutural das substâncias isoladas T1A e T2A foi realizada a partir de análises dos espectros de RMN de ^1H (600 e 400 MHz) e de ^{13}C (150 e 100 MHz) e subespectros DEPT-135 (150 e 100 MHz), bem como dos experimentos bidimensionais COSY, HSQC, HMQC e HMBC. As análises foram realizadas no Departamento de Química, ICEX, UFMG, em espectrômetros de RMN da marca Bruker, modelos Ascend™ 600 e 400 MHz, a 25°C, empregando o tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Utilizou-se acetona deuterada (CD_3COCD_3) para solubilização das amostras. Os experimentos foram executados por meio de colaboração com o Prof. Dr. José Dias de Souza Filho.

4.11 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

4.11.1 Avaliação do efeito de extratos e frações sobre a liberação de IL-1 β , TNF- α e MCP-1

O preparo do meio RPMI incompleto (4.11.1.1) e cultivo das células THP-1 (4.11.1.2) foram realizados de acordo com Gusman et al. (2015) e Tunes et al. (2015).

4.11.1.1 Preparo de meio RPMI incompleto

O conteúdo do frasco contendo meio RPMI 1640 foi solubilizado em 1L de água purificada tipo 1 e, em seguida, foram adicionados 2 g de bicarbonato de sódio grau P.A. O pH da solução foi medido com auxílio de um medidor de pH e ajustado, com solução de hidróxido de sódio 5M ou ácido clorídrico 5M, para valor na faixa de 7,2 a 7,4. A solução foi então filtrada a vácuo, utilizando sistema de filtro de 0,22 μm estéril, em capela de fluxo laminar previamente esterilizada. Após preparo, o meio RPMI incompleto foi armazenado sob refrigeração (2 a 8 $^{\circ}\text{C}$), sendo apenas suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado no momento do uso.

4.11.1.2 Cultivo de células THP-1

Células THP-1 (linhagem celular humana de leucemia monocítica aguda, ATCC TIB-202) foram cultivadas no laboratório de fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG. As células foram mantidas em suspensão em garrafas de cultura de 75 cm^2 contendo meio RPMI suplementado com 10% de SFB inativado e foram incubadas em estufa à 37 $^{\circ}\text{C}$, em atmosfera de 5% de CO_2 . O repique celular foi realizado duas vezes por semana. A suspensão de células foi transferida da garrafa de cultura para tubo de 50 mL e centrifugada a 399 $\times g$ por 5 minutos à temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 10 mL de meio RPMI com 10% de SFB e contadas em câmara de *Neubauer*. Um volume adequado de suspensão celular, determinado pelos cálculos, foi transferido para garrafa de cultivo contendo 20 mL de meio RPMI com 10% de SFB a uma concentração final de 5×10^5 células/mL.

4.11.1.3 Ensaio do MTT para avaliação da viabilidade celular

Os ensaios foram realizados de acordo com Campling et al. (1988). A uma microplaca para cultivo celular de 96 poços foram adicionados 200 μL da suspensão de células THP-1 na densidade de 1×10^6 células/poço contendo 0,005% de PMA. A microplaca foi incubada em estufa com 5% de CO_2 à 37 $^{\circ}\text{C}$, por 72 horas. Neste intervalo de tempo foi observada a adesão dos macrófagos à superfície dos poços da microplaca. Após 72 horas o meio RPMI a 10% foi retirado da microplaca, com auxílio de micropipeta multicanal manual, com o devido cuidado para não danificar a monocamada de células aderidas, e então foram adicionados 100 μL de

meio RPMI a 2%. Em seguida, foi realizada a diluição das frações e extratos em meio RPMI completo contendo 0,1% de DMSO. Foram então adicionados 100 µL das amostras a serem testadas nas concentrações de 62,5; 125 e 250 µg/mL (*C. brasiliense*) ou 10,0; 30,0 e 90,0 µg/mL (*L. rubra*). Após a adição das amostras, a microplaca foi retornada à estufa e incubada por 3 horas. Após esse período, foram adicionados 20 µL de LPS diluído em meio RPMI completo e a microplaca foi novamente incubada *overnight*. Após incubação, foram transferidos 120 µL do sobrenadante para outra microplaca para posterior quantificação de IL-1β, TNF-α e MCP-1 por ELISA, conforme protocolo descrito no item 4.11.1.4, e a microplaca contendo as células aderidas foi utilizada para avaliação da viabilidade celular.

Após a transferência do sobrenadante, foram adicionados à microplaca contendo as células aderidas, 28 µL de uma solução de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT) na concentração de 2 mg/mL em solução de tampão fosfato (PBS). A microplaca foi incubada por 1 hora e 30 minutos à 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de incubação, adicionou-se 130 µL de DMSO em todos os 96 poços da microplaca. Com auxílio de micropipeta automática, o conteúdo de todos os poços foi homogeneizado até solubilizar os cristais de formazana formados. A absorbância foi medida em 510 nm em leitor de microplacas. Foram realizados o controle de células (CC) por meio da adição de meio RPMI e LPS; controle de solvente por meio da adição de meio RPMI contendo DMSO a 0,1% e LPS; controle de extrato (CE) por meio da adição de amostra na maior concentração testada (90 ou 250 µg/mL) em meio RPMI sem LPS; e controle positivo (DX) por meio da adição de dexametasona (0,1 µM) em meio RPMI com LPS. A viabilidade celular foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\left[\frac{(A - B)}{C} - B \right] \times 100$$

Onde, A, B e C são os valores de absorbância dos poços nos quais estão presentes células tratadas com amostras (A), branco (B) e células tratadas com o diluente das amostras (C), respectivamente.

4.11.1.4 Determinação de citocinas por ELISA

As concentrações das citocinas IL-1β, TNF-α e MCP-1 nos sobrenadantes foram quantificadas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Todos os procedimentos foram realizados segundo instruções do fabricante (R&D System), sendo a detecção das

microplacas realizadas em leitor de ELISA (item 4.11.1.4.1) no comprimento de onda de 490 nm.

4.11.1.4.1 Protocolo de ELISA para ensaios *in vitro*

Os kits de ELISA utilizados para determinação de IL-1 β , TNF- α e MCP-1 foram obtidos da R&D Systems (DY201 DuoSet, DY210 DuoSet e DY279 DuoSet, respectivamente) e os procedimentos adotados foram realizados conforme as orientações do fabricante. Em uma microplaca de 96 poços para imunoenensaio foram adicionados 100 μ L/poço de uma solução de anticorpo de captura (anticorpo humano anti-IL-1 β ou anticorpo humano anti-TNF- α ou anticorpo humano anti-MCP-1), nas concentrações de 4,0 μ g/mL, 4,0 μ g/mL e 1,0 μ g/mL em PBS, respectivamente. Essa solução permaneceu em contato com a microplaca *overnight*, à 4 °C. Posteriormente, as microplacas foram lavadas (3 vezes) com tampão de lavagem (PBS/Tween 0,1%) em um lavador de microplacas automático. Logo após, foram adicionados 200 μ L/poço da solução de bloqueio contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA) em PBS. O tempo de bloqueio foi de 2 horas. Em seguida o padrão de IL-1 β humano (250 a 3,91 pg/mL) ou padrão de TNF- α humano (1000 a 15,63 pg/mL) ou padrão de MCP-1 humano (1000 a 15,63 pg/mL) e as amostras (100 μ L do sobrenadante/poço) foram adicionados à microplaca. Após incubação *overnight* à 4 °C, a microplaca foi lavada e foram adicionados 100 μ L/poço de anticorpo de detecção biotilado (anticorpo humano anti-IL-1 β ou anticorpo humano anti-TNF- α ou anticorpo humano anti-MCP-1 nas concentrações de 0,2 μ g/mL, 0,5 μ g/mL e 0,1 μ g/mL em solução de bloqueio estéril, respectivamente), sendo a microplaca incubada por 2 horas. Transcorrido este período, e após lavagem, adicionou-se à microplaca, na ausência de luz, 100 μ L de solução contendo estreptavidina conjugada à peroxidase (R&D Systems). A microplaca foi então incubada por 30 minutos, ao abrigo da luz. Logo em seguida, a microplaca foi novamente lavada e foram adicionados 100 μ L/poço de uma solução contendo o-fenilenodiamina (OPD) e peróxido de hidrogênio nas concentrações de 0,4 mg/mL e 0,2 μ L/mL em tampão citrato pH 5,0, respectivamente. Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 50 μ L/poço de ácido clorídrico 1 mol/L. O produto de oxidação do OPD foi quantificado por colorimetria, em um leitor de placas de ELISA, no comprimento de onda de 490 nm.

4.11.2 Ensaio de inibição de α -amilase *in vitro*

O ensaio de inibição de α -amilase foi realizado seguindo o protocolo anteriormente descrito por Muhammad e colaboradores (2017), com modificações. As soluções enzimática e

das amostras testadas foram preparadas utilizando solução tampão fosfato pH 6,9, contendo fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e cloreto de sódio, respectivamente nas concentrações de 0,02 mol/L, 0,02 mol/L e 0,006 mol/L em água purificada grau 1. Em tubos de ensaio de polipropileno de 5 mL, foram adicionados 20 μL de tampão fosfato pH 6,9. Em seguida, foram adicionados aos tubos 40 μL das amostras nas concentrações de 60, 180, 600, 1800 e 6000 $\mu\text{g/mL}$, em tampão fosfato pH 6,9. Posteriormente, 40 μL de solução de α -amilase de pâncreas porcino, na concentração de 0,5 mg/mL em tampão fosfato pH 6,9, foram adicionados aos tubos e incubados à 37 °C, durante 10 minutos. Para iniciar a reação, foram adicionados 40 μL de solução a 1% m/v de amido em água purificada em cada tubo, seguindo-se incubação à 37 °C por 20 minutos. A reação foi finalizada por meio da adição, nos tubos, de 100 μL de reagente DNSA contendo ácido 3,5-dinitrosalicílico, tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado e hidróxido de sódio, nas concentrações de 0,096 mol/L, 5,3 mol/L e 2 mol/L, respectivamente. Logo após, os tubos foram colocados em banho maria à 70 °C por 10 minutos. Ao término da reação, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e foram adicionados 900 μL de água purificada grau 1 para diluir as amostras. Em seguida, foram transferidos 200 μL dos tubos para cada poço de uma microplaca de 96 poços. As concentrações finais das amostras na microplaca foram de 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. As absorvâncias foram medidas, utilizando um leitor de microplacas, no comprimento de onda de 540 nm. Foi utilizada acarbose, nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, em tampão fosfato pH 6,9, para construção da curva padrão. A atividade inibitória sobre a α -amilase foi expressa como porcentagem de inibição e foi calculada utilizando a fórmula abaixo:

$$\left[1 - \frac{B - b}{A - a} \right] \times 100$$

Onde a, A, b e B são os valores de absorbância dos poços nos quais estão presentes substrato sem enzima e sem inibidor (a), substrato com enzima e sem inibidor (A), substrato sem enzima e com inibidor (b) e substrato com enzima e com inibidor (B).

4.11.3 Ensaio de inibição de α -glicosidase *in vitro*

O ensaio de inibição de α -glicosidase foi realizado conforme protocolo descrito por Pereira e colaboradores (2012). Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 20 μL /poço das amostras a serem testadas, nas concentrações de 3, 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$, diluídas em DMSO na concentração máxima de 1% v/v e tampão fosfato pH 6,8 contendo fosfato de sódio

dibásico (Na_2HPO_4) e fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), ambos na concentração de 0,001 mol/L. Em seguida, foram adicionados 20 μL /poço de glutatona reduzida e 20 μL /poço de solução de α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* nas concentrações de 0,001 mol/L e 0,16 U/mL em tampão fosfato pH 6,8, respectivamente. A microplaca foi então incubada à 37 °C por 15 minutos. Para iniciar a reação, foram adicionados 20 μL /poço de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) na concentração de 0,00085 mol/L em tampão fosfato pH 6,8 e a microplaca foi incubada à 37 °C durante 25 minutos. A reação foi finalizada por meio da adição de 80 μL de uma solução aquosa contendo 0,2 mol/L de carbonato de sódio. As absorvâncias foram medidas, utilizando um leitor de microplacas, no comprimento de onda de 405 nm. Foi utilizada acarbose, nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$, em tampão fosfato pH 6,8, para construção da curva padrão. A atividade inibitória sobre a α -glicosidase foi expressa como porcentagem de inibição e foi calculada utilizando a fórmula abaixo:

$$\left[1 - \frac{B - b}{A - a}\right] \times 100$$

Onde a, A, b e B são os valores de absorvância dos poços nos quais estão presentes substrato sem enzima e sem inibidor (a), substrato com enzima e sem inibidor (A), substrato sem enzima e com inibidor (b) e substrato com enzima e com inibidor (B).

4.12 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO*

Os experimentos *in vivo* foram realizados em colaboração com o doutorando Ulrich Carlos Mbiakop, no laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

4.12.1 Animais

Todos os protocolos experimentais foram executados de acordo com as diretrizes para o uso humano de animais de laboratório e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo 77/2019). Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (8 a 12 semanas de idade). Todos os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO), Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Os camundongos foram mantidos a cinco por gaiola à temperatura constante (23 °C), com 12 h de ciclo claro/escuro. Os animais tiveram livre acesso à ração padrão e água filtrada *ad libitum*. Todos experimentos foram realizados utilizando pelo menos 5 animais por grupo.

4.12.2 Teste de tolerância a carboidrato *in vivo*

4.12.2.1 Teste de tolerância oral ao amido

O teste de tolerância oral ao amido foi realizado seguindo o protocolo anteriormente descrito por Mohamed et al. (2015), com modificações. Os camundongos *Swiss* normais foram privados de comida por 6 h antes do teste, mas tiveram acesso livre à água filtrada durante todo o experimento. As amostras de sangue foram coletadas da ponta da cauda antes da administração das amostras (tempo 0). O extrato, as frações e o amido foram administrados por via oral (gavagem). Para administração, o extrato e as frações foram dissolvidos em água filtrada, na concentração de 1% (m/v), e volumes variáveis foram administrados (máximo de 360 µL) para se atingir uma dose de 100 mg/kg (grupo 2). Os camundongos do controle negativo (grupo 1) receberam o veículo (água filtrada). O fármaco de referência acarbose (10 mg/kg), dissolvido em água filtrada, foi administrado oralmente aos camundongos do controle positivo (grupo 3). Foi realizado um pré-tratamento com os extratos, frações e acarbose. Após 20 minutos, o amido (2 g/kg), dissolvido em água filtrada, foi administrado a todos os camundongos, e as amostras de sangue foram coletadas da ponta da cauda nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração do amido. As concentrações da glicose sanguínea foram determinadas utilizando um glicosímetro.

4.12.3 Ensaio para avaliação do perfil glicêmico e dos parâmetros bioquímicos em camundongos com diabetes mellitus tipo 2

4.12.3.1 Indução do diabetes mellitus tipo 2

A indução do diabetes mellitus tipo 2 foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Chukwuma et al. (2018), com adaptações. Quarenta camundongos *Swiss* pesando 30 a 40 g foram divididos aleatoriamente em cinco grupos contendo oito animais cada (Grupos 1 a 5). Nas primeiras duas semanas, foram realizados um pré-tratamento com solução de frutose a 10% nos bebedouros dos animais dos Grupos 2 a 5 para induzir RI e administração de água filtrada no bebedouro dos animais do Grupo 1. Os camundongos dos Grupos 2 a 5 foram colocados em jejum por 16 horas (*overnight*) e na sequência foi realizada a indução do diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) por meio de injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (100 mg/kg), 15 minutos após a administração i.p. de nicotinamida (150 mg/kg). A estreptozotocina (STZ) foi dissolvida em tampão citrato 0,1 mol/L (pH 4,5), imediatamente antes do uso, e a nicotinamida foi dissolvida em solução salina a 0,9%. Os animais não diabéticos (Grupo 1) receberam os dois veículos. Logo após o procedimento de indução do DMT2, os animais tiveram sua dieta

restabelecida com ração padrão e água/solução de frutose a 10%. A hiperglicemia foi confirmada a partir dos níveis elevados de glicose sanguínea, determinados sete dias após a indução. Para diagnosticar o DMT2, foi considerado um valor de glicemia de jejum na faixa de 250 a 350 mg/dL. Apenas os camundongos com DMT2 permanente foram utilizados no estudo antidiabético. O sangue foi coletado da veia caudal.

4.12.3.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi realizado conforme protocolo adaptado de Wilson & Islam (2012). Foram utilizados, no experimento, um total de 25 camundongos (20 camundongos diabéticos + 5 camundongos normais). O DMT2 foi induzido nos camundongos duas semanas antes de iniciar o tratamento. Os animais foram divididos em cinco grupos contendo cinco camundongos cada e distribuídos conforme descrito a seguir.

Grupo 1: camundongos normais controle que receberam água filtrada (10 mL/kg); Grupo 2: camundongos diabéticos que receberam água filtrada (10 mL/kg); Grupo 3: camundongos diabéticos controle que receberam metformina (200 mg/kg); Grupo 4: camundongos diabéticos que receberam extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* (EECCB) (100 mg/kg); Grupo 5: camundongos diabéticos que receberam fração em acetato de etila (EtOAc) (100 mg/kg). As amostras testadas foram administradas por gavagem, uma vez ao dia (às 9h), durante 28 dias. As glicemias de jejum foram medidas durante o tratamento crônico, nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 semanas. Todos os 5 grupos de camundongos foram eutanasiados um dia após o último tratamento (dia 29) por deslocamento cervical. O sangue foi coletado para quantificação da glicose sanguínea, hemoglobina glicada (HbA1c), colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), e ácido úrico empregando kits comerciais.

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O aplicativo *GraphPad Prism* versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) foi utilizado nas análises estatísticas. Diferenças entre os grupos avaliados foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Para os ensaios *in vitro* celulares, as médias foram comparadas por análise de variância simples (*one way* ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*. Para os ensaios de inibição enzimática, as médias foram comparadas por análise de variância com dois fatores (*two way* ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de *Dunnnett*. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição \pm erro padrão da média (% \pm EPM)

para $n = 12$ replicatas de 2 conjuntos separados de experimentos nos ensaios de citocinas e $n = 12$ replicatas de 4 conjuntos separados de experimentos nos ensaios enzimáticos. Os valores de pIC_{50} (log da concentração da amostra que inibiu 50% da atividade enzimática) foram calculados usando curvas de regressão não linear, e os resultados foram expressos como média \pm EPM. Diferenças significativas entre os valores médios de pIC_{50} foram analisadas por *one way* ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

Para os ensaios *in vivo*, os dados de cada grupo foram expressos como média \pm EPM de pelo menos 5 animais. Para o teste de tolerância oral ao amido e ensaio para avaliação do perfil glicêmico em camundongos com DMT2, as médias foram comparadas por *two way* ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Dunnnett*. Para avaliação dos parâmetros bioquímicos dos animais, as médias foram comparadas por *one way* ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação *in vitro* da viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi realizado para verificar a toxicidade dos extratos sobre as células THP-1. Seu objetivo é evitar um resultado falso positivo no ensaio de inibição das citocinas pró-inflamatórias, decorrente da citotoxicidade da amostra ensaiada. Uma das abordagens utilizadas na avaliação da viabilidade celular consiste no teste de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), empregando ensaio *in vitro* com culturas de células THP-1 estimuladas com LPS. Neste ensaio, células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT no produto formazana de cor púrpura, com absorvância máxima próxima em 570 nm (Figura 4). Quando há morte celular, elas perdem a capacidade de converter MTT em formazana, assim a formação de cor serve como um marcador útil das células viáveis (Riss et al., 2013). O exato mecanismo celular de redução do MTT em formazana não é bem compreendido, mas provavelmente envolve reação com nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) ou moléculas redutoras similares que transferem elétrons para o MTT (Marshall et al., 1995).

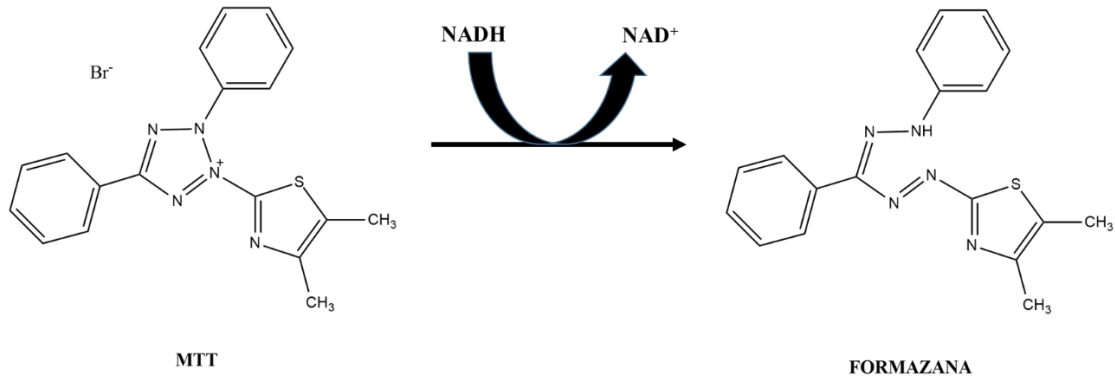


Figura 4 – Conversão do MTT no produto formazana

Desta forma, a viabilidade celular dos extratos e frações obtidos foi inicialmente avaliada *in vitro*. O controle de toxicidade do solvente (CC) foi empregado para evitar resultados falsos positivos de citotoxicidade, enquanto o controle de extrato (CE) na maior concentração foi testado para monitorar possíveis interferências da coloração dos extratos sobre as leituras de absorvância. Considerou-se não citotóxicas as amostras cujos resultados de viabilidade celular foram superiores a 90% conforme preconizado por Sugimoto e colaboradores (2017), sendo o efeito dessas amostras avaliado *in vitro* sobre a liberação das citocinas IL-1 β , TNF- α e MCP-1.

Os extratos etanólicos brutos foram avaliados nas concentrações de 62,5; 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$ (*C. brasiliense*) e 10; 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$ (*L. rubra*) nos ensaios de viabilidade celular com MTT, em culturas de células THP-1 estimuladas com LPS. O extrato de folhas e cascas do fruto de *C. brasiliense*, assim como o extrato de partes aéreas de *L. rubra*, apresentaram viabilidade celular superior a 90% em todas as concentrações avaliadas (Figura 5 A, B e C).

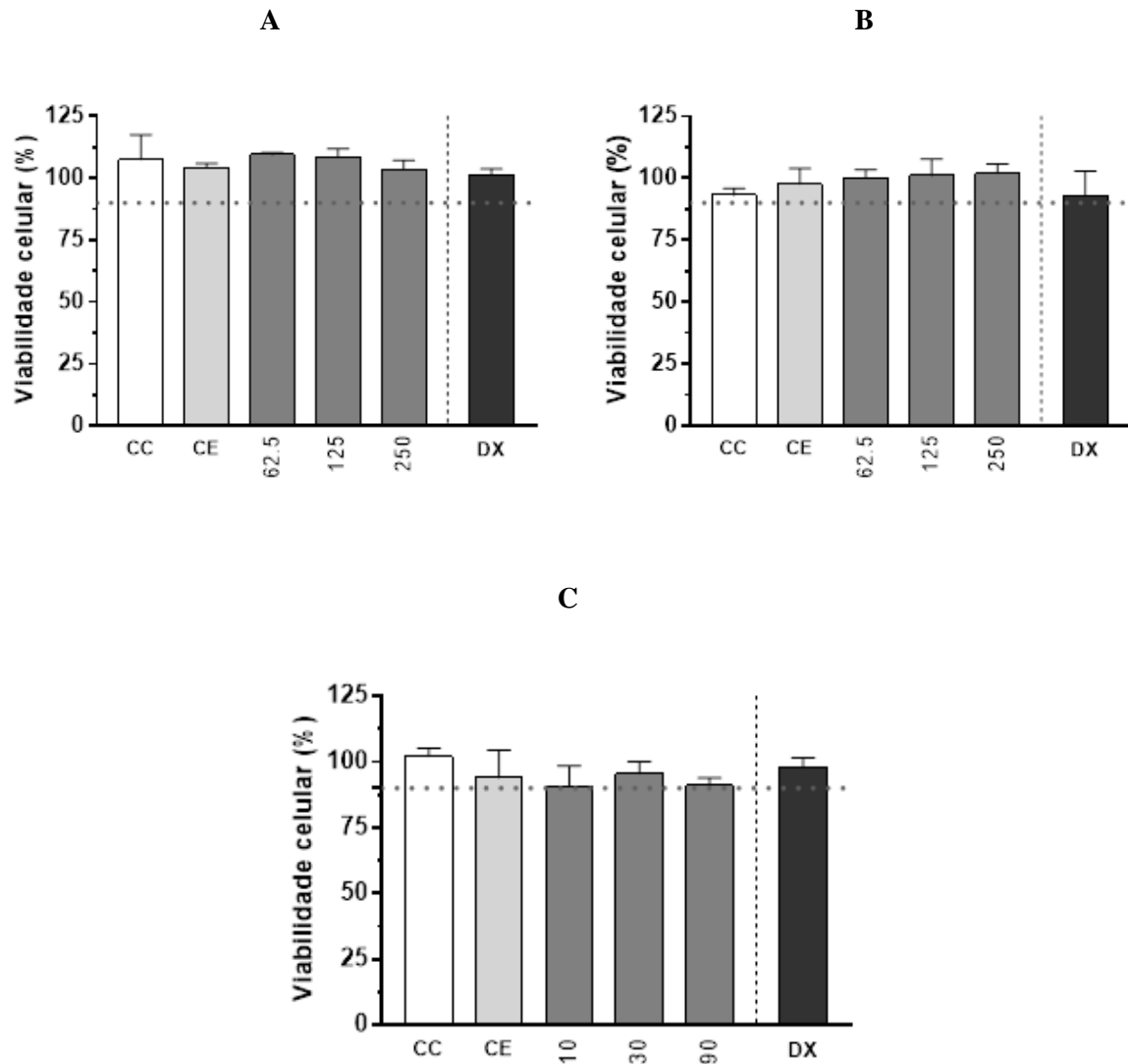


Figura 5 – Viabilidade das células THP-1 tratadas com os extratos etanólicos de folhas (A) e de cascas do fruto de *C. brasiliense* (B), e de partes aéreas de *L. rubra* (C) nas concentrações de 62,5, 125, e 250 $\mu\text{g/mL}$ (A e B); e 10, 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$ (C), juntamente com o controle de células (CC), controle de extrato (CE) e dexametasona (DX), após 24h de incubação, no ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 12$ de dois conjuntos separados de experimentos com 6 replicatas em cada um deles). Diferenças significativas entre o controle de células e todos os grupos de tratamento usando análise de variância a um critério (*one way ANOVA*), seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. DX (0,1 μM ; controle positivo).

As frações hexânica, diclorometânica (DCM), em acetato de etila (EtOAc) e hidrometanólica (MeOH/H₂O), oriundas dos extratos etanólicos de *C. brasiliense* (folhas e

cascas do fruto) e de *L. rubra* (partes aéreas), foram avaliadas nas concentrações de 62,5; 125 e 250 µg/mL (*C. brasiliense*) e 10; 30 e 90 µg/mL (*L. rubra*) nos ensaios de viabilidade celular com MTT, em culturas de células THP-1 estimuladas com LPS (Figura 6, 7 e 8).

As frações hexânica e diclorometânica do extrato de folhas de *C. brasiliense* (Figura 6 A e B) apresentaram, em todas as concentrações testadas, viabilidade celular inferior a 90%, sendo, portanto, consideradas citotóxicas. As frações em acetato de etila e hidrometanólica (Figura 6 C e D), exibiram viabilidade celular superior a 90%, em todas as concentrações, estando, portanto, aptas a serem avaliadas nos ensaios de inibição de IL-1 β , TNF- α e MCP-1.

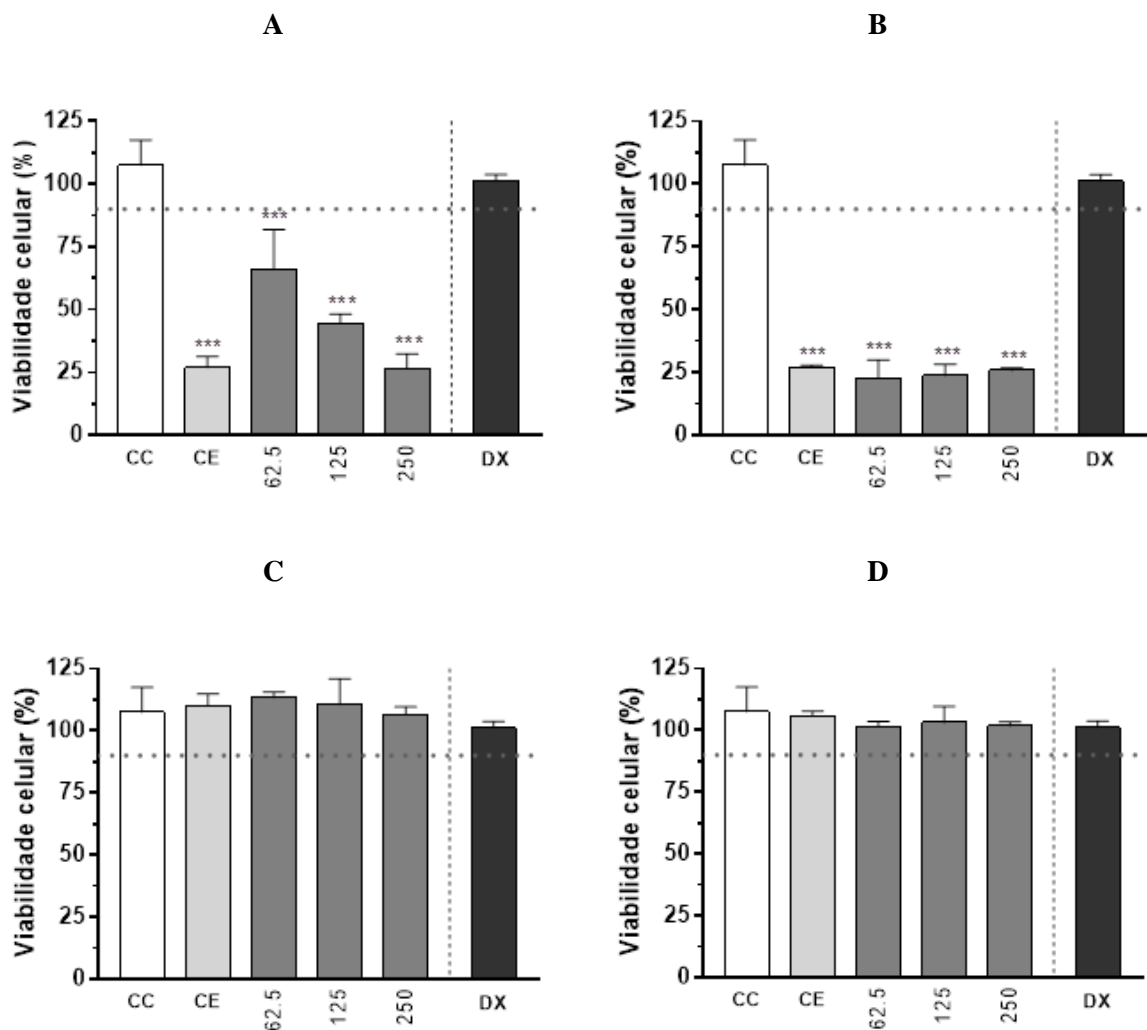


Figura 6 – Viabilidade das células THP-1 tratadas com as frações hexânica (A), diclorometânica (B), em acetato de etila (C) e hidrometanólica (D) do extrato etanólico de folhas de *C. brasiliense* nas concentrações de 62,5, 125, e 250 µg/mL, juntamente com o controle de células (CC), controle de extrato (CE) e dexametasona (DX) após 24h de incubação, no ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 12$ de dois conjuntos separados de experimentos com 6 replicatas em cada um deles). Diferenças significativas entre o controle de células e todos os grupos de tratamento usando análise de variância a um critério (*one way ANOVA*), seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. DX (0,1 µM; controle positivo).

Na Figura 7 estão representados os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular para as frações do extrato de cascas de *C. brasiliense*. As frações em acetato de etila e hidrometanólica (Figura 7 C e D) apresentaram, em todas as concentrações testadas, viabilidade celular superior a 90%, de maneira oposta às frações hexânica e diclorometânica (Figura 7 A e B), as quais se apresentaram citotóxicas.

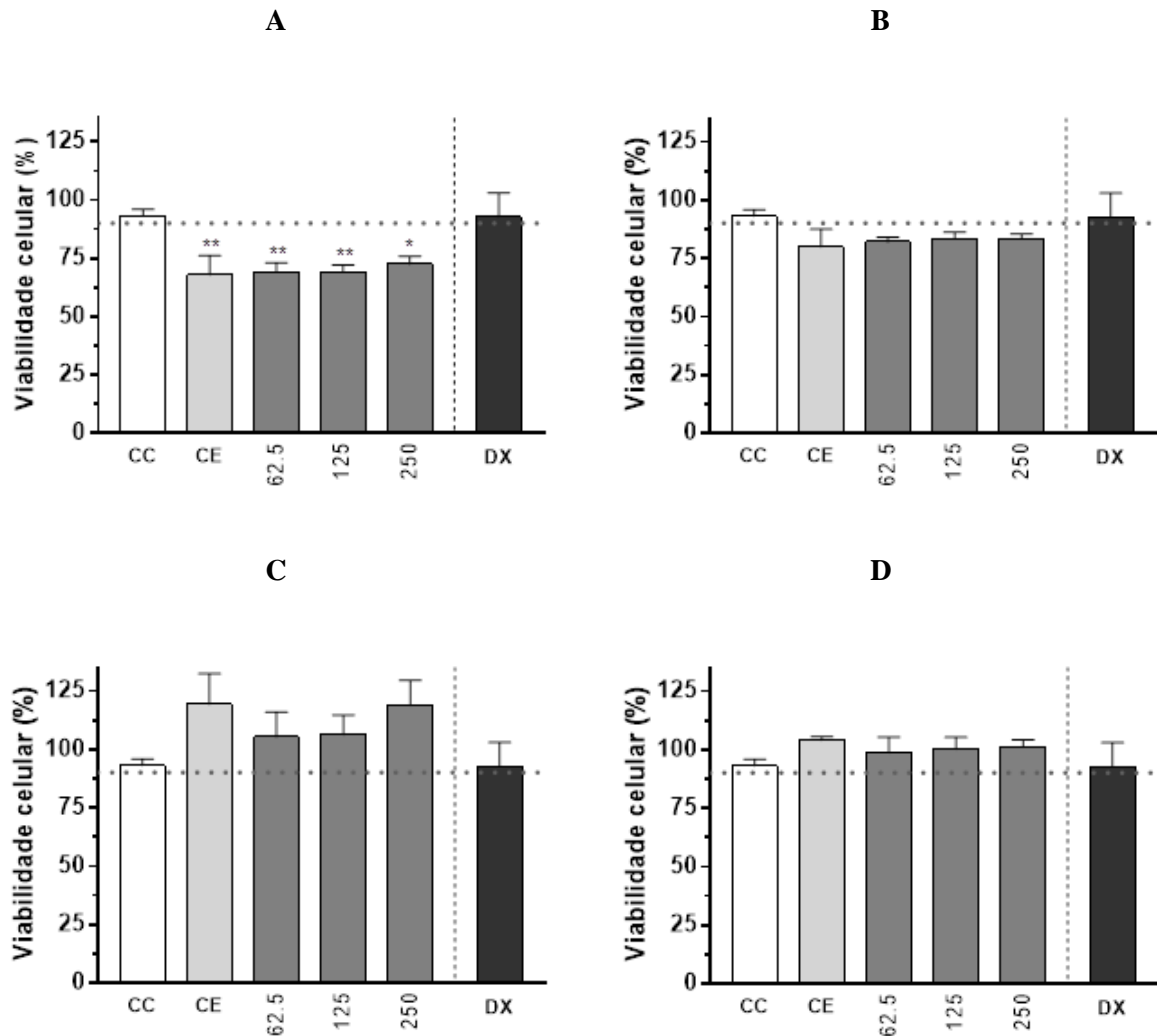


Figura 7 – Viabilidade das células THP-1 tratadas com as frações hexânica (A), diclorometânica (B), em acetato de etila (C) e hidrometanólica (D) do extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* nas concentrações de 62,5, 125, e 250 µg/mL, juntamente com o controle de células (CC), controle de extrato (CE) e dexametasona (DX) após 24h de incubação, no ensaio de MTT. Os dados representam a média ± EPM ($n = 12$ de dois conjuntos separados de experimentos com 6 replicatas em cada um deles). Diferenças significativas entre o controle de células e todos os grupos de tratamento usando análise de variância a um critério (*one way ANOVA*), seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. DX (0,1 µM; controle positivo).

Na Figura 8 estão dispostos os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular para as frações do extrato de partes aéreas de *L. rubra*. Todas as frações testadas (Figura 8 B, C e D) apresentaram viabilidade celular superior a 90%, nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL, exceto a fração hexânica (Figura 8 A).

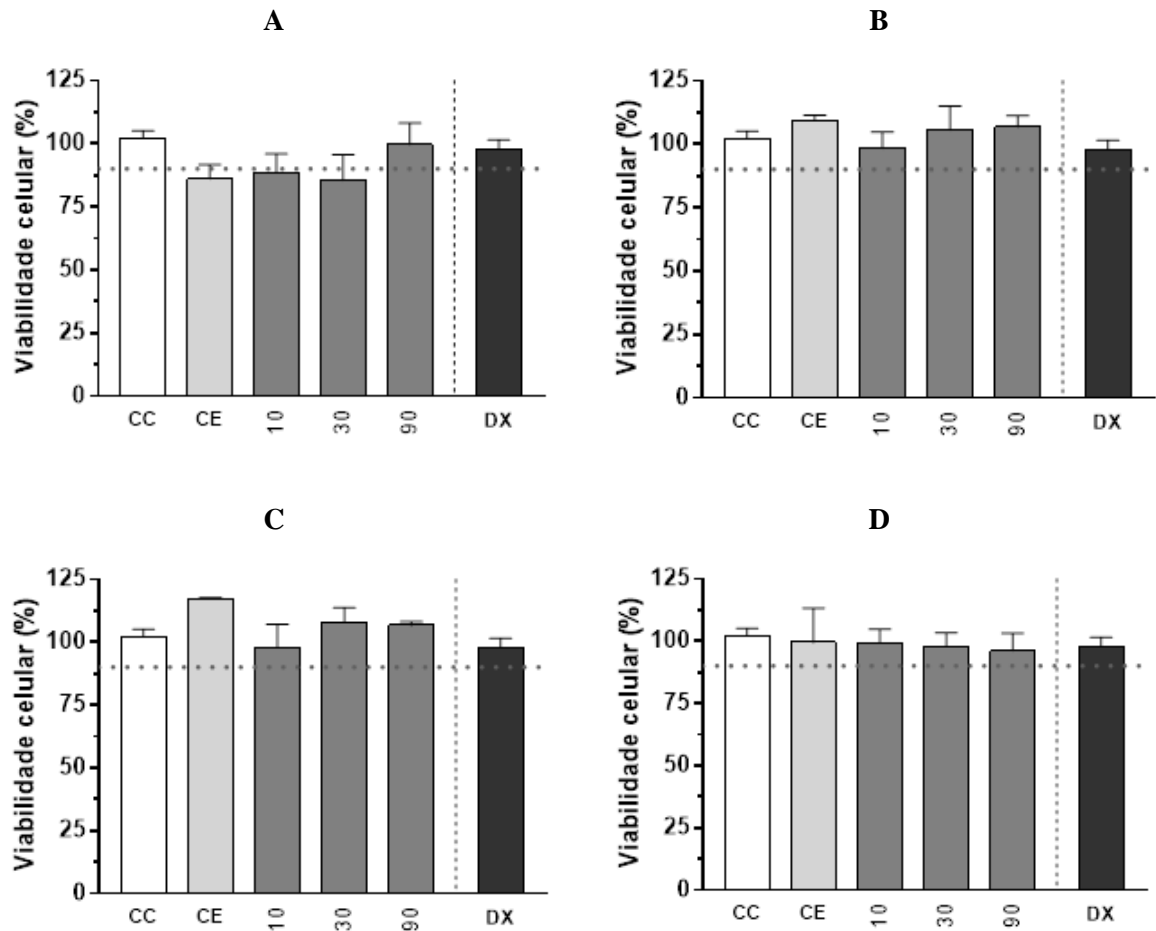


Figura 8 – Viabilidade das células THP-1 tratadas com as frações hexânica (A), diclorometânica (B), em acetato de etila (C) e hidrometanólica (D) do extrato etanólico de partes aéreas de *L. rubra* nas concentrações de 10, 30, e 90 µg/mL, juntamente com o controle de células (CC), controle de extrato (CE) e dexametasona (DX) após 24h de incubação, no ensaio de MTT. Os dados representam a média ± EPM ($n = 12$ de dois conjuntos separados de experimentos com 6 replicatas em cada um deles). Diferenças significativas entre o controle de células e todos os grupos de tratamento usando análise de variância a um critério (*one way ANOVA*), seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. DX (0,1 µM; controle positivo).

5.2 Avaliação *in vitro* do efeito de extratos e frações sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios

Uma abordagem empregada na triagem de substâncias bioativas sobre o componente inflamatório do DMT2 consiste na avaliação da inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o IL-1 β , TNF- α , e MCP-1, empregando ensaio *in vitro* com culturas de células THP-1 estimuladas com LPS. Desta forma, os três extratos etanólicos e algumas frações derivadas foram avaliados no modelo *in vitro* de inibição da liberação dos mediadores pró-inflamatórios supracitados.

Os extratos e frações em acetato de etila e hidrometanólica de *C. brasiliense* (folhas e cascas) foram avaliados frente às citocinas a 10; 30 e 90 µg/mL, concentrações essas inferiores às utilizadas no teste de viabilidade celular por MTT (62,5; 125 e 250 µg/mL) cujos resultados

indicaram ausência de citotoxicidade. Esses dados sugerem atividade não citotóxica em níveis de concentração menores que 250 µg/mL, validando, portanto, os resultados obtidos para as amostras citadas nos ensaios de inibição de IL-1 β , TNF- α , e MCP-1 no intervalo de 10 a 90 µg/mL.

5.2.1 Avaliação dos extratos nos modelos *in vitro* de inibição da liberação de IL-1 β , TNF- α e MCP-1

Os extratos etanólicos brutos de *C. brasiliense* (folhas e cascas) e *L. rubra* (partes aéreas) foram avaliados nas concentrações de 10; 30 e 90 µg/mL nos ensaios de inibição da produção de IL-1 β , em culturas de células THP-1 estimuladas por LPS (Figura 9). O controle de extrato na maior concentração foi testado na presença e na ausência de LPS, com o objetivo de investigar se o extrato *per se* era capaz de estimular a liberação das citocinas testadas.

Os extratos de folhas e cascas do fruto de *C. brasiliense* inibiram a liberação de IL-1 β de maneira concentração dependente (Figura 9 A e B), com inibições máximas de $72,2 \pm 4,4\%$ e $74,5 \pm 3,7\%$, respectivamente. O extrato de *L. rubra* não reduziu a liberação de IL-1 β de maneira significativa (Figura 9 C).

O potencial anti-inflamatório de *C. coriaceum* foi demonstrado em trabalhos anteriores. Assim, o óleo da polpa dos frutos dessa espécie reduziu em cerca de 75% o nível de IL-1 β no líquido sinovial em modelo de artrite induzida por zymosan em ratos, administrado na dose de 100 mg/Kg, durante sete dias consecutivos, por via oral (gavagem) (Oliveira, 2013). No entanto, não foram encontrados estudos relatando o efeito dos extratos de folhas ou de cascas do fruto de *C. brasiliense* sobre a inibição de IL-1 β . Portanto, este é o primeiro relato do efeito desses extratos sobre esta citocina pró-inflamatória em modelo *in-vitro*.

IL-1 β é um dos principais reguladores da resposta imune inata, controlando vários processos inflamatórios. Evidências revelam que a atividade de IL-1 β é importante na patologia do DMT2, mediando a inflamação induzida pela obesidade e agravando diretamente a resistência à insulina. Além disso, contribui para o desenvolvimento do DMT2, devido a inibição funcional das células β pancreáticas (Ballak et al., 2015). Em um estudo prospectivo com 27.500 indivíduos, observou-se que a elevação dos níveis plasmáticos de IL-1 β e IL-6 aumentou o risco de desenvolver DMT2 em um período de 2 a 3 anos. Portanto, a inibição da liberação de IL-1 β constitui um alvo terapêutico potencial no tratamento do processo inflamatório associado ao DMT2 (Spranger et al, 2003).

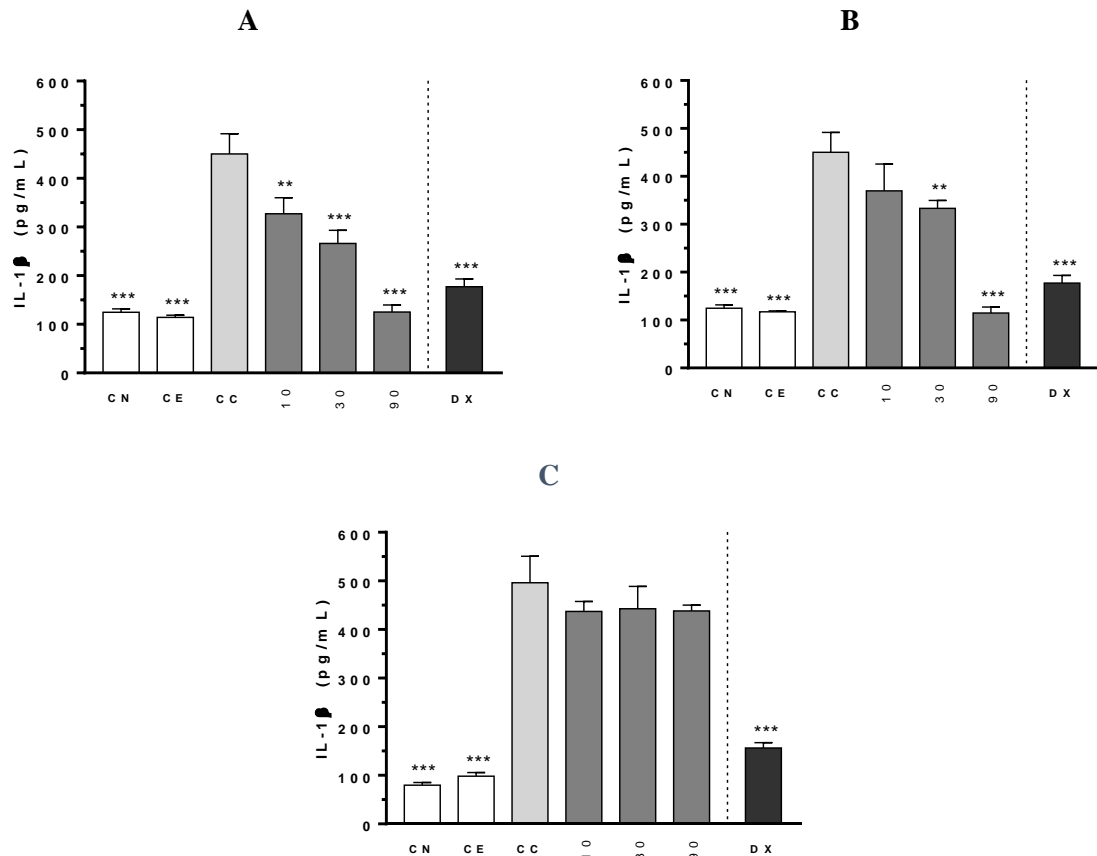


Figura 9 – Efeito dos extratos etanólicos de folhas (A) e de cascas do fruto de *C. brasiliense* (B), e de partes aéreas de *L. rubra* (C), avaliados nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL, sobre a liberação de IL-1β em células THP-1 estimuladas por LPS após 24h de incubação. CN, controle de células não estimulada; CE, controle de extrato; CC, controle de células estimuladas; e DX, dexametasona. Os dados representam a média ± EPM ($n = 12$ de dois conjuntos separados de experimentos com 6 replicatas em cada um deles). Diferenças significativas entre o controle de células estimuladas e todos os grupos de tratamento usando análise de variância a um critério (*one way ANOVA*), seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. DX (0,1 µM; controle positivo).

Na Figura 10 estão representados os resultados obtidos para os extratos nas concentrações de 10; 30 e 90 µg/mL sobre a liberação de TNF-α em culturas de células THP-1 estimuladas por LPS. O controle de extrato na maior concentração foi testado na presença e na ausência de LPS, com o objetivo de investigar se o extrato *per se* era capaz de estimular a liberação das citocinas testadas.

O extrato de folhas de *C. brasiliense* inibiu a liberação TNF-α de maneira concentração dependente (Figura 10 A), com inibição máxima de $84,9 \pm 0,6\%$. As cascas do fruto de *C. brasiliense* reduziram a liberação de TNF-α de maneira significativa nas concentrações de 30 e 90 µg/mL (Figura 10 B). Nestas concentrações, o extrato das cascas reduziu a liberação de TNF-α em $15,3 \pm 10,7\%$ e $28,5 \pm 5,6\%$, respectivamente, em comparado ao controle ($p < 0,05$).

A potencial atividade anti-inflamatória de *C. brasiliense* foi previamente descrita por nosso grupo de pesquisa (Gusman et al., 2015). Nesse estudo, extratos etanólicos das folhas e

cascas reduziram a liberação de TNF- α de maneira concentração dependente. O valor de IC₅₀ foi determinado para o extrato mais ativo (folhas) sendo obtido o valor de 224,0 \pm 1,0 μ g/mL. O extrato das cascas não atingiu o platô para determinação de IC₅₀ (Gusman et al., 2015).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória secretada pelo tecido adiposo visceral, uma característica comum em indivíduos obesos com DMT2. Esses adipócitos desregulados tendem a secretar, além do TNF- α , outras adipocinas pró-inflamatórias, como o IL-1 β e IL-6. Em níveis elevados, o TNF- α está associado à resistência à insulina, doença aterosclerótica e hipertensão. Se a produção desta citocina se encontra descontrolada, pode levar a um processo inflamatório sistêmico amplamente disseminado, o qual inicia processos patológicos associados ao DMT2. Portanto, compostos que inibam a liberação de TNF- α possuem elevada atividade anti-inflamatória se tornando potenciais candidatos no tratamento das morbidades associadas ao DMT2 (Chen et al., 2017; Sfrikakis, 2010).

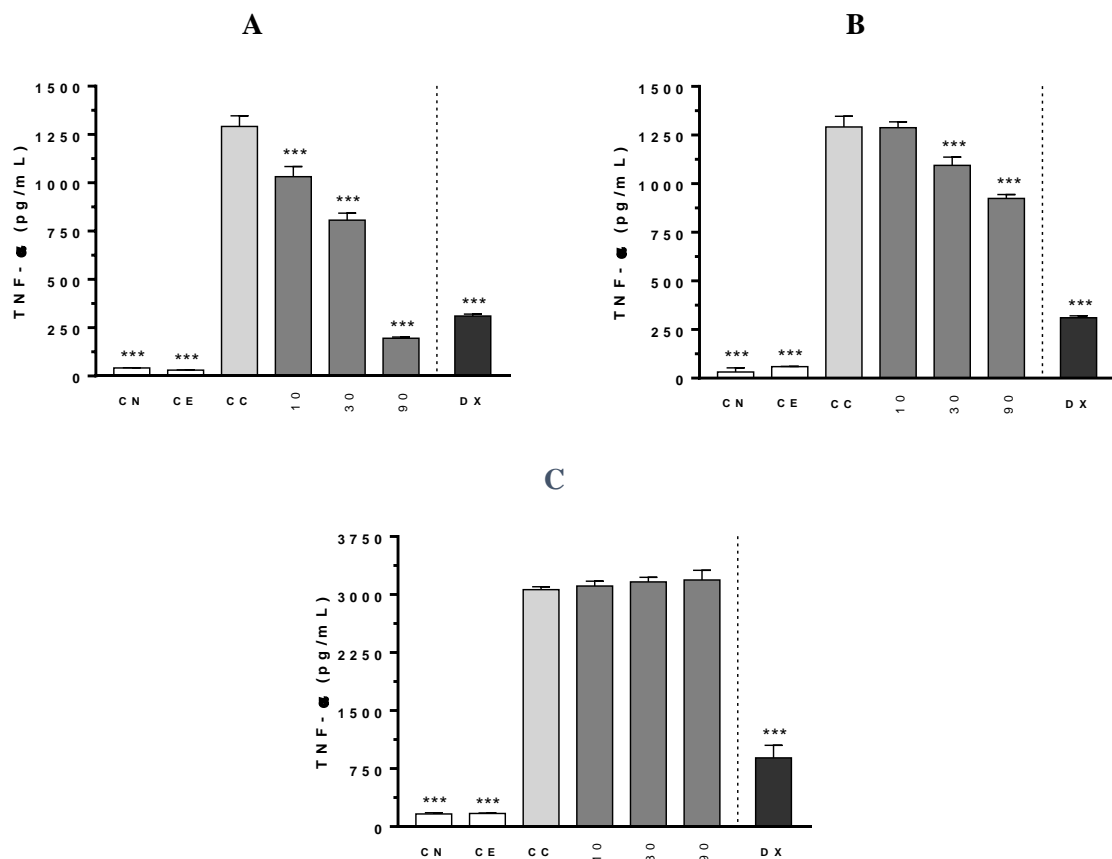


Figura 10 – Efeito dos extratos etanólicos de folhas (A) e de cascas do fruto de *C. brasiliense* (B), e de partes aéreas de *L. rubra* (C), avaliados nas concentrações de 10, 30 e 90 μ g/mL, sobre a liberação de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS após 24h de incubação. CN, controle de células não estimulada; CE, controle de extrato; CC, controle de células estimuladas; e DX, dexametasona. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 12$ de dois conjuntos separados de experimentos com 6 replicatas em cada um deles). Diferenças significativas entre o controle de células estimuladas e todos os grupos de tratamento usando análise de variância a um critério (*one way* ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. DX (0,1 μ M; controle positivo).

O efeito dos extratos nas concentrações de 10; 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$ sobre a liberação de MCP-1 em culturas de células THP-1 estimuladas por LPS está representado na Figura 11. O controle de extrato na maior concentração foi testado na presença e na ausência de LPS, com o objetivo de investigar se o extrato *per si* era capaz de estimular a liberação das citocinas testadas.

O extrato de *L. rubra* (partes aéreas) foi inativo em todas as concentrações ensaiadas (Figura 11 C). Os extratos de *C. brasiliense* (folhas e cascas do fruto) inibiram a liberação de MCP-1 de maneira concentração dependente (Figura 11 A e B), com valores de $89,8 \pm 0,8\%$ e $42,3 \pm 9,0\%$, respectivamente, na maior concentração avaliada (90 $\mu\text{g/mL}$). Não foram relatados na literatura estudos *in vitro* sobre a atividade de extratos de folhas ou cascas do fruto de *C. brasiliense* sobre a inibição de MCP-1. Portanto, este é o primeiro relato de seus efeitos sobre esta citocina.

A proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) é a quimiocina responsável pelo recrutamento dos monócitos para os sítios inflamatórios. Níveis basais elevados de MCP-1 desempenham um papel crítico no desenvolvendo da aterosclerose e outras comorbidades relacionadas à progressão do DMT2. Em um estudo com 303 pacientes japoneses com DMT2 em monitoramento desde 1990, uma frequência elevada de polimorfismo tipo MCP-1 A-2518G no gene MCP-1, determinado pelo método PCR TaqMan, foi associado ao desenvolvendo de aterosclerose da artéria carótida (Yuasa et al., 2009). Em outro estudo envolvendo pacientes com DMT2 ($n = 35$), retinopatia diabética não proliferativa (RDNP, $n = 35$) e retinopatia diabética proliferativa (RDP, $n = 35$), os pesquisadores descobriram níveis significativamente elevados de MCP-1 nos pacientes com DMT2, RDNP e RDP em comparação ao grupo controle normoglicêmico ($p < 0,001$) (Reddy et al., 2017). Embora uma terapia baseada na inibição da liberação de MCP-1 ainda não tenha sido estabelecida, essas descobertas sugerem que o MCP-1 pode ser um potencial alvo terapêutico no tratamento das complicações associadas ao DMT2.

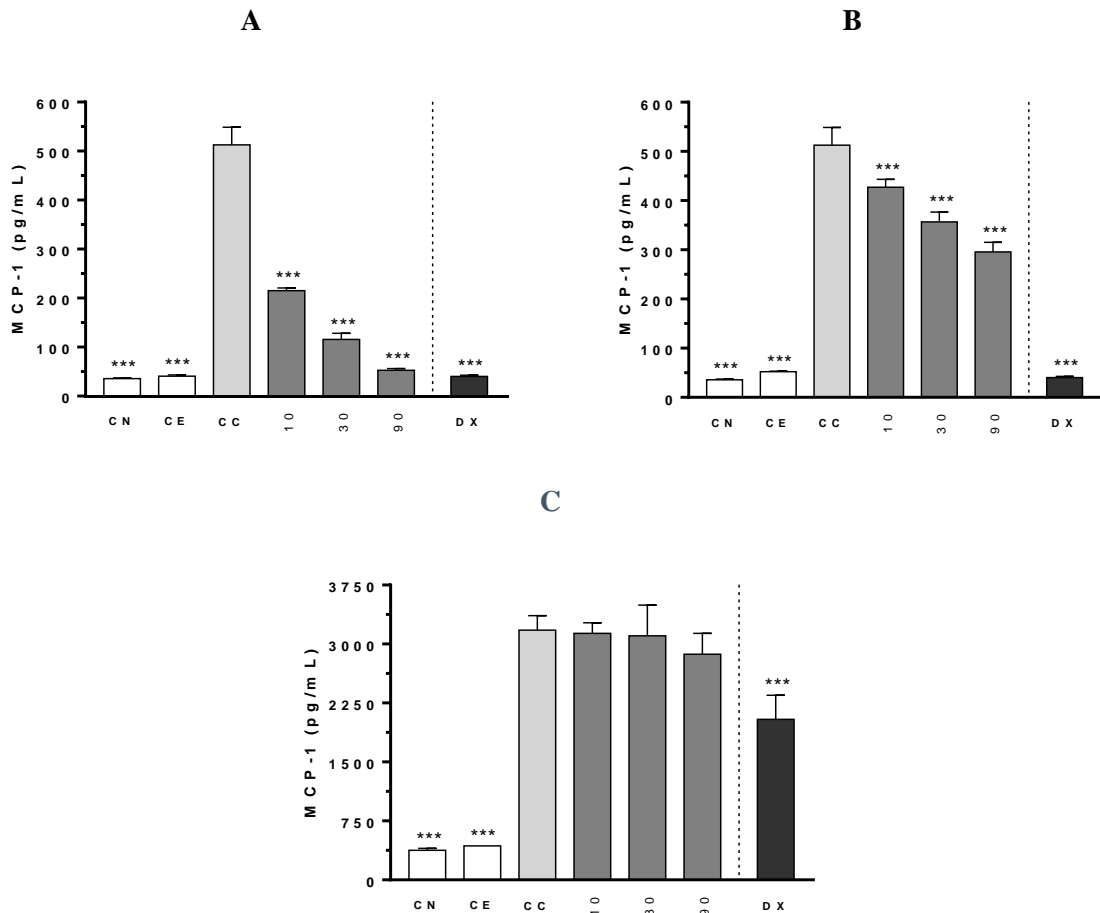
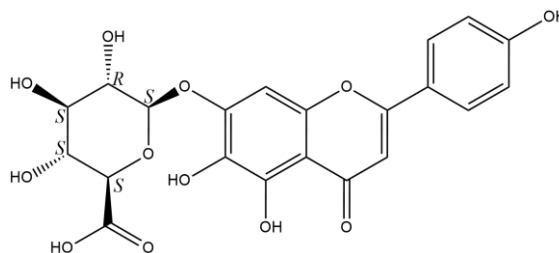


Figura 11 – Efeito dos extratos etanólicos de folhas (A) e de cascas do fruto de *C. brasiliense* (B), e de partes aéreas de *L. rubra* (C), avaliados nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL, sobre a liberação de MCP-1 em células THP-1 estimuladas por LPS após 24h de incubação. CN, controle de células não estimulada; CE, controle de extrato; CC, controle de células estimuladas; e DX, dexametasona. Os dados representam a média ± EPM ($n = 12$ de dois conjuntos separados de experimentos com 6 replicatas em cada um deles). Diferenças significativas entre o controle de células estimuladas e todos os grupos de tratamento usando análise de variância a um critério (*one way ANOVA*), seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. DX (0,1 µM; controle positivo).

Pesquisas têm sido conduzidas para identificar novos agentes capazes de reduzir os níveis plasmáticos de MCP-1 (Kang et al., 2008; Panee, 2012). A título de exemplo pode-se citar a breviscapina (25), um agente empregado no tratamento da nefropatia diabética (ND) que inibiu a liberação de MCP-1 nos glomérulos e túbulos renais de ratos diabéticos. Este flavonoide foi isolado de *Erigeron breviscapus*, uma planta herbácea de origem chinesa, rica em compostos polifenólicos (Qi et al., 2006). Uma metanálise com 35 estudos clínicos randomizados e controlados por placebo, demonstrou que a administração de breviscapina injetável em 1188 pacientes com ND produziu efeitos terapêuticos significativos, incluindo a redução dos níveis de creatinina sérica, uréia sanguínea e proteinúria em comparação ao grupo controle contendo 1132 pacientes ($P < 0,001$) (Liu et al., 2016).



(25)

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que, nas condições experimentais testadas, o extrato etanólico de *L. rubra* não apresentou atividade sobre as citocinas pró-inflamatórias avaliadas e, desta forma, não demonstrou ser promissor no tratamento do componente inflamatório do DMT2. Por outro lado, os extratos de *C. brasiliense* inibiram significativamente a liberação de IL-1 β e TNF- α (folhas), e MCP-1 (folhas e cascas). Além disso, o extrato de cascas de *C. brasiliense* inibiu significativamente a liberação de IL-1 β e TNF- α nas concentrações de 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$. Com base nesses resultados, as frações oriundas do fracionamento dos extratos de *C. brasiliense* por partição entre solventes imiscíveis foram selecionadas para avaliação nos ensaios de inibição das citocinas pró-inflamatórias.

5.2.2 Atividade *in vitro* das frações de *C. brasiliense* sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias

As frações em acetato de etila (EtOAc) e hidrometanólica (MeOH/H₂O), provenientes dos extratos etanólicos de folhas e cascas do fruto de *C. brasiliense*, foram avaliadas nos ensaios de inibição da liberação de IL-1 β , TNF- α e MCP-1 em culturas de células THP-1 estimuladas por LPS (Figura 12, 13 e 14).

As frações EtOAc (folhas e cascas) e MeOH/H₂O (folhas) de *C. brasiliense* reduziram a liberação de IL-1 β de forma concentração-dependente (Figura 12 A, B e C). A fração MeOH/H₂O das cascas do fruto de *C. brasiliense* foi ativa nas concentrações de 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12 D). Observou-se que a atividade inibitória sobre IL-1 β induzida pelas frações EtOAc e MeOH/H₂O de folhas de *C. brasiliense* foi equivalente ($p > 0,05$; teste-t não pareado) na maior concentração avaliada (90 $\mu\text{g/mL}$). Por sua vez, a inibição promovida pelas cascas do fruto de *C. brasiliense* foi principalmente para a fração EtOAc, sugerindo que a atividade se deve a compostos de média polaridade.

Na Figura 13 estão representados os resultados obtidos para as frações dos extratos de *C. brasiliense* sobre a liberação de TNF- α em culturas de células THP-1 estimuladas por LPS. As frações em EtOAc e MeOH/H₂O das folhas de *C. brasiliense* inibiram, significativamente, a liberação de TNF- α em todas as concentrações avaliadas (Figura 13 A e B), com inibições

máximas de $89,9 \pm 0,2\%$ e $93,1 \pm 0,5\%$, respectivamente. Esses resultados corroboram dados anteriores de nosso grupo de pesquisa, no qual a atividade anti-TNF- α do extrato de *C. brasiliense* (folhas) foi encontrada sobretudo nas frações em EtOAc e aquosa (Gusman et al. 2015), sugerindo que a inibição se deve provavelmente a compostos de média e alta polaridade respectivamente.

As frações em EtOAc e MeOH/H₂O oriundas das cascas do fruto de *C. brasiliense* reduziram a liberação de TNF- α de maneira concentração-dependente (Figura 13 C e D), com percentuais de inibição de $59,9 \pm 2,3\%$ e $41,0 \pm 4,6\%$, respectivamente, na concentração de 90 $\mu\text{g/mL}$. Esses resultados indicam que a atividade biológica foi mais pronunciada na fração EtOAc, sugerindo que compostos de média polaridade são responsáveis pelo efeito.

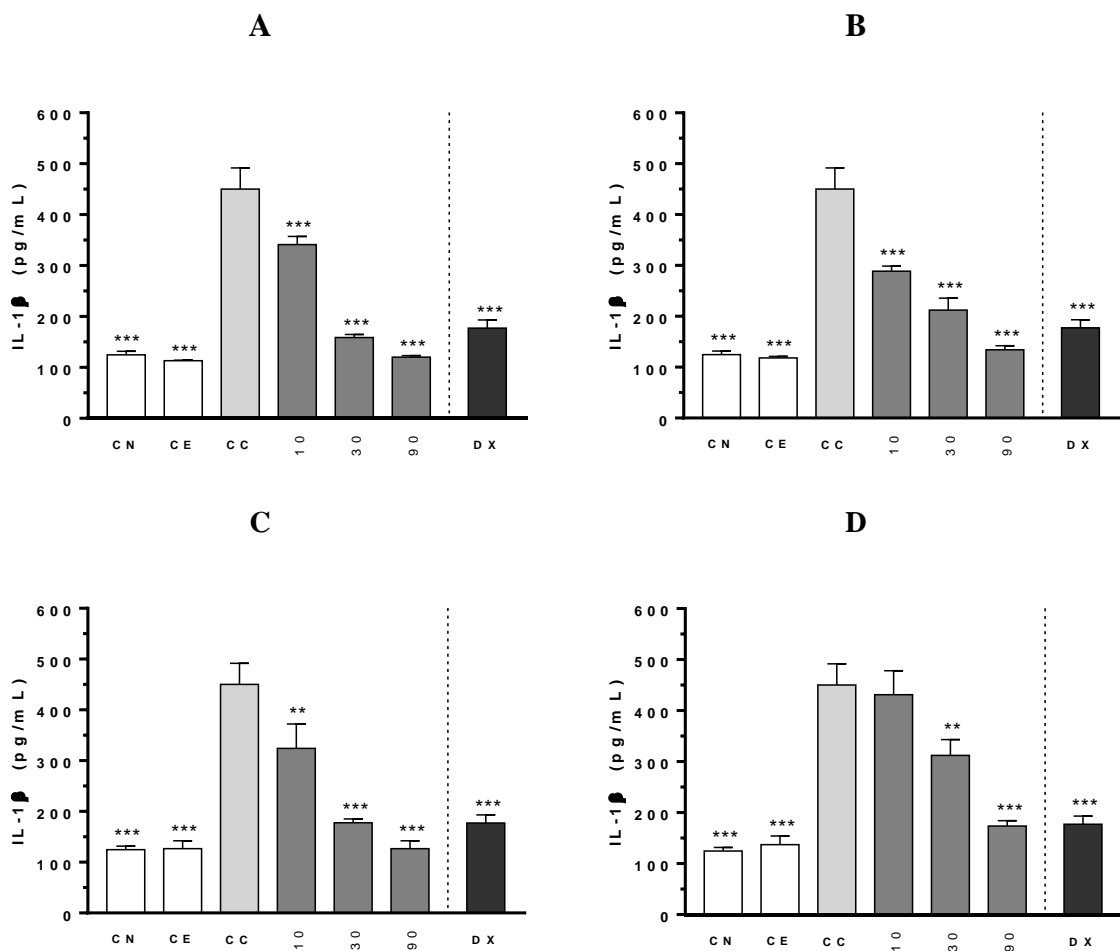


Figura 12 – Efeito das frações em acetato de etila e hidrometanólica dos extratos de folhas (A e B, respectivamente) e de cascas do fruto (C e D, respectivamente) de *C. brasiliense*, avaliados nas concentrações de 10, 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$, sobre a liberação de IL-1 β em células THP-1 estimuladas por LPS, após 24h de incubação. CN, controle de células não estimulada; CE, controle de extrato; CC, controle de células estimuladas; e DX, dexametasona. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 12$ de dois conjuntos separados de experimentos com 6 replicatas em cada um deles). Diferenças significativas entre o controle de células estimuladas e todos os grupos de tratamento usando análise de variância simples (*one way ANOVA*), seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. DX (0,1 μM ; controle positivo).

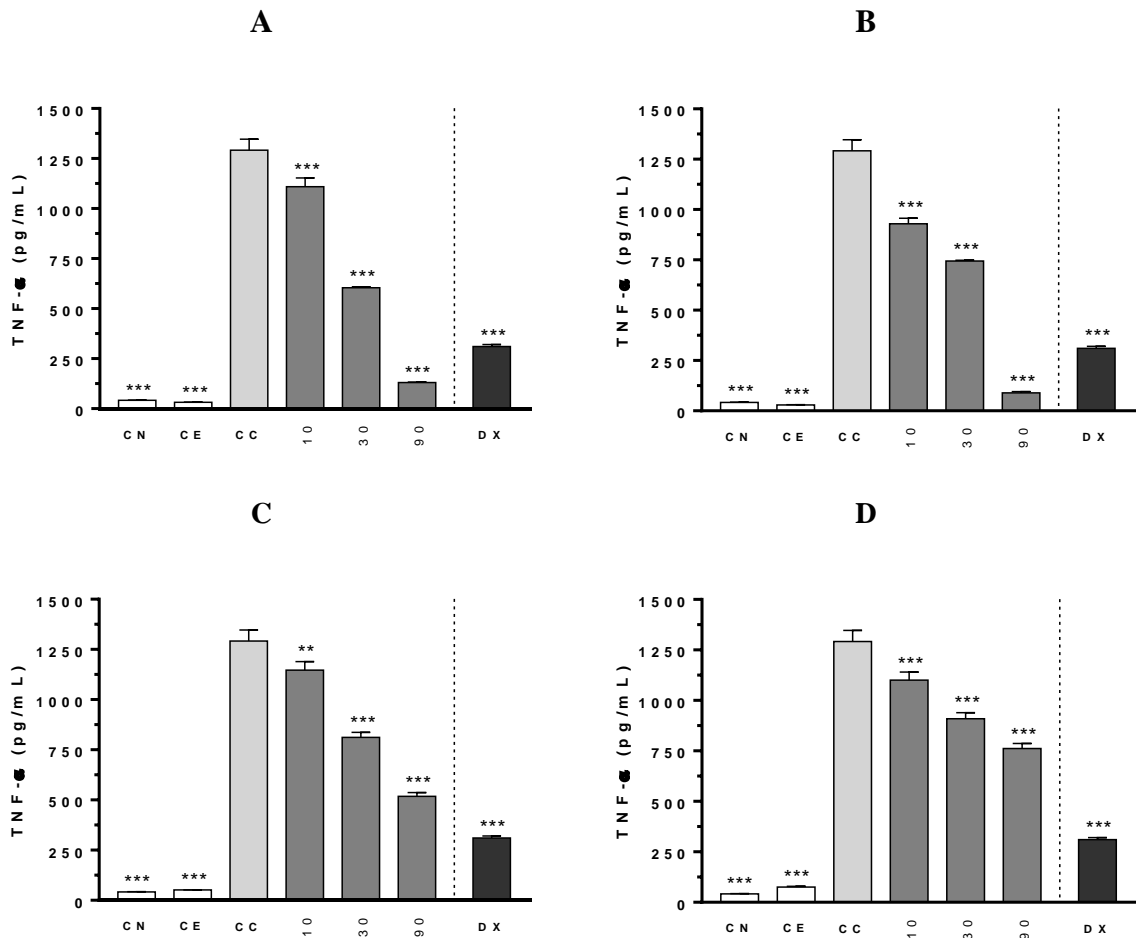


Figura 13 – Efeito das frações em acetato de etila e hidrometanólica dos extratos de folhas (A e B, respectivamente) e de cascas do fruto (C e D, respectivamente) de *C. brasiliense*, avaliados nas concentrações de 10, 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$, sobre a liberação de TNF- α em células THP-1 estimuladas por LPS, após 24h de incubação. CN, controle de células não estimulada; CE, controle de extrato; CC, controle de células estimuladas; e DX, dexametasona. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 12$ de dois conjuntos separados de experimentos com 6 replicatas em cada um deles). Diferenças significativas entre o controle de células estimuladas e todos os grupos de tratamento usando análise de variância simples (one way ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. DX (0,1 μM ; controle positivo).

O efeito das frações sobre a liberação de MCP-1 em culturas de células THP-1 estimuladas por LPS está representado na Figura 14. As frações em EtOAc e MeOH/H₂O de *C. brasiliense* (folhas e cascas do fruto) provocaram reduções significativas nos níveis de MCP-1 em todas as concentrações testadas (Figura 14 A, B, C e D), sendo obtidos percentuais de inibição superiores a 85% para a concentração de 90 $\mu\text{g/mL}$.

A atividade inibitória da liberação de MCP-1 dos extratos de folhas e cascas do fruto de *C. brasiliense* foi mantida em ambas as frações EtOAc e MeOH/H₂O, sugerindo que o efeito se deve provavelmente a compostos de média e alta polaridade.

Em virtude dos efeitos inibitórios significativos sobre as citocinas IL-1 β , TNF- α e MCP-1 induzidos pela fração em EtOAc de cascas do fruto de *C. brasiliense* e, considerando a

escassez de dados químicos e biológicos para a mesma, assim como o viés econômico, com possível aproveitamento de um material descartado no processamento do pequi – as cascas do fruto – esta fração foi selecionada para avaliação nos ensaios de inibição de α -glicosidase e α -amilase, bem como o extrato etanólico do qual ela foi obtida.

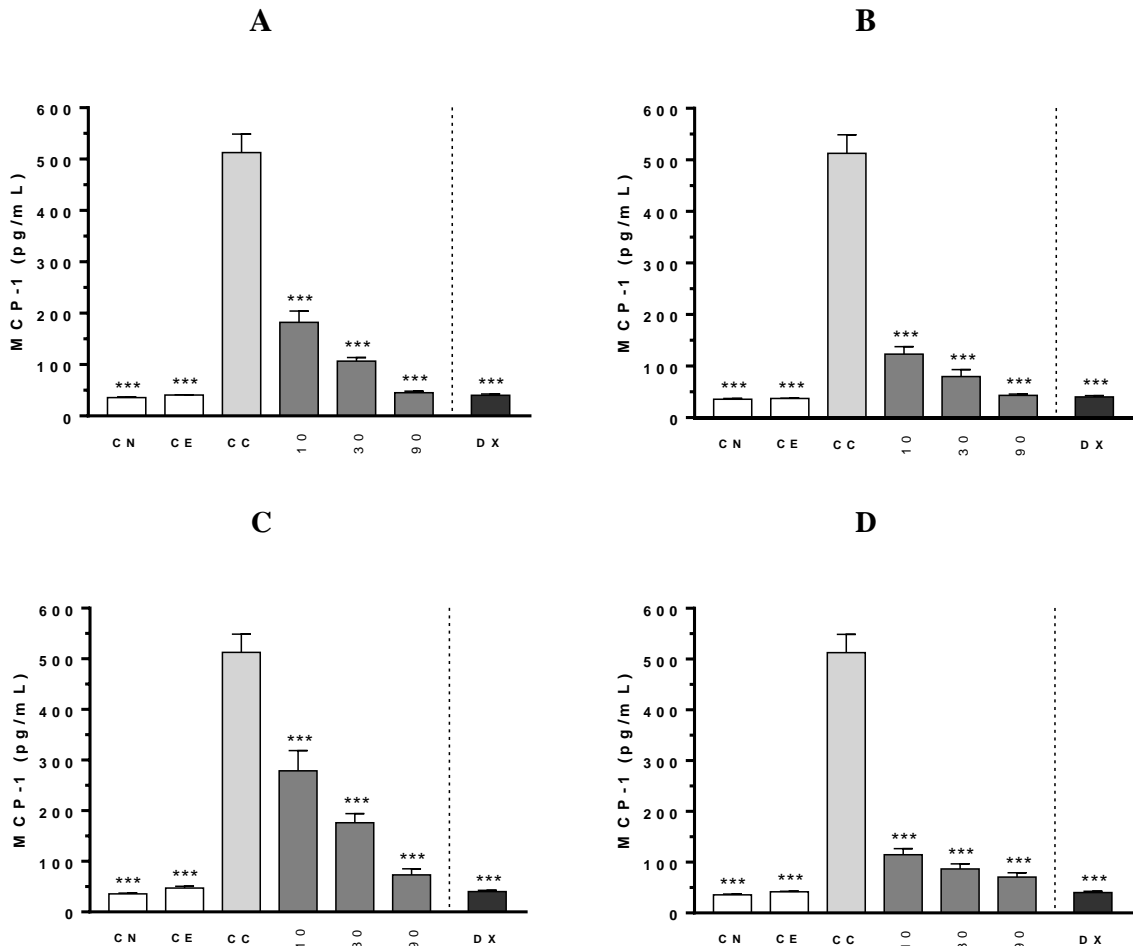


Figura 14 – Efeito das frações em acetato de etila e hidrometanólica dos extratos de folhas (A e B, respectivamente) e de cascas do fruto (C e D, respectivamente) de *C. brasiliense*, avaliados nas concentrações de 10, 30 e 90 $\mu\text{g/mL}$, sobre a liberação de MCP-1 em células THP-1 estimuladas por LPS, após 24h de incubação. CN, controle de células não estimulada; CE, controle de extrato; CC, controle de células estimuladas; e DX, dexametasona. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 12$ de dois conjuntos separados de experimentos com 6 replicatas em cada um deles). Diferenças significativas entre o controle de células estimuladas e todos os grupos de tratamento usando análise de variância simples (one way ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. DX (0,1 μM ; controle positivo).

5.3 Avaliação do extrato e frações EtOAc, 15C e 16C de cascas do fruto de *C. brasiliense* sobre a atividade das enzimas α -glicosidase e α -amilase

Diferentes abordagens terapêuticas são empregadas no tratamento do DMT2, incluindo a inibição das enzimas do trato gastrointestinal envolvidas na metabolização da glicose e do

amido. Assim, um ensaio baseado na triagem de potenciais compostos bioativos antihiperlicêmicos consiste na avaliação da inibição *in vitro* de α -glicosidase e α -amilase.

Conforme discutido na seção 5.4, o extrato etanólico de cascas do pequi é composto por ácidos fenólicos e taninos. Tendo em vista que a potencial atividade antidiabética das cascas poderia estar relacionada a esses constituintes, preparamos um extrato em acetona/água a partir das cascas do fruto de *C. brasiliense*, visando favorecer sua extração. Além disso, fracionamos esse extrato por cromatografia em coluna de Sephadex LH20 para obter as frações enriquecidas em taninos 15C e 16C, que juntamente com o extrato etanólico e fração EtOAc derivada foram avaliados nos ensaios *in vitro* de inibição das enzimas supracitadas (Figura 15 e 16).

A inibição de α -amilase reduz a digestão da amilose e amilopectina (carboidratos de cadeia longa do amido), reduzindo a absorção de glicose e, conseqüentemente, diminuindo a glicemia sanguínea (Nasab et al., 2020). A Figura 15 apresenta a porcentagem de inibição da

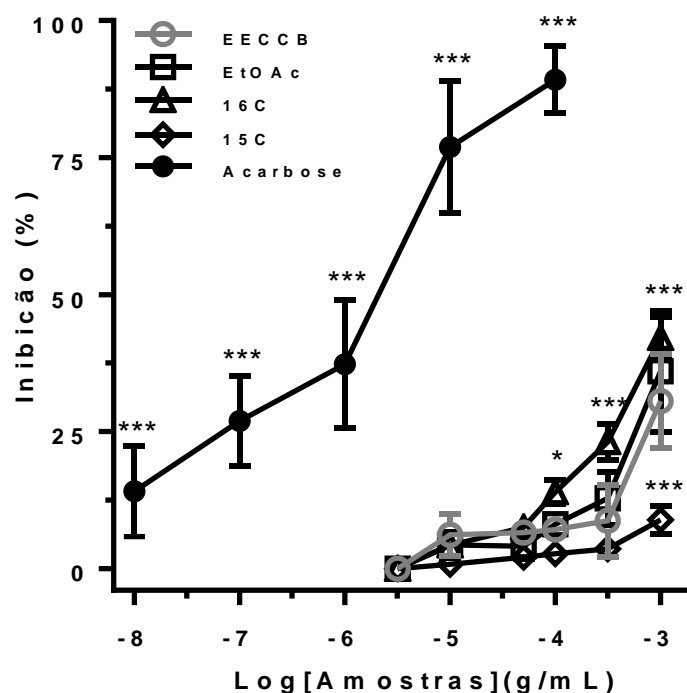


Figura 15 – Efeito do extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* (EECCB), da fração em acetato de etila (EtOAc), e das frações 15C e 16C sobre a atividade de α -amilase. Acarbose foi empregada como controle positivo. Os dados representam a média \pm SEM ($n = 12$ de 4 conjuntos separados de experimentos com 3 replicatas em cada um deles). Diferenças significativas entre EECCB e outros grupos de tratamento foram determinadas por análise de variância com dois fatores (*two way ANOVA*) seguida do teste de comparações múltiplas de *Dunnnett*; $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$.

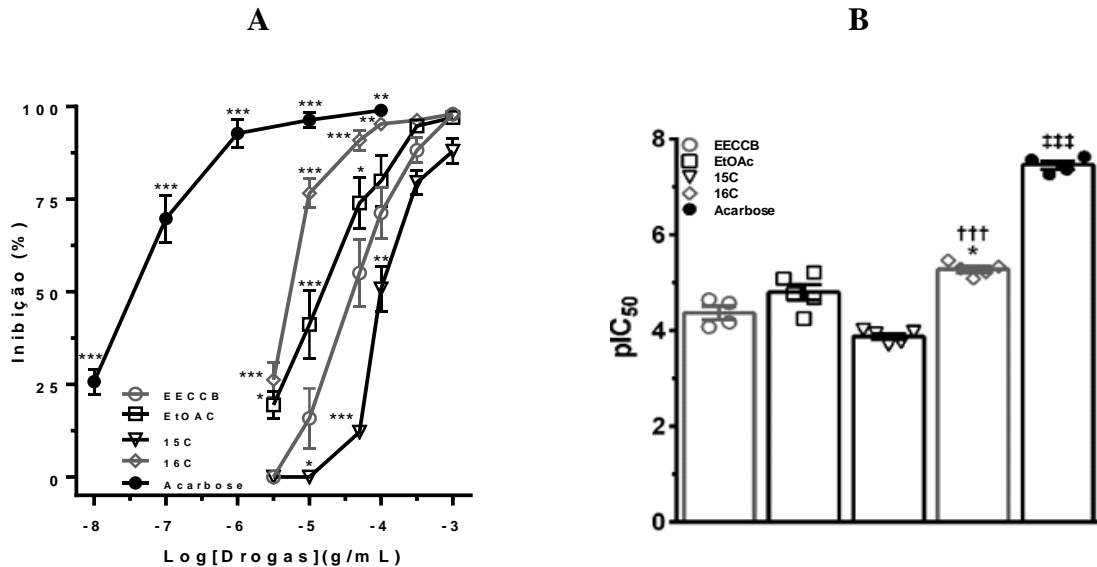
α -amilase induzida *in vitro* para diferentes concentrações das amostras ensaiadas (0,003-1 mg/mL). O extrato etanólico das cascas do fruto de *C. brasiliense* (EECCB) e as frações em EtOAc e 16C induziram aproximadamente 30% de inibição de α -amilase a 1 mg/mL, enquanto

a fração 15C promoveu inibição inferior a 10%. Por sua vez, o fármaco de referência acarbose apresentou efeito inibitório (Figura 15) compatível com registro anterior na literatura (Zhang et al., 2020).

A enzima α -glicosidase desempenha um papel fundamental na etapa final da digestão dos carboidratos e sua inibição representa uma abordagem terapêutica válida usada atualmente para controlar o DMT2 (Alongi & Anese, 2018). O extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* e a fração em EtOAc inibiram a enzima α -glicosidase de maneira concentração-dependente, com valores máximos de $97,9 \pm 1,4\%$ e $97,0 \pm 0,7\%$, respectivamente, na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$. As inibições observadas foram equivalentes àquela induzida pela acarbose ($99,0 \pm 1,1\%$) na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ (Figura 16 A). Os resultados de pIC_{50} do extrato ($4,4 \pm 0,3$) e da fração em EtOAc ($4,7 \pm 0,2$) de *C. brasiliense* indicaram inibições enzimáticas com potências semelhantes (Figura 16 B). Esses resultados corroboram os dados obtidos *in vitro* por nosso grupo de pesquisa, nos quais extratos de *C. brasiliense* (cascas do fruto) induziram aumentos significativos na utilização de glicose por células de fígado Chang ($282,2 \pm 3,4\%$) e por mioblastos L6 ($201,2 \pm 7,9\%$), em comparação aos grupos controle não tratados cujas respostas foram $100,0 \pm 5,4\%$ e $100,0 \pm 10,0\%$, respectivamente (Caldeira et al., 2021).

As frações enriquecidas em taninos, a saber, 15C e 16C, também tiveram seus efeitos inibitórios sobre a α -glicosidase avaliados *in vitro* (Figura 16 A e B). Ambas as frações inibiram a atividade de α -glicosidase de maneira concentração-dependente (Figura 16 A). Curiosamente, a fração 16C induziu um efeito inibitório mais potente do que o extrato ou a fração 15C, com o maior valor de pCI_{50} ($5,3 \pm 0,1$), conforme ilustrado na figura 16 B. Esses resultados demonstraram a relevância da fração 16C como fonte de inibidores de α -glicosidase. O fármaco controle acarbose apresentou valor de pCI_{50} ($7,5 \pm 0,1$) superior ao da fração 16C (Figura 16 B), em uma faixa de potência compatível com estudos publicados anteriormente (Zhang et al., 2020).

Portanto, pode-se afirmar que o extrato de cascas do fruto de *C. brasiliense* e suas frações em EtOAc e enriquecida em taninos (16C) se apresentaram como potenciais candidatos a serem testados em modelos *in vivo* de DMT2. Consequentemente, os mesmos foram eleitos para avaliação fitoquímica.



5.4 Avaliação fitoquímica das cascas do fruto de *C. brasiliense*

Os resultados dos ensaios biológicos *in vitro* (seção 5.3) indicaram que o extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* (EECCB) e as frações EtOAc e 16C, enriquecida em taninos, apresentaram atividade inibitória significativa sobre a α -glicosidase. Dessa forma, procedeu-se à avaliação da composição química dessas matrizes.

Inicialmente, foram obtidos os perfis cromatográficos de EECCB e da fração EtOAc por CLAE-DAD, e os picos principais tiveram seus espectros no UV registrados. A obtenção dos perfis cromatográficos é uma das etapas iniciais em um estudo fitoquímico, uma vez que fornece informações importantes sobre a composição do material em análise, como por exemplo, a complexidade da matriz e a polaridade dos constituintes. Ainda, esses perfis funcionam como uma impressão digital da espécie em estudo, sendo útil na comparação com outras coletas realizadas.

Em seguida, foram realizadas as caracterizações de EECCB e das frações EtOAc e 16C por CLUE-ESI-MS/MS. O princípio da espectrometria de massas (MS) consiste na ionização dos compostos químicos para gerar moléculas carregadas ou fragmentos que são em seguida detectados em função de sua razão massa-carga (m/z). A técnica de cromatografia de ultra eficiência (CLUE) acoplada à espectrometria de massas (MS/MS) com fonte de ionização por

electrospray (ESI) possui papel importante na análise e elucidação estrutural de compostos polifenólicos, como ácidos fenólicos e flavonoides, que são amplamente encontrados na espécie vegetal selecionada para estudo (Sparkman, 2001). Além disso, a técnica de CLUE-ESI-MS/MS permite caracterizar estruturas químicas mais complexas como proantocianidinas e taninos gálicos, que também estão presentes no pequi (Flamini, 2003).

5.4.1 Análise do perfil cromatográfico

O perfil das amostras foi obtido por CLAE de fase reversa com eluição em gradiente exploratório de acetonitrila e água (condições cromatográficas na seção 4.7.2). O perfil cromatográfico do extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* indicou a presença de substâncias com ampla faixa de polaridade, com o predomínio de constituintes de alta polaridade, com tempos de retenção (tR) inferiores a 15 minutos (Figura 17). O cromatograma obtido indica a presença de ácido gálico (pico 4, tR = 4,36 min, λ_{\max} = 271 nm) e ácido elágico (pico 11, tR = 20,87 min, λ_{\max} = 249,7 e 366,0 nm), identificados por comparação com substâncias de referência analisadas nas mesmas condições. Também foram observados alguns picos correspondentes a substâncias com máximos de absorção em torno de 270 nm (pico 3, tR = 4,01 min; pico 5, tR = 11,80 min; pico 6, tR = 12,82 min), compatíveis com ácidos fenólicos, bem como constituintes com espectros compatíveis com taninos hidrolisáveis (pico 2, tR = 3,21 min, λ_{\max} = 275,7 nm; pico 7, tR = 13,88 min, λ_{\max} = 217,8 e 266,2 nm; pico 8, tR = 15,29 min, λ_{\max} = 219,0 e 275,7 nm; e pico 10, tR = 18,90 min, λ_{\max} = 276,9 nm) (Fecka & Cisowski, 2005). Um flavonoide (pico 9, tR = 15,63 min, λ_{\max} = 255,6 e 363,8 nm) e um composto alifático com espectro compatível com substituinte carboxílico ou aldeídico (pico 1, tR = 2,36 min, λ_{\max} = 210,8 nm) também foram detectados.

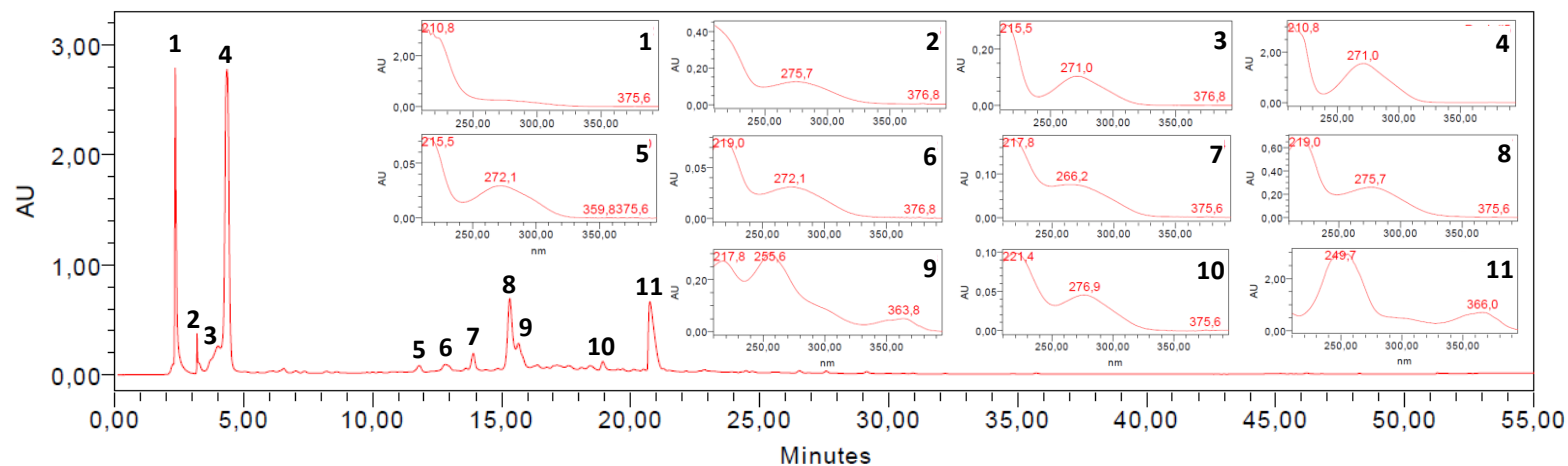


Figura 17 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* registrado em 210 nm. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental seção 4.7. **1**, substância alifática; **3**, **5** e **6**, ácidos fenólicos; **4**, ácido gálico; **2**, **7**, **8** e **10**, taninos hidrolisáveis; **9**, flavonoide; **11**, ácido elágico.

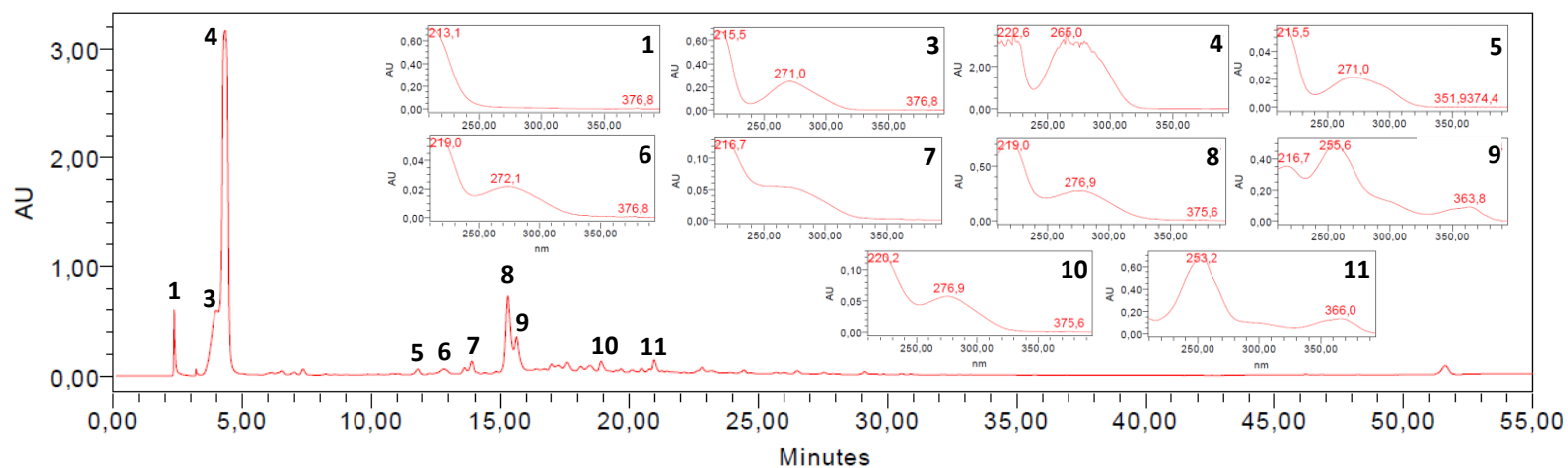


Figura 18 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a fração EtOAc do extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* registrado em 210 nm. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental seção 4.7. **1**, substância alifática; **3**, **5** e **6**, ácidos fenólicos; **4**, ácido gálico; **7**, **8** e **10**, taninos hidrolisáveis; **9**, flavonoide; **11**, ácido elágico.

O perfil cromatográfico da fração em EtOAc revelou a presença dos mesmos compostos encontrados no extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense*, com exceção do pico 2, sugestivo de tanino hidrolisável (Figura 18). Verificou-se nessa fração a presença de ácido gálico (pico 4, tR = 4,34 min, λ_{\max} = 265 nm) e ácido elágico (pico 11, tR = 20,96 min, λ_{\max} = 253,2 e 366,0 nm). Também foram observados os picos compatíveis com ácidos fenólicos (pico 3, tR = 4,00 min, λ_{\max} = 271,0 nm; pico 5, tR = 11,82 min, λ_{\max} = 271,0 nm; pico 6, tR = 12,81 min; λ_{\max} = 272,1 nm), bem como os constituintes compatíveis com taninos hidrolisáveis (pico 7, tR = 13,89 min, λ_{\max} = 216,7 e 266,0 nm; pico 8, tR = 15,30 min, λ_{\max} = 219,0 e 276,9 nm; e pico 10, tR = 18,90 min, λ_{\max} = 276,9 nm). O constituinte compatível com flavonoide (pico 9, tR = 15,64 min; λ_{\max} = 255,6 e 363,8 nm) e composto alifático (pico 1, tR = 2,36 min; λ_{\max} = 213,1 nm) também se mantiveram presentes na fração em EtOAc.

Comparativamente ao extrato de cascas do fruto, a fração em EtOAc de *C. brasiliense* concentrou os constituintes relativos aos picos 3 (ácido fenólico) e 4 (ácido gálico). Mantiveram-se inalteradas as proporções dos picos 8 (tanino hidrolisável) e 9 (flavonoide).

5.4.2 Caracterização por CLUE-ESI-MS/MS

A abordagem adotada para a caracterização química do extrato de cascas do fruto de *C. brasiliense*, bem como das frações EtOAc e 16C derivadas deste, consistiu na identificação dos constituintes químicos isolados e/ou relatados para o gênero *Caryocar*. No quadro 9 a seguir encontram-se listados os constituintes químicos, dados espectrométricos e atividades biológicas descritas para espécies de *Caryocar* relatados na literatura.

De acordo com o quadro 9, dentre as principais substâncias polifenólicas encontradas no gênero estão ácidos fenólicos como ácido gálico, ácido elágico e ácido *p*-hidroxibenzoico; os flavonoides quercetina, isoquercetina e rutina; e os taninos glicogalina, brevifolina ácido carboxílico, corilagina e geraniina. Importante destacar que, para esses compostos, foram observadas as seguintes propriedades biológicas: atividade vasorelaxante, antioxidante, antifúngica, antimicrobiana e anti-Leishmania. Ressalta-se como promissoras as atividades vasorelaxante e antioxidante, visto que são importantes na prevenção e controle das comorbidades frequentemente presentes em indivíduos com DMT2 como a hipertensão, estado inflamatório e doença cardiovascular aterosclerótica.

Quadro 9 – Composição química, dados espectrométricos e atividades biológicas descritos na literatura para espécies do gênero *Caryocar* (continua)

Espécie / Parte	Substâncias identificadas	Identificação por CLUE-MS/MS (<i>m/z</i>) ou RMN		Massa molecular (g/mol)	Atividade biológica	Referência
		[M-H] ⁻	[M+H] ⁺			
<i>Caryocar brasiliense</i> (folhas)	1 - ácido gálico ¹ 2 - quercetina ²	1 - 169,0; 125,2 2 - 301,3; 150,8	2 - 303,0	1 - 170,0 2 - 302,0	Vaso-relaxação	Oliveira et al., 2012
	1 - friedelina ⁷ 2 - friedelinol ⁷ 3 - β-amirina ⁷ 4 - β-sitosterol ⁹ 5 - estigmasterol ⁹ 6 - ácido elágico ¹	RMN de ¹ H e ¹³ C (1D e 2D)		1 - 426,4 2 - 428,4 3 - 426,4 4 - 414,4 5 - 412,4 6 - 302,0	Não avaliada	Oliveira et al., 1968
<i>Caryocar brasiliense</i> (cascas do fruto)	1 - ácido gálico ¹ 2 - ácido quínico ³ 3 - brevifolina ácido carboxílico ¹⁰ 4 - ácido elágico ¹ 5 - glicogalina ¹ 6 - ácido elágico xilosídeo ¹ 7 - ácido elágico ramnosídeo ¹ 8 - ácido elágico glicosídeo ¹ 9 - corilagina ¹⁰ 10 - geraniina ¹⁰	1 - 169,0; 125; 79 2 - 191,1; 127; 93; 85 3 - 291,0; 247; 219; 191 4 - 301,0; 284; 145 5 - 331,1; 241; 169 6 - 433,0; 301 7 - 447,1; 301 8 - 463,1; 301 9 - 633,1; 301 10 - 951,1; 301	Não realizado	1 - 170,0 2 - 192,1 3 - 292,0 4 - 302,0 5 - 332,1 6 - 434,0 7 - 448,1 8 - 464,1 9 - 634,1 10 - 952,1	Antifúngica	Breda et al., 2016
	1 - ácido gálico ¹	1 - 169,0; 125,0	Não realizado	1 - 170,0	Antioxidante e antimicrobiana	Rocha et al., 2015
	1 - galato de etila ¹ 2 - 5-hidroximetilfurfural ⁴ 3 - ácido gálico ¹ 4 - chiquimato de metila ⁵ 5 - β-D-frutopiranosose ⁶ 7 - α-D-glicose ⁶ 9 - lupeol ⁷ 10 - ácido oléico ⁸ 11 - β-sitosterol ⁹ 12 - estigmasterol ⁹	RMN de ¹ H e ¹³ C (1D e 2D)		1 - 198,1 2 - 126,0 3 - 170,0 4 - 188,1 5 - 180,1 7 - 180,1 9 - 426,4 10 - 282,3 11 - 414,4 12 - 412,4	Antioxidante e antimicrobiana	Ascari et al., 2010

Quadro 9 – Composição química, dados espectrométricos e atividades biológicas descritos na literatura para espécies do gênero *Caryocar* (conclusão)

Espécie / Parte	Substâncias identificadas	Identificação por CLUE-MS/MS (m/z) ou RMN		Massa molecular (g/mol)	Atividade biológica	Referência
		[M-H] ⁻	[M+H] ⁺			
<i>Caryocar brasiliense</i> (cascas do fruto)	1 - ácido p-hidroxibenzóico ¹ 2 - ácido gálico ¹ 3 - ácido quínico ³ 4 - quercetina ² 5 - quercetina 3-O-arabinose ²	1 - 137 2 - 169; 125; 79 3 - 191; 173; 127; 111; 93 4 - 301; 179; 151; 121 5 - 433; 301	Não realizado	1 - 138,0 2 - 170,0 3 - 192,1 4 - 302,0 5 - 434,1	Antioxidante	Roesler et al., 2008
<i>Caryocar coriaceum</i> (cascas do fruto)	1 - rutina ² 2 - isoquercetina ²	Identificação por CLAE-UV usando substâncias de referência		1 - 610,2 2 - 464,1	Antioxidante, antifúngica e anti-Leishmania	Alves et al., 2017
<i>Caryocar villosum</i> (cascas do caule)	1 - ácido gálico ¹ 2 - ácido elágico ramnosídeo ¹ 3 - ácido elágico ¹ 4 - corilagina ¹⁰ 5 - tercatina ¹⁰ 6 - ácido quebulágico ¹⁰ 7 - putranjivaina A ¹⁰	RMN de ¹ H e ¹³ C (1D e 2D)		1 - 170,0 2 - 448,1 3 - 302,0 4 - 634,1 5 - 786,6 6 - 954,7 7 - 1084,8	Inibição da tirosinase	Magid et al., 2008

A) Compostos fenólicos: ¹ Ácido orgânico ou éster de ácido, ² Flavonoide, ¹⁰ Tanino; B) Poliol cíclico: ³ Ácido orgânico; ⁴ Derivado contendo anel furano; D) Derivados do ácido chiquímico: ⁵ Ácido orgânico ou éster de ácido; E) ⁶ Monossacarídeo; F) Terpenos: ⁷ Triterpeno; G) ⁸ Ácido graxo de cadeia longa; H) ⁹ Fitoesterol.

A seguir, foram realizadas as análises por CLUE-ESI-MS/MS do extrato de cascas do fruto de *C. brasiliense* e das frações EtOAc e 16C. O objetivo inicial dessas análises foi identificar a presença de qualquer uma das substâncias descritas anteriormente para o gênero, uma vez que foram relatadas, para as mesmas, atividades biológicas promissoras no tratamento do DMT2 e suas comorbidades.

5.4.2.1 Extrato de cascas do fruto de *C. brasiliense*

O extrato de cascas do fruto de *C. brasiliense* foi analisado por CLUE-ESI-MS/MS (vide parte Experimental seção 4.10.1), sendo obtidos os perfis cromatográficos com detecção no DAD em 210 nm, e de íons totais (TIC) nos modos negativo e positivo de ionização (Figura 19).

A partir dos resultados obtidos foram identificados os tempos de retenção (tR) das substâncias, os comprimentos de onda máximos de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis) e os íons positivos e negativos para cada uma delas. Posteriormente, foram realizados experimentos de CLUE-ESI-MS/MS, nos quais os íons precursores negativos selecionados foram fragmentados, sendo obtidos os íons produto derivados destes. Os resultados obtidos foram então comparados com dados espectrométricos relatados para substâncias descritas no gênero *Caryocar* (Quadro 9). As substâncias identificadas e os dados espectrométricos obtidos estão dispostos na Tabela 4.

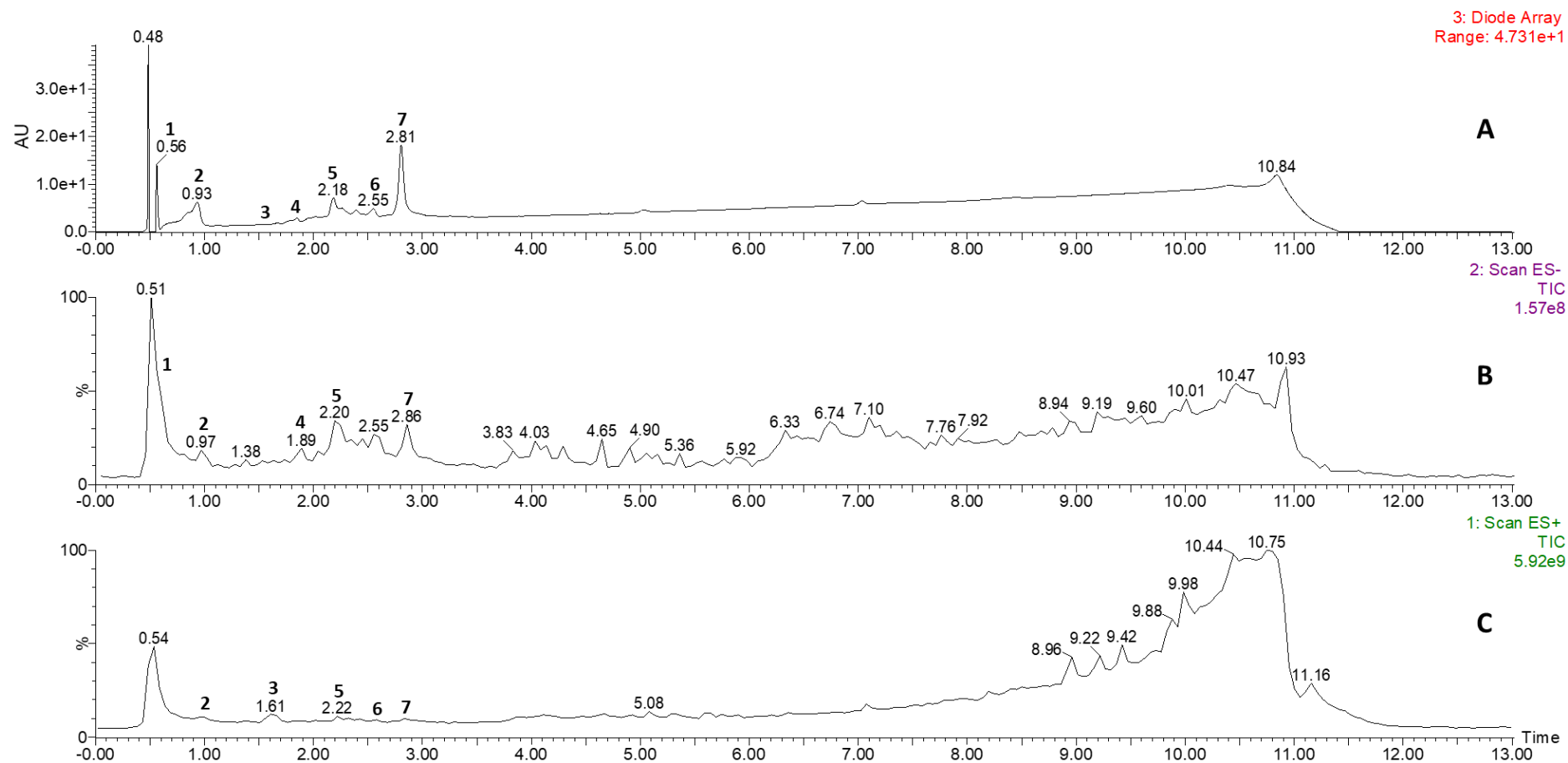


Figura 19 – Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-MS/MS para o extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* (A) Detecção no DAD em 210 nm; (B) íons totais (TIC) no modo negativo de ionização (ESI⁻); (C) íons totais (TIC) no modo positivo de ionização (ESI⁺). Condições de análise: vide parte Experimental seção 4.10.1. Pico 1 (tR = 0,56 min); 2 (tR = 0,93 min); 3 (tR = 1,55 min); 4 (tR = 1,85 min); 5 (tR = 2,18 min); 6 (tR = 2,55); 7 (tR = 2,81).

Tabela 4 – Resultados da análise do extrato de cascas do fruto de *C. brasiliense* por CLUE-ESI-MS/MS

Pico	tR (min)	UV-Vis (λ_{\max})	[2M-H] ⁻ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M-2H] ²⁻ (m/z)	Íons produto (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	MM (g/mol)	Substância sugerida	Referência
1	0,56	217, 271	-	331	-	241 (20), 211 (48), 169 (100)	315 (40) ^I	332	Glicogalina	Breda, 2016
2	0,93	215, 271	339 (5)	169	-	125 (100)	171	170	Ácido gálico	Rocha et al., 2015; Sudjaroen, 2012
3	1,68	215, 270	-	-	-	-	158	157	NI	-
4	1,85	216, 275	-	633	-	463 (18), 301 (100), 275 (22)	-	634	Corilagina	Breda, 2016; Sudjaroen, 2012
5	2,18	218, 275	-	933 (55)	466 (45)	-	-	934	Geraniina	Sudjaroen, 2012
5a,5b ^{II}	2,18	218, 275	-	951 (100)	-	933 (40), 463 (2), 301 (100), 275 (12)	783 (100) ^{III} ; 975 (5) ^{IV}	952	Geraniina (hemiacetais)	Breda, 2016; Perera, 2012; Sudjaroen, 2012
6	2,55	218, 276	-	965	-	-	797 (90) ^V , 783 (25) ^{VI}	966	Elagitanino não identificado	-
7	2,81	253, 367	603 (10)	301	-	284 (100), 257 (5), 229 (15)	303	302	Ácido elágico	Ascari, 2013;

tR = tempo de retenção; min = minutos; UV-Vis = ultravioleta-visível; λ_{\max} = comprimento de onda máximo de absorção; [M-H]⁻ = íon negativo; [M+H]⁺ = íon positivo; MM = massa molecular; m/z = relação massa-carga; NI = não identificada; ^I[M+H-H₂O]⁺; ^{II}formas hemiacetálicas da geraniina; ^{III}[M-H-O-galoila]⁺; ^{IV}[M+Na]⁺; ^V[M-O-galoil]⁺; ^{VI}[M-183]⁺.

5.4.2.1.1 Identificação da glicogalina

O pico 1 apresentou um espectro de varredura no UV-Vis com λ_{max} em 217 e 271 nm (Figura 20 A), sugerindo tratar-se de uma substância contendo grupamento fenólico, visto que estes geralmente possuem λ_{max} nas faixas de 215-217 nm e 271-275 nm (Zhang et al., 2001). O espectro de massas no modo de ionização negativo obtido para o pico 1 ($t_R = 0,56$ min) forneceu os íons negativos de m/z 331 $[\text{M-H}]^-$ e m/z 179 $[\text{M-H-152}]^-$ (Figura 20 B). Enquanto seu espectro de massas no modo de ionização positivo exibiu o íon positivo de m/z 315 $[\text{M+H-H}_2\text{O}]^+$ (Figura 20 D). O íon de m/z 331 $[\text{M-H}]^-$ pode perder uma unidade de glicose (162 Da) originando o íon fragmento galoil de m/z 169 $[\text{M-H-162}]^-$ ou sofrer fragmentação na sua porção glicosídica, com a perda dos fragmentos de 90 Da e 120 Da para formar, respectivamente, os íons de m/z 241 $[\text{M-H-90}]^-$ e m/z 211 $[\text{M-H-120}]^-$ (Figura 20 C). Com base nas fragmentações e perdas observadas conclui-se que o íon de m/z 331 $[\text{M-H}]^-$ é compatível com uma monogaloilexose, sugerindo tratar-se da glicogalina (Berardini et al., 2004).

5.4.2.1.2 Identificação do ácido gálico

O espectro de varredura no UV-Vis obtido para o pico 2 ($t_R = 0,93$ min), apresentado na Figura 21 A, indicou valores de λ_{max} de 215 e 271 nm, sugerindo tratar-se de um ácido fenólico (Yang et al., 2012). O espectro de massas em ESI^- obtido para este constituinte exibiu os íons negativos de m/z 169 $[\text{M-H}]^-$ e m/z 339 $[\text{2M-H}]^-$, referentes às unidades monomérica e dimérica, respectivamente (Figura 21 B). Por sua vez, o espectro de massas em ESI^+ forneceu o íon positivo de m/z 171 $[\text{M+H}]^+$ (Figura 21 D). Silva et al. (2011) relataram a fragmentação do íon negativo de m/z 169 $[\text{M-H}]^-$ obtido para o ácido gálico, que ao sofrer a perda neutra de CO_2 produziu o íon fragmento de m/z 125 $[\text{M-H-44}]^-$ (Figura 21 C). Com base no perfil de fragmentação observado, pode-se inferir que o íon de m/z 169 $[\text{M-H}]^-$ é compatível com o ácido gálico, cuja identidade foi posteriormente confirmada, por comparação com substância de referência, analisada nas mesmas condições.

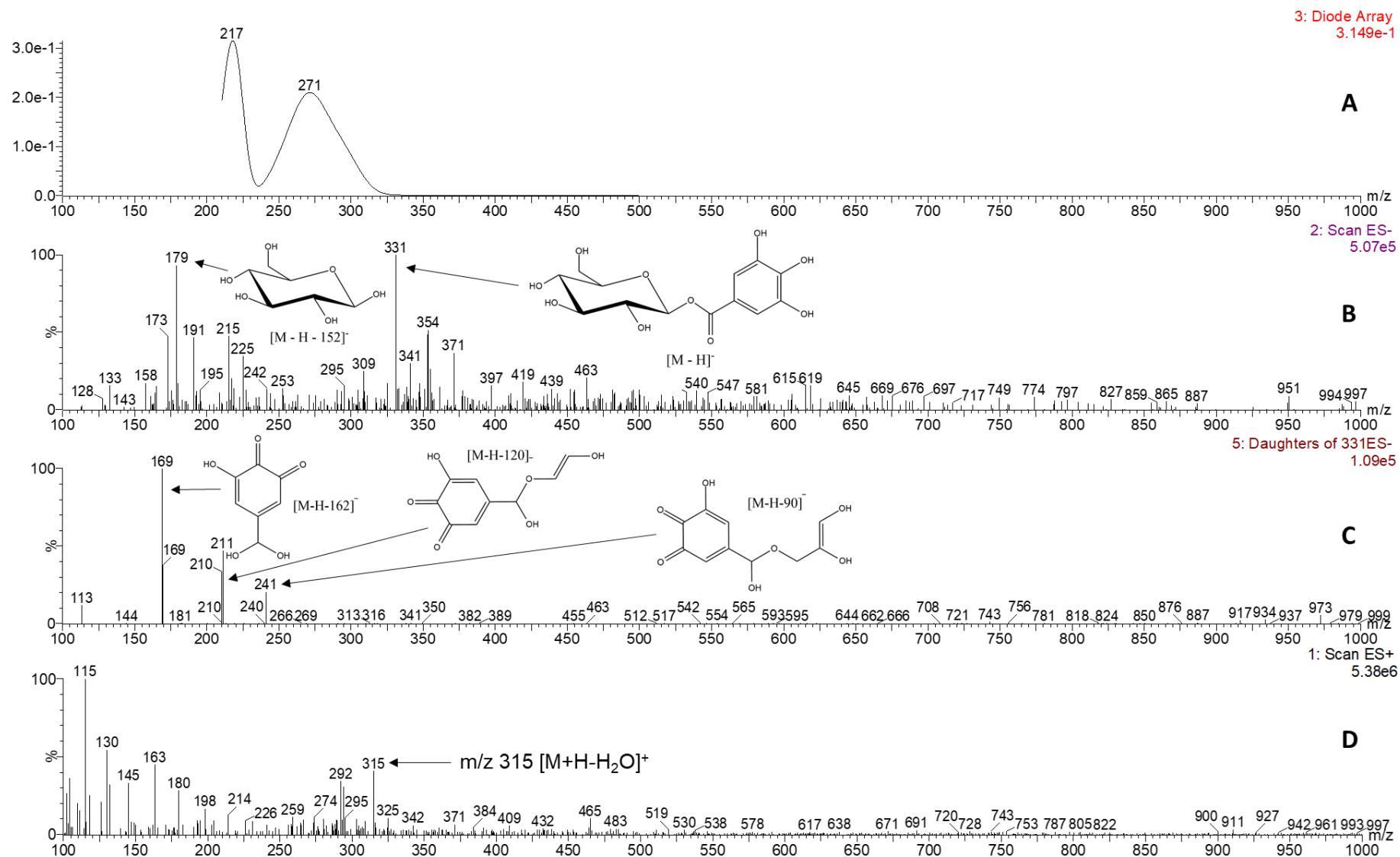


Figura 20 – Espectros obtidos por CLUE-ESI-MS/MS para o extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense*. (A) Espectro no UV-Vis do pico 1, tR = 0,56 min; (B) Espectro de massas em ESI⁻ para o pico 1, tR = 0,56 min; (C) Espectro de íons produto em ESI⁻ do íon precursor de m/z 331 [M-H]⁻, tR = 0,64 min. (D) Espectro de massas em ESI⁺ para o pico 1, tR = 0,56 min. Condições de análise: vide parte Experimental seção 4.10.1.

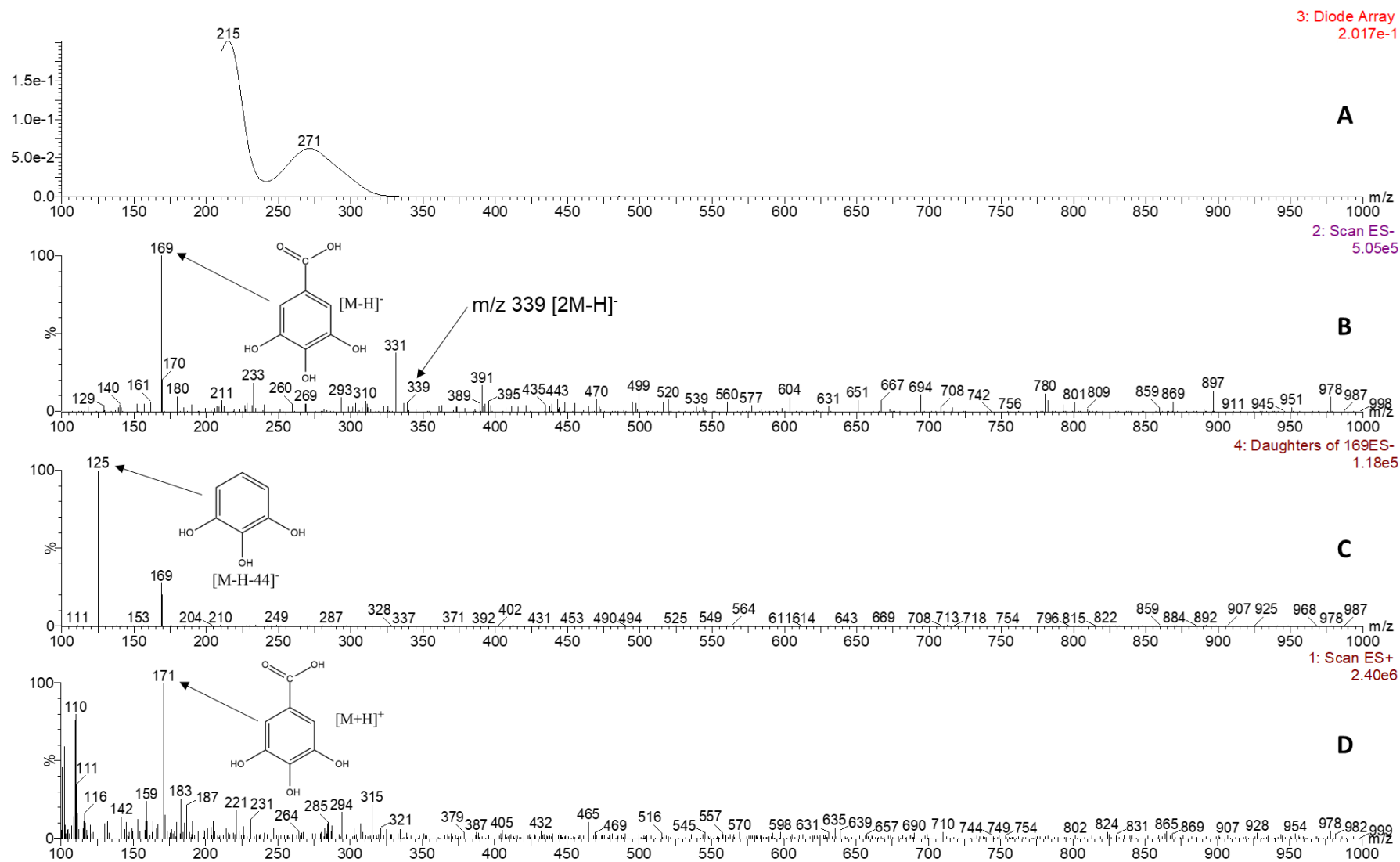


Figura 21 – Espectros obtidos por CLUE-ESI-MS/MS, para o extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense*. (A) Espectro no UV-Vis do pico 2, tR = 0,93 min; (B) Espectro de massas em ESI obtido para o pico 2, tR = 0,97 min; (C) Espectro de íons produto em ESI do íon de m/z 169 [M-H]⁻, tR = 1,12 min; (D) Espectro de massas em ESI⁺ para o pico 2, tR = 0,95 min. Condições de análise: vide parte Experimental seção 4.10.1.

5.4.2.1.3 Identificação da corilagina

O pico 4 apresentou um espectro de varredura no UV-Vis com valores de λ_{\max} em 216 e 275 nm (Figura 22 A). Os dois máximos encontram-se situados em torno de 220 nm e 270-280 nm, respectivamente, valores típicos de absorção de taninos (Salminen, et al., 1999). O espectro de massas em ESI⁻ do pico 4 (Figura 22 B), eluído em 1,85 min, forneceu o íon negativo de m/z 633 [M-H]⁻ que, após fragmentação (Figura 22 C), perdeu uma unidade de ácido gálico (170 Da) para originar o íon de m/z 463 [M-H-170]⁻. Os íons fragmento de m/z 301 [M-H-170-162]⁻ e m/z 275 [M-H-170-188]⁻ foram gerados, respectivamente, a partir da eliminação da hexose (162 Da) e unidade C₇H₈O₆ (188 Da) do íon fragmento de m/z 463 [M-H-170]⁻. Embora não detectado no espectro de íons produto, o íon de m/z 169 (C₇H₅O₅⁻) foi relacionado ao grupo galoil. Os íons de m/z 301 (C₁₄H₅O₈⁻) e m/z 275 (C₁₃H₇O₇⁻) foram associados ao grupo hexahidroxidifenoila (HHDP). Com base nas fragmentações e perdas observadas conclui-se que o íon de m/z 633 [M-H]⁻ é compatível com um elagitanino (tanino hidrolisável), sugerindo tratar-se da corilagina (Yisimayili et al., 2019). A proposta de fragmentação da corilagina foi representada na figura 23.

5.4.2.1.4 Identificação da geraniina

O espectro no UV-Vis obtido para o pico 5 (Figura 24 A) apresentou valores de λ_{\max} em 218 e 275 nm, sugerindo tratar-se de um tanino (Salminen, et al., 1999). O espectro de massas no modo negativo de ionização do pico 5, eluído em 2,18 min, exibiu o íon negativo de m/z 951 [M-H]⁻ (Figura 24 B). Por outro lado, no espectro de massas em ESI⁺ do constituinte 5 foram detectados o íon positivo de m/z 783 [M-H-O-galoil]⁺ e o íon aduto de sódio de m/z 975 [M+Na]⁺ (Figura 24 D). A fragmentação do íon de m/z 951 [M-H]⁻ (Figura 24 C) resultou em sua desidratação, com a perda neutra de H₂O (18 Da), produzindo o íon fragmento de m/z 933 [M-H-18]⁻. Também se observou a perda sequencial de uma unidade de ácido gálico (170 Da) e do grupo desidrohexaidroxidifenoila (DHHDP), com 318 Da, originando o íon fragmento de m/z 463 [M-H-170-318]⁻. Por sua vez, o íon negativo de m/z 463 sofre a perda de uma hexose (162 Da) e da unidade C₇H₈O₆ (188 Da) produzindo, respectivamente, os íons fragmento de m/z 301 (C₁₄H₅O₈⁻) e m/z 275 (C₁₃H₇O₇⁻), fragmentações essas anteriormente descritas para a geraniina (Hernandez et al. 2017). A partir do perfil de fragmentação e das perdas observadas, pode-se inferir que o íon precursor de m/z 951 [M-H]⁻ é compatível com um elagitanino, sugerindo, neste caso, se tratar da forma hemiacetálica da geraniina (Chang et al., 2019). Uma proposta para a fragmentação da geraniina encontra-se representada na figura 25.

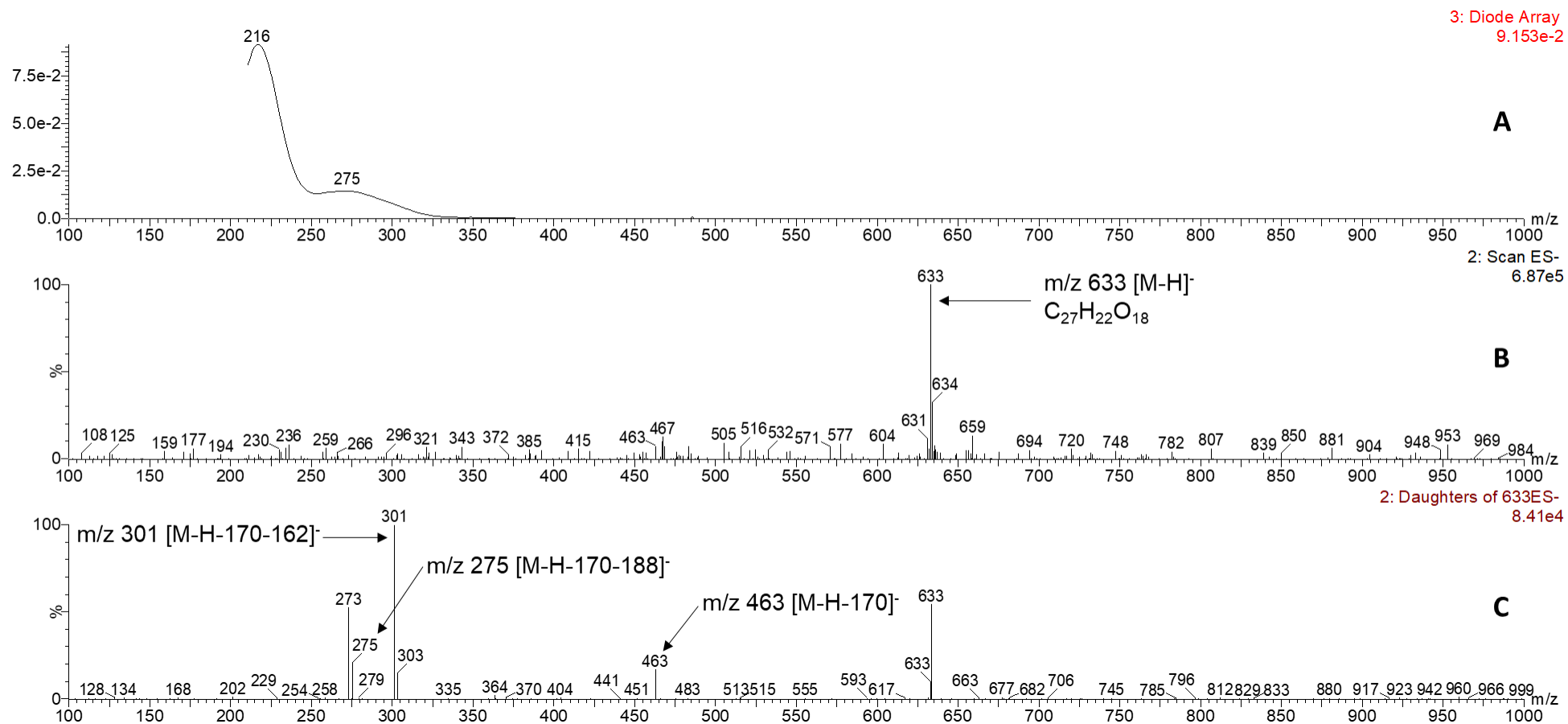


Figura 22 – Espectros obtidos por CLUE-ESI-MS/MS para o extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense*. (A) Espectro no UV-Vis obtido para o pico 4, tR = 1,85 min; (B) Espectro de massas em ESI⁻ obtido para o pico 4, tR = 1,89 min; (C) Espectro de íons produto em ESI⁻ do íon de m/z 633 [M-H]⁻, tR = 1,99 min. Condições de análise: vide parte Experimental seção 4.10.1.

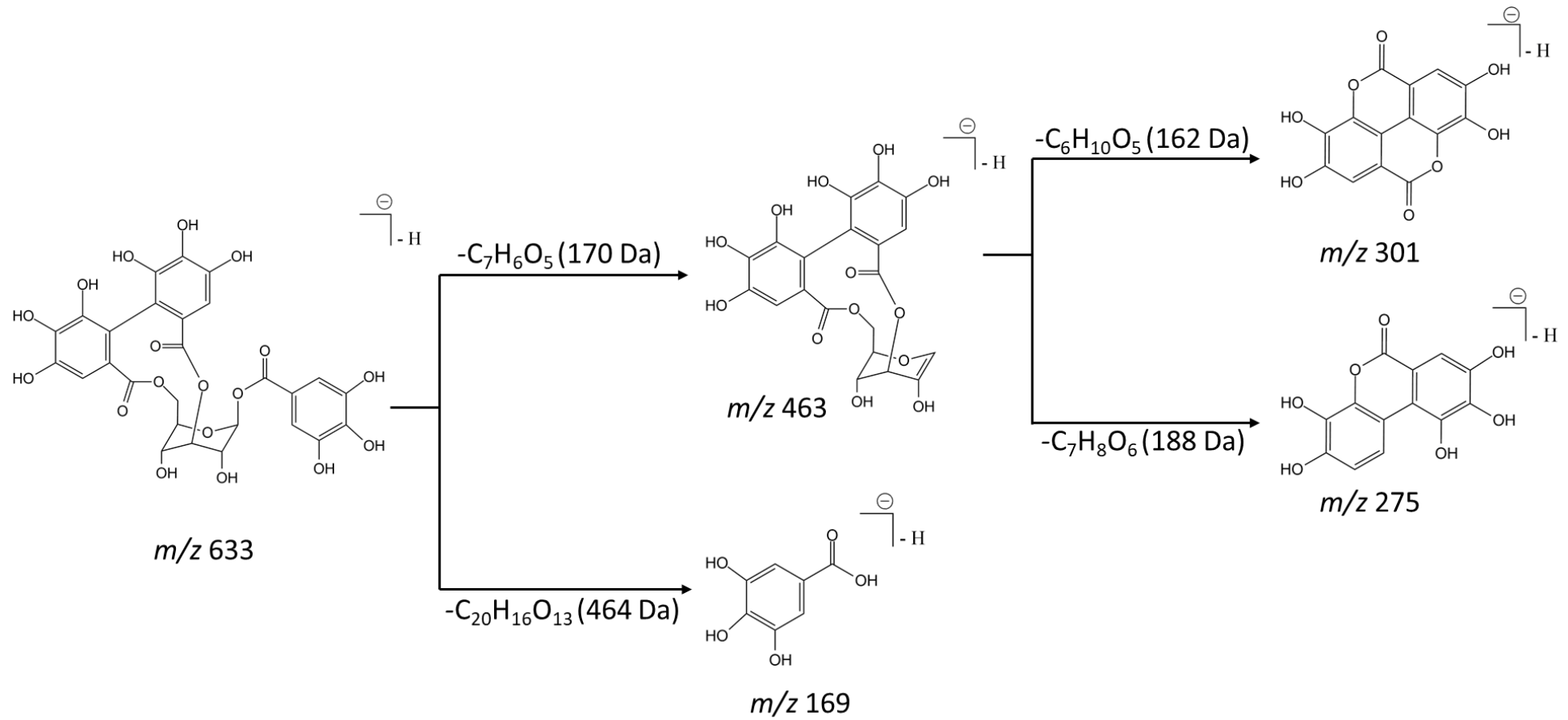


Figura 23 – Proposta de fragmentação do íon precursor negativo de m/z 633 $[M-H]^-$ referente à substância corilagina.

Fonte: Adaptado pelo autor baseado em Yisimayili et al. (2019).

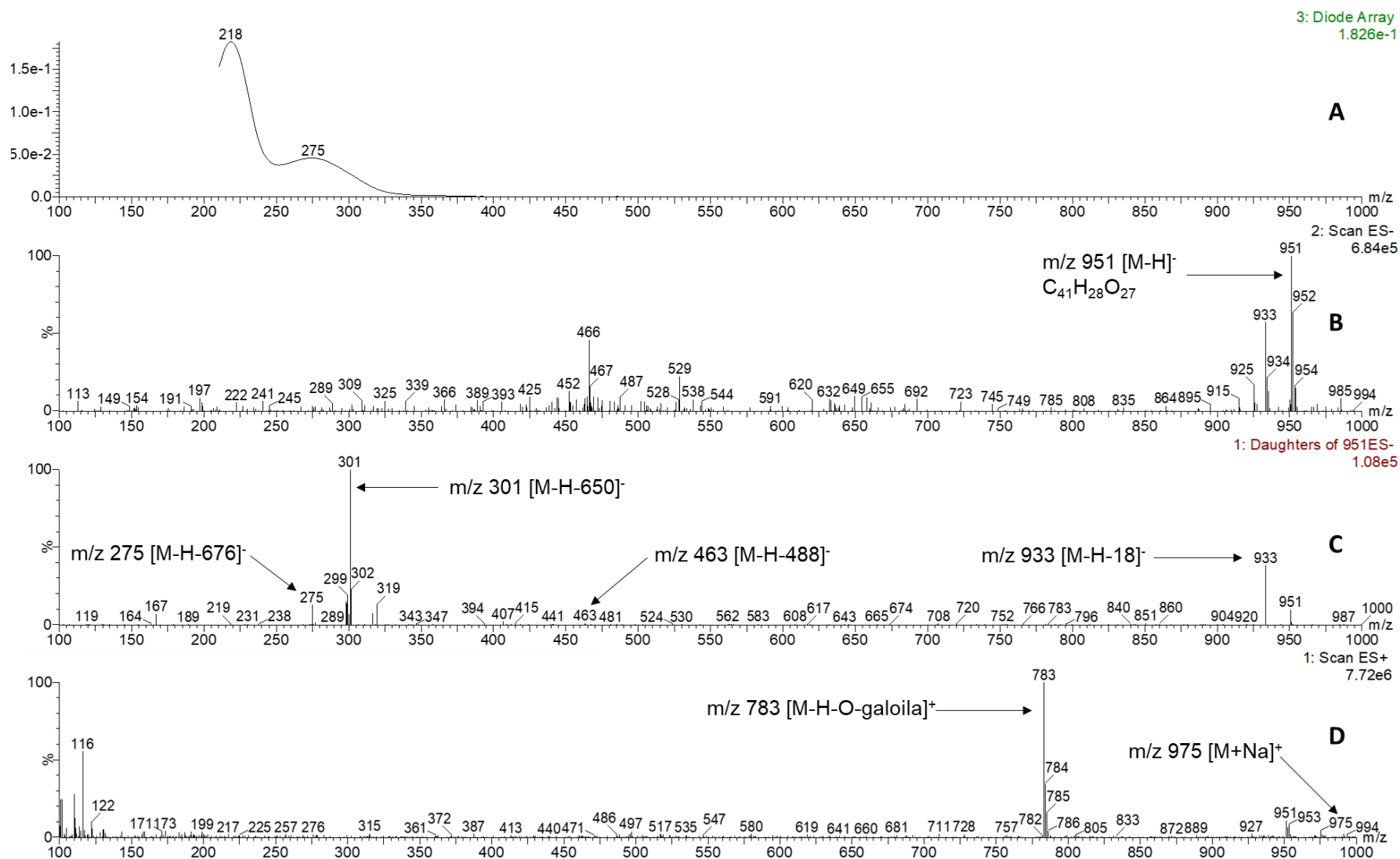


Figura 24 – Espectros, obtidos por CLUE-ESI-MS/MS, para o extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense*. (A) Espectro no UV-Vis obtido para o pico 5, tR = 2,18 min; (B) Espectro de massas em ESI⁻ obtido para o pico 5, tR = 2,20 min; (C) Espectro de íons produto em ESI⁻ do íon precursor de m/z 951 [M-H]⁻, tR = 2,38 min; (D) Espectro de massas em ESI⁺ obtido para o pico 5, tR = 2,22 min. Condições de análise: vide parte Experimental seção 4.10.1.

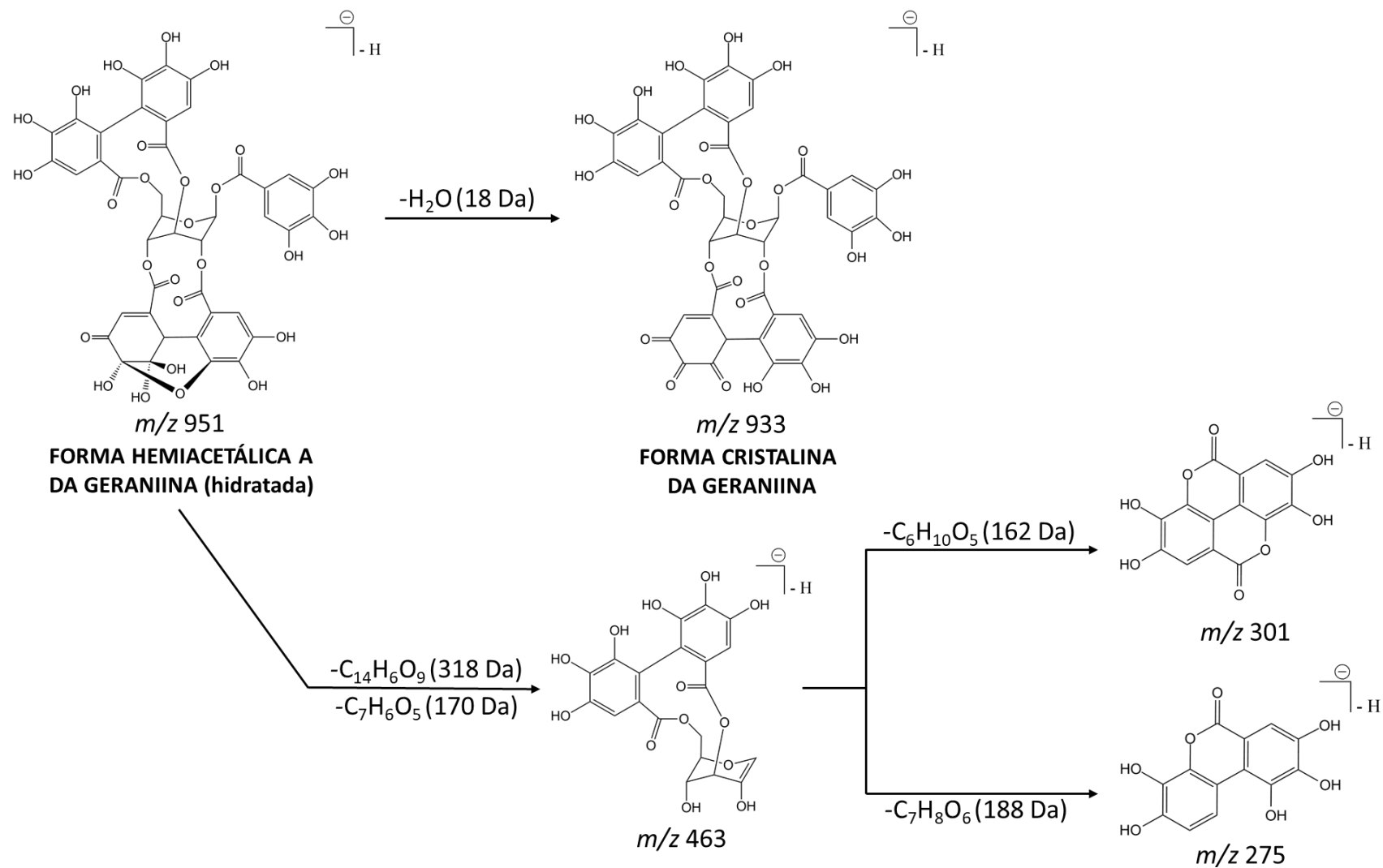


Figura 25 – Proposta de fragmentação do íon precursor negativo de m/z 951 [M-H]⁻ referente à forma hemiacetálica A da geraniina (hidratada).

Fonte: Adaptado pelo autor baseado em Chang et al. (2019).

5.4.2.1.5 Identificação do ácido elágico

O espectro no UV-Vis obtido para o pico 7 apresentou λ_{max} em 253 e 367 nm (Figura 26 A), sugerindo tratar-se de um ácido polifenólico da classe dos elagitaninos, visto que possuem valores máximos de absorção em torno de 253 e 367 nm (Hanhineva et al., 2008). O espectro de massas em ESI⁺ do pico 7 (tR = 2,81 min) exibiu o íon positivo de m/z 303 [M+H]⁺ (Figura 26 D). Sob outra perspectiva, no espectro de massas em ESI⁻ deste constituinte (Figura 26 B), foram detectados o íon negativo de m/z 301 [M-H]⁻ e íon dimérico de m/z 603 [2M-H]⁻. O íon precursor de m/z 301 [M-H]⁻, em seu processo de fragmentação, sofreu a perda sequencial de uma unidade CO₂ (44 Da) e unidade CO (28 Da) para originar os íons fragmento de m/z 257 [M-H-44]⁻ e m/z 229 [M-H-44-28]⁻, respectivamente. Outra fragmentação observada para o íon de m/z 301 [M-H]⁻ resulta da perda de uma unidade H₂O (18 Da), produzindo o íon fragmento de m/z 284 [M-18]⁻ (Figura 26 C). Com base nas fragmentações e perdas observadas concluiu-se que o íon de m/z 301 [M-H]⁻ é compatível com o ácido elágico (Djoukeng et al. 2007; Yisimayili et al., 2019), identificação esta confirmada pela comparação com substância de referência analisada nas mesmas condições.

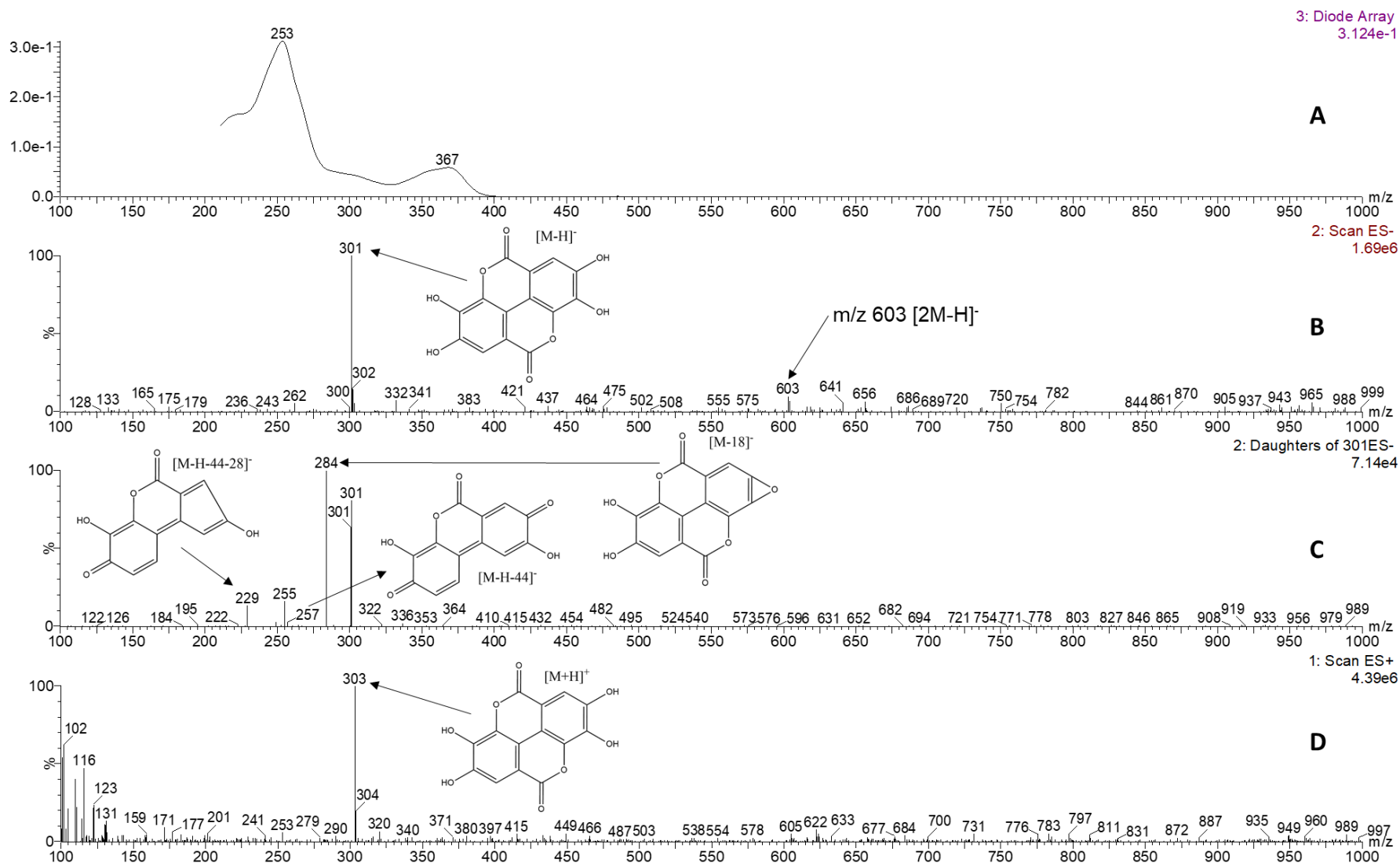


Figura 26 – Espectros obtidos por CLUE-ESI-MS/MS, para o extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense*. (A) Espectro obtido no UV-Vis para o pico 7, tR = 2,81 min; (B) Espectro de massas em ESI⁻ obtido para o pico 7, tR = 2,86 min; (C) Espectro de íons produto em ESI do íon precursor de m/z 301 [M-H]⁻, tR = 2,99 min; (D) Espectro de massas em ESI⁺ para o pico 7, tR = 2,83 min. Condições de análise: vide parte Experimental seção 4.10.1.

5.4.2.2 Fração em acetato de etila

Em virtude da fração em EtOAc do extrato de cascas do fruto de *C. brasiliense* ter se apresentado promissora nos ensaios biológicos *in vitro* realizados, a mesma teve sua composição química caracterizada por CLUE-ESI-MS/MS. Foram obtidos perfis cromatográficos com detecção no DAD em 210 nm e de íons totais (TIC) nos modos negativo e positivo de ionização (Figura 27).

O tratamento dos dados extraídos dos cromatogramas (Figura 27 A, B e C) e os experimentos de fragmentação dos íons precursores negativos selecionados, foram realizados conforme descrito anteriormente para o extrato das cascas do fruto de *C. brasiliense* (seção 5.4.2.1). Os resultados obtidos foram então comparados com as substâncias identificadas na análise do extrato etanólico e encontram-se representados na tabela 5.

Foram identificadas, na fração em EtOAc, as substâncias encontradas no extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense*, além de outros constituintes químicos que não foram detectados anteriormente, provavelmente em função de terem sido concentrados na fração, o que pode ter contribuído para a sua ionização. Cabe ressaltar que as substâncias não identificadas relacionadas aos picos 8 e 9 apresentam, respectivamente, íons fragmento de m/z 301 e 275, e de m/z 301 e 273, os quais são comuns aos íons filhos encontrados para as substâncias relativas aos picos 5 e 7, sugerindo também tratar-se de taninos hidrolisáveis, estruturalmente relacionados à corilagina ou geraniina.

Um item que merece destaque é a fragmentação do íon negativo de m/z 331 [M-H]⁻, atribuído à glicogalina na fração em EtOAc. Foram detectados, em seu cromatograma de íons produto, apenas dois íons fragmento de m/z 211 [M-H-120]⁻ e m/z 169 [M-H-162]⁻, ao invés dos três íons fragmento anteriormente identificados para essa substância no extrato etanólico da casca. Esta variação observada no perfil de fragmentação pode ser atribuída à constituição das matrizes em que se encontra a substância analisada. Truffelli et al. (2010) demonstraram que o efeito matriz está relacionado, na maioria das vezes, com a quantidade de constituintes presentes na amostra, ocasionando assim interferência na ionização das substâncias de interesse. A presença de compostos interferentes, em alta concentração, pode aumentar a viscosidade e a tensão superficial das gotículas, modificando a eficiência de formação e evaporação das mesmas. Este fenômeno pode afetar a quantidade de íons carregados na fase gasosa que alcançariam o analisador de massas. Portanto, como o extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* e a fração em EtOAc possuem matrizes complexas e distintas, é possível que estes interferentes tenham influenciado na ionização e nos perfis de fragmentação obtidos para a glicogalina.

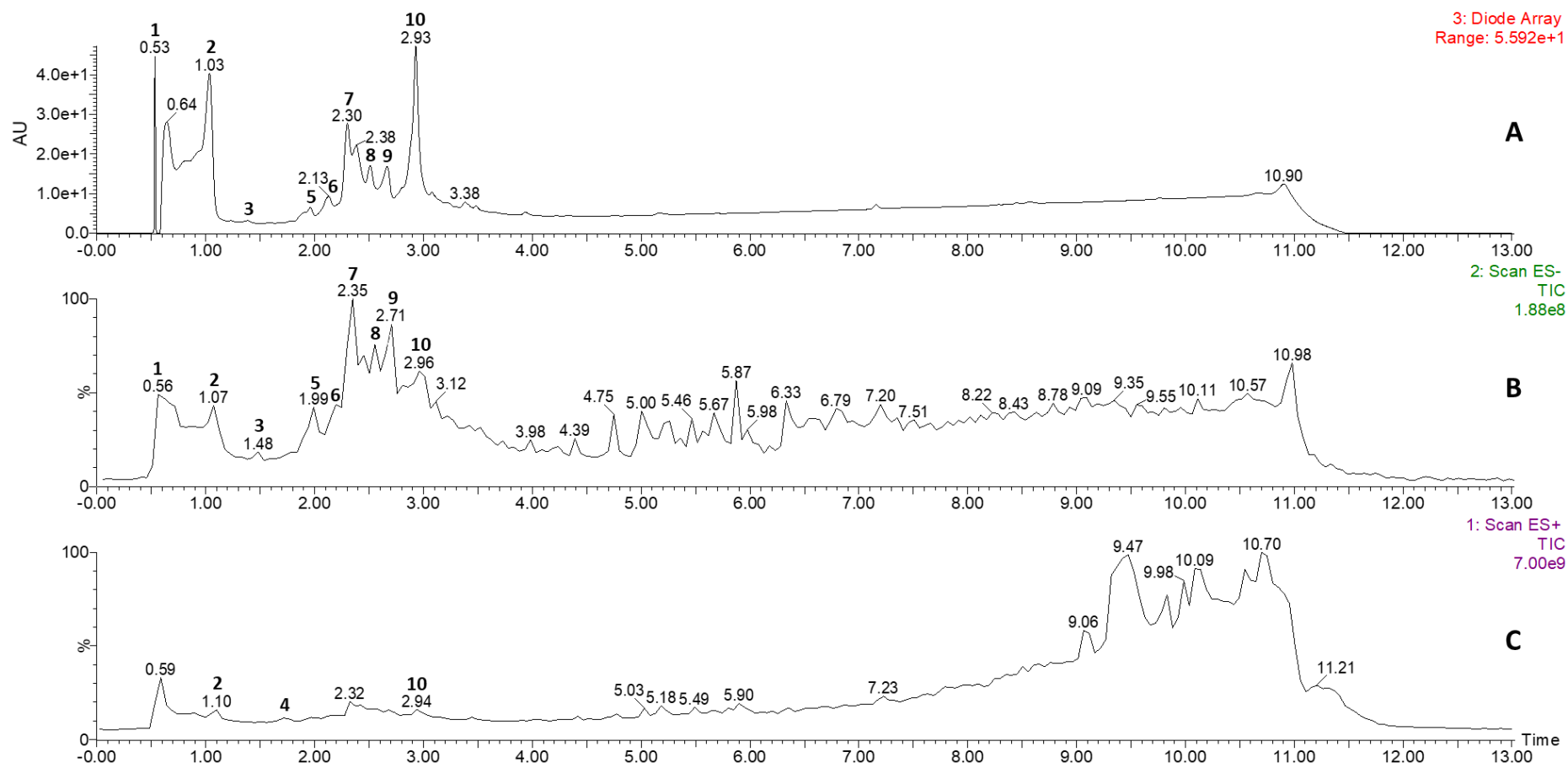


Figura 27 – Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-MS/MS, para a fração em EtOAc do extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense*. (A) Detecção no DAD em 210 nm; (B) íons totais (TIC) no modo negativo de ionização (ESI⁻); (C) íons totais (TIC) no modo positivo de ionização (ESI⁺). Condições de análise: vide parte Experimental seção 4.10.1. Picos 1 (tR = 0,53 min), 2 (tR = 1,03 min), 3 (tR = 1,42 min), 4 (tR = 1,71 min), 5 (tR = 1,97 min), 6 (tR = 2,12 min), 7 (tR = 2,30 min), 8 (tR = 2,51), 9 (tR = 2,66) e 10 (tR = 2,93).

Tabela 5 – Resultados da análise da fração em EtOAc do extrato de cascas do fruto de *C. brasiliense* por CLUE-ESI-MS/MS

Pico	tR (min)	UV-Vis (λ_{\max})	[2M-H] ⁻ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M-2H] ²⁻ (m/z)	Íons produto (m/z)	ESI ⁺ (m/z)	MM (g/mol)	Substância sugerida	Referência
1	0,64	217, 271	-	331	-	211 (50), 169 (100)	315 (70) ^I	332	Glicogalina	Breda, 2016
2	1,03	216, 271	339 (5)	169	-	125 (100)	171	170	Ácido gálico	Rocha et al., 2015; Sudjaroen, 2012
3	1,42	215, 269	-	325	-	-	-	326	NI	-
4	1,68	215, 270	-	-	-	-	158	157	NI	-
5	1,90	216, 274	-	633	-	463 (15), 301 (100), 275(20)	657 (8) ^{II}	634	Corilagina	Breda, 2016; Sudjaroen, 2012
6	2,13	218, 243, 281, 340	-	635	-	465 (100), 313 (15)	619 ^I	636	Trigaloilglicose	Kumar et al., 2015
7	2,30	219, 274	-	933 (75)	466 (20)	-	-	934	Geraniina	Sudjaroen, 2012
7a,7b ^{III}	2,30	219, 274	-	951	-	463 (25), 301 (100), 275 (25)	783 (100) ^{IV}	952	Geraniina (hemiacetais)	Breda, 2016; Perera, 2012; Sudjaroen, 2012
8	2,51	218, 264	-	953	476 (30)	393 (50), 319 (18), 301 (100), 275 (60)	785 (88) ^{IV}	954	Ácido chebulágico	Sudjaroen, 2012; Sprenger & Cass, 2013; Chang et al., 2019
9	2,66	219, 272	-	965	-	463 (30), 423 (35), 349 (15), 301 (100)	797 (100) ^{IV} ; 783 (40) ^V	966	Elagitanino não identificado	-
10	2,93	253, 367	603 (25)	301	-	300 (100), 284 (70), 245 (30), 229 (75)	303	302	Ácido elágico	Ascari, 2013; Sudjaroen, 2012

tR = tempo de retenção; min = minutos; UV-Vis = ultravioleta-visível; λ_{\max} = comprimento de onda máximo de absorção; [M-H]⁻ = íon negativo; [M+H]⁺ = íon positivo; MM = massa molecular; m/z = relação massa-carga; NI = não identificada; ^I[M+H-H₂O]⁺; ^{II}[M+Na]⁺; ^{III}formas hemiacetálicas A e B da geraniina (hidratadas); ^{IV}[M-O-galoil]⁺; ^V[M-183]⁺.

5.5 Fracionamento do extrato etanólico de cascas de *C. brasiliense* em coluna de Sephadex-LH20

Conforme descrito previamente (seções 5.2.1 e 5.2.2), o extrato etanólico das cascas do fruto de *C. brasiliense* e a fração em EtOAc derivada deste inibiram a liberação de mediadores pró-inflamatórios, bem como apresentaram atividade inibitória sobre as enzimas α -amilase e α -glicosidade (seção 5.3). Dessa forma, o extrato etanólico foi selecionado para fracionamento, visando isolar os constituintes bioativos. A fração em EtOAc foi obtida pela partição de suspensão do extrato etanólico entre solventes imiscíveis. Essa abordagem possibilitou identificar que a atividade biológica se concentrou nesta fração. Por outro lado, a partição entre solventes imiscíveis é um procedimento laborioso para se obter a massa da fração requerida para estudo fitoquímico, além de ser pouco reprodutível. Por esta razão, decidiu-se pelo fracionamento cromatográfico do extrato etanólico.

O fracionamento do extrato em coluna de Sephadex LH-20 gerou 20 grupos de frações reunidas (seção 4.8), cuja composição química foi investigada pela análise dos perfis cromatográficos, espectros de massas e espectros de íons produto obtidos por CLUE-ESI-MS/MS. Os cromatogramas obtidos para as frações revelaram sua alta complexidade, sendo selecionados para os estudos subsequentes o extrato de partida e as frações derivadas deste (FR12C, FR13C, FR15C e FR16C) (Figura 28). A massa do extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* aplicada na coluna, assim como as massas das frações selecionadas estão descritas na parte experimental, na seção 4.8.1.1.

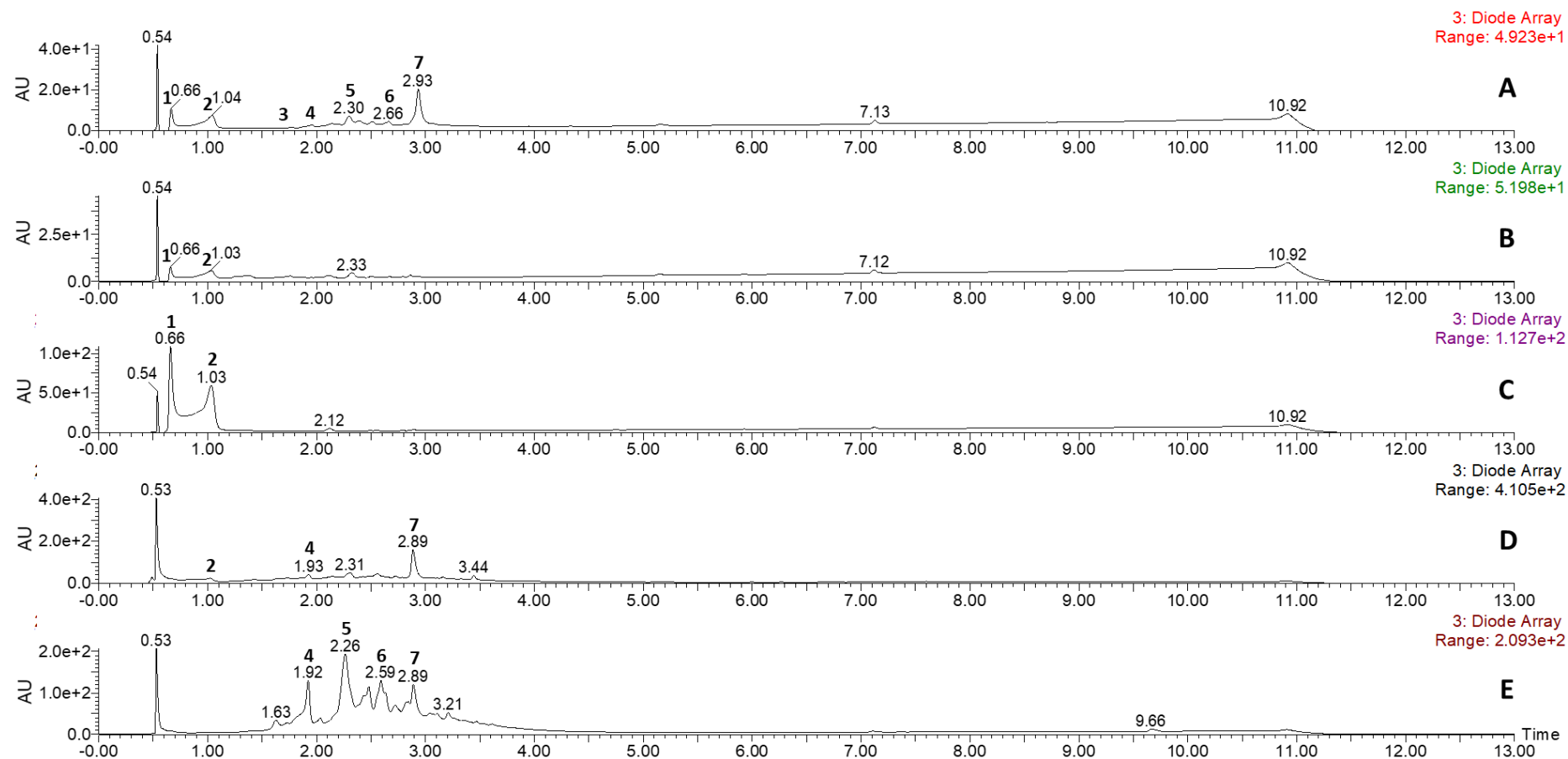


Figura 28 – Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-MS/MS com detecção no DAD em 210 nm. (A) extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense*; (B) fração FR12C; (C) fração FR13C; (D) fração FR15C; (E) fração FR16C. Condições de análise: vide parte Experimental seção 4.10.1. Pico 1 (tR = 0,66 min); 2 (tR = 1,04 min); 3 (tR = 1,68 min); 4 (tR = 1,93 min); 5 (tR = 2,30 min); 6 (tR = 2,66 min); 7 (tR = 2,93).

O fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 possibilitou separar algumas das substâncias previamente identificadas no extrato etanólico de cascas de *C. brasiliense* (Figura 28 A). Foram identificados, nas frações obtidas, os seguintes compostos: glicogalina (pico 1), ácido gálico (pico 2), substância não identificada (pico 3), corilagina (pico 4), geraniina (pico 5), substância não identificada (pico 6) e ácido elágico (pico 7). O pico com $tR \approx 0,54$, apesar de intenso no cromatograma, forneceu um espectro de massas em modo negativo com vários íons negativos e ruído significativo, indicando tratar-se do tempo morto da coluna, no qual foram eluídos uma mistura de constituintes que não puderam ser identificados.

Conforme observado nos cromatogramas das frações selecionadas (Figura 28 B-E), os constituintes correspondentes aos picos 1 e 2 se apresentaram majoritários na fração FR13C, enquanto os picos 1, 2 e 4 aparecem como minoritários nas frações FR12C e FR15C. Em relação ao pico 7, podemos afirmar que se encontrou majoritário na fração FR15C, enquanto os picos 4, 5, 6 e 7 se encontraram majoritários na fração FR16C.

Com o objetivo de identificar os picos majoritários supracitados encontrados nas frações FR13C, FR15C e FR16C foram realizadas análises por CLUE-ESI-MS/MS nos modos positivo e negativo de ionização (vide parte Experimental seção 4.10.1). As substâncias majoritárias identificadas nas frações FR13C, FR15C e FR16C encontram-se resumidas na tabela 6.

Conforme observado na tabela 6, os picos majoritários 1, 2, 4, 5 e 7 foram identificados por CLUE-ESI-MS/MS como glicogalina, ácido gálico, corilagina, geraniina e ácido elágico, respectivamente. O constituinte eluído no pico 6 não foi identificado. Esta substância apresentou o íon negativo de m/z 965 $[M-H]^-$, um íon fragmento de m/z 301 relacionado ao ácido elágico, e um espectro no UV-Vis com máximos em torno de 220 nm e 270-280 nm, respectivamente, indicando se tratar de um elagitanino (Salminen, et al., 1999). Portanto, pode-se concluir que as atividades biológicas descritas até o momento neste trabalho possivelmente se devem a essas entidades químicas, as quais fazem parte de duas classes importantes: ácidos fenólicos e seus ésteres (ácido gálico, ácido elágico e glicogalina) e os galotaninos/elagitaninos (geraniina e corilagina). Diversos trabalhos descritos na literatura corroboram essa hipótese, discutidos a seguir.

Tabela 6 – Substâncias majoritárias identificadas nas frações FR13C, FR15C e FR16C

Fração	Pico	tR (min)	UV-Vis (λ_{\max})	[2M-H] ⁻ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M-2H] ²⁻ (m/z)	Íons produto (m/z)	ESI ⁺ (m/z)	MM (g/mol)	Substância sugerida
FR13C	1	0,66	220, 271	663 (10)	331	-	241 (20), 211 (48), 169 (100)	315 (100) ^I , 355 (45) ^{II}	332	Glicogalina
FR13C	2	1,09	216, 271	339 (30)	169	-	125 (100)	171	170	Ácido gálico
FR15C	7	2,88	253, 367	603 (55)	301	-	284(50), 257 (10), 229 (20)	303	302	Ácido elágico
FR16C	4	1,92	222, 268	1267 (20)	633	-	463 (12), 301 (100), 275 (20), 169 (10)	657 (5) ^I , 465 (100) ^{III}	634	Corilagina
FR16C	5	2,26	228, 275	-	933 (5)	466 (15)	-	-	934	Geraniina
FR16C	5a,5b ^{IV}	2,26	228, 275	-	951	475 (5)	933 (60), 463 (10), 301 (100), 275 (5)	783 (100) ^{III}	952	Geraniina (hemiacetais)
FR16C	6	2,59	222, 275	-	965	-	603 (75), 463 (25), 445 (80), 301 (100)	797 (100) ^{III}	966	Elagitanino não identificado
FR16C	7	2,90	222, 253, 367	603 (55)	301	-	284 (100), 229 (90), 257 (30)	303	302	Ácido elágico

tR = tempo de retenção; min = minutos; UV-Vis = ultravioleta-visível; λ_{\max} = comprimento de onda máximo de absorção; [M-H]⁻ = íon negativo; [M+H]⁺ = íon positivo; MM = massa molecular; m/z = relação massa-carga; NI = não identificada; ^I[M+H-H₂O]⁺; ^{II}[M+Na]⁺; ^{III}[M-O-galoil]⁺; ^{IV}formas hemiacetálicas A e B da geraniina (hidratadas).

O ácido gálico foi avaliado em cultura de macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS. Após 24 horas de tratamento, ele reduziu os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, via redução da expressão de *Toll-like receptor 4* (TLR4) e inibição do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), demonstrando potencial efeito anti-inflamatório (Huang et al., 2016). Esses resultados corroboram a inibição da liberação de TNF- α induzida pela fração em EtOAc de cascas do fruto de *C. brasiliense* em cultura de células THP-1 estimuladas por LPS, aqui relatada, bem como a inibição da liberação de IL-1 β pelo extrato e sua fração EtOAc. Além disso, o ácido gálico e a glicogalina possuem elevada atividade sequestradora de radicais livres, desempenhando, assim, uma importante função protetora contra o estresse oxidativo, presente na progressão da disfunção metabólica do DMT2 (Daglia et al., 2014).

A corilagina foi avaliada *in vitro* em macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS. O composto reduziu, nas concentrações de 2, 10 e 20 ng/mL, a liberação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, sugerindo efeito anti-inflamatório (Zhao et al., 2008). Esses resultados sustentam nossa hipótese de que a corilagina deva contribuir para o efeito inibitório sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias observados para o extrato e a fração EtOAc de *C. brasiliense*. A corilagina também exibiu elevada atividade antioxidante, sendo um importante aliado no controle do estresse oxidativo (Jin et al. 2013).

A geraniina, identificada como principal constituinte do extrato de folhas de *Acer nikoense*, exibiu atividade inibitória *in vitro* sobre a liberação de TNF- α , com CI₅₀ de 43 μ M (Okabe et al., 2001). Este resultado também vai de encontro à inibição da liberação de TNF- α induzida pela fração EtOAc de *C. brasiliense* aqui relatada, sugerindo que este tanino contribui para a potencial atividade anti-inflamatória das cascas do pequi.

Em um estudo *in vitro*, a geraniina isolada do extrato de cascas de *Nephellium lappaceum* inibiu as enzimas α -glicosidase (CI₅₀ = 0,92 μ g/mL) e α -amilase (CI₅₀ = 0,93 μ g/mL), sugerindo atividade hipoglicêmica (Palanisamy et al., 2008). Em outro estudo, a corilagina isolada de extrato de *Terminalia macroptera* demonstrou elevada atividade inibitória sobre α -glicosidase (Pham et al., 2011). Portanto, é factível supor que a corilagina contribui para o efeito inibitório sobre essas enzimas, induzido pelo extrato e fração EtOAc de *C. brasiliense*.

Um outro estudo investigou os efeitos *in vivo* da suplementação de geraniina, isolada de cascas do fruto de *Nephellium lappaceum*, sobre o metabolismo e dados clínicos de ratos alimentados com dieta hiperlipídica (DHL). Ratos machos pós-desmame receberam DHL, com e sem suplementação de geraniina (10 e 50 mg/kg), enquanto o grupo controle foi alimentado com ração normolipídica, por 10 semanas consecutivas. Os ratos que receberam DHL elevaram seu peso corporal, seus depósitos de tecido adiposo, o peso dos órgãos, os níveis de

triacilglicerol, assim como desenvolveram disfunção dos marcadores renais e hepáticos, resistência e redução na sensibilidade à insulina e do percentual de células-beta pancreáticas. O tratamento com suplementação de geraniina por 4 semanas, na dose de 50 mg/kg, resultou em significativa redução do peso corporal e dos depósitos gordurosos epidérmicos e viscerais, melhora significativa nos índices glicêmicos, diminuição significativa dos níveis dos marcadores de disfunção hepática aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, assim como de outros marcadores relacionados com a disfunção metabólica induzida pela obesidade (Chung et al., 2014). Isto comprova a efetividade da geraniina no tratamento do DMT2 e comorbidades relacionadas, em modelo com ratos alimentados com dieta hiperlipídica.

O ácido elágico, nas concentrações de 1, 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$, reduziu significativamente a liberação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 por macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, revelando seu provável efeito anti-inflamatório (Guan et al., 2017). De maneira semelhante à descrita para os outros constituintes identificados, o ácido elágico também deve contribuir para o efeito biológico aqui relatado para o extrato e a fração EtOAc do pequi. Em um estudo *in vivo*, ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (50 mg/kg) foram tratados com dieta contendo 2% de ácido elágico por 12 semanas, sendo os animais eutanasiados e os tecidos cardíacos retirados para análise das citocinas inflamatórias. No grupo tratado, houve diminuição significativa nos níveis cardíacos de TNF- α , IL-1 β e MCP-1 ($p < 0,05$), indicando que o ácido elágico promoveu uma proteção anti-inflamatória no tecido cardíaco dos ratos diabéticos (Chao et al., 2009). Estes resultados, além de confirmarem os efeitos anti-TNF e anti-IL-1 β descritos, também corroboram os resultados inibitórios sobre MCP-1 obtidos para os extratos de folhas e cascas do fruto de *C. brasiliense*, bem como para suas frações em EtOAc e MeOH/H₂O.

Dentre as substâncias avaliadas nos estudos supracitados, a corilagina apresenta potencial para o tratamento da inflamação, DMT2 e distúrbio cardiovascular associado, devido à sua capacidade antioxidante. No entanto, a substância ainda não foi ensaiada em modelo experimental de DMT2, o que representa uma oportunidade importante de investigação dos seus efeitos neste ensaio *in vivo*.

5.5.1 Teste de extração dos taninos hidrolisáveis corilagina e geraniina

Tendo em vista as atividades biológicas descritas anteriormente para taninos hidrolisáveis, optou-se, em um primeiro momento, pelo isolamento da corilagina e geraniina. Futuramente, essas substâncias poderão ser avaliadas individualmente nos modelos *in vitro* relacionados ao DMT2 e a resposta biológica observada poderá ser comparada com o efeito do

extrato e da fração enriquecida nesses constituintes, o que nos permitirá investigar a existência de sinergismo. Além disso, faz-se necessário isolar esses taninos para utilizá-los, oportunamente, como substâncias de referência em método cromatográfico de CLUE-ESI-MS/MS a ser desenvolvido e validado para quantificar seus teores em derivados da droga vegetal, visando obter extrato e frações padronizadas, a serem avaliados em modelo *in vivo* de DMT2.

Os métodos tradicionais para isolamento de galotaninos e elagitaninos geralmente envolvem extrações com solventes orgânicos. Temos, como exemplo, as extrações sob refluxo empregando soluções aquosas de etanol a 50% ou acetona a 50% (Li et al., 2018). Nos últimos anos, a extração aquosa subcrítica mostrou seu potencial na extração de compostos polifenólicos de plantas, sendo que os rendimentos extrativos foram até superiores aos métodos tradicionais com solventes orgânicos (Rangsriwong et al., 2009). A técnica de extração sob alta pressão (EAP) consiste em um método alternativo para extração de compostos polifenólicos de plantas. Prasad et al. (2009) obtiveram um alto teor de corilagina a partir de *Dimocarpus longan*, usando a técnica EAP em comparação com outras técnicas. Thitilertdecha e colaboradores (2010), em seu trabalho com cascas de *Nephelium lappaceum*, obtiveram 25,1% e 30,6% de rendimento na extração da geraniina usando metanol e etanol como solventes extratores, respectivamente.

Com o objetivo de se determinar a melhor opção de solventes que proporcione o maior rendimento extrativo para corilagina e geraniina foi realizado um teste de extração com a droga vegetal (DVCCB) e o extrato etanólico (EECCB) de cascas do fruto de *C. brasiliense* (vide parte experimental seção 4.8.2). Optou-se, neste teste extrativo, pelo método tradicional empregando diferentes proporções de acetona/água à temperatura ambiente com auxílio de ultrassom (Li et al., 2018). Os resultados das áreas médias sob os picos da corilagina e geraniina para DVCCB e EECCB, sob as diferentes condições extrativas, foram plotados em gráficos de barras e foi realizada análise de variância simples (*one-way* ANOVA) seguida de comparações múltiplas de *Tukey* (Figura 29). Os níveis de significância foram estabelecidos em $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas empregando o software *GraphPad Prism 7.0* (*GraphPad Software*).

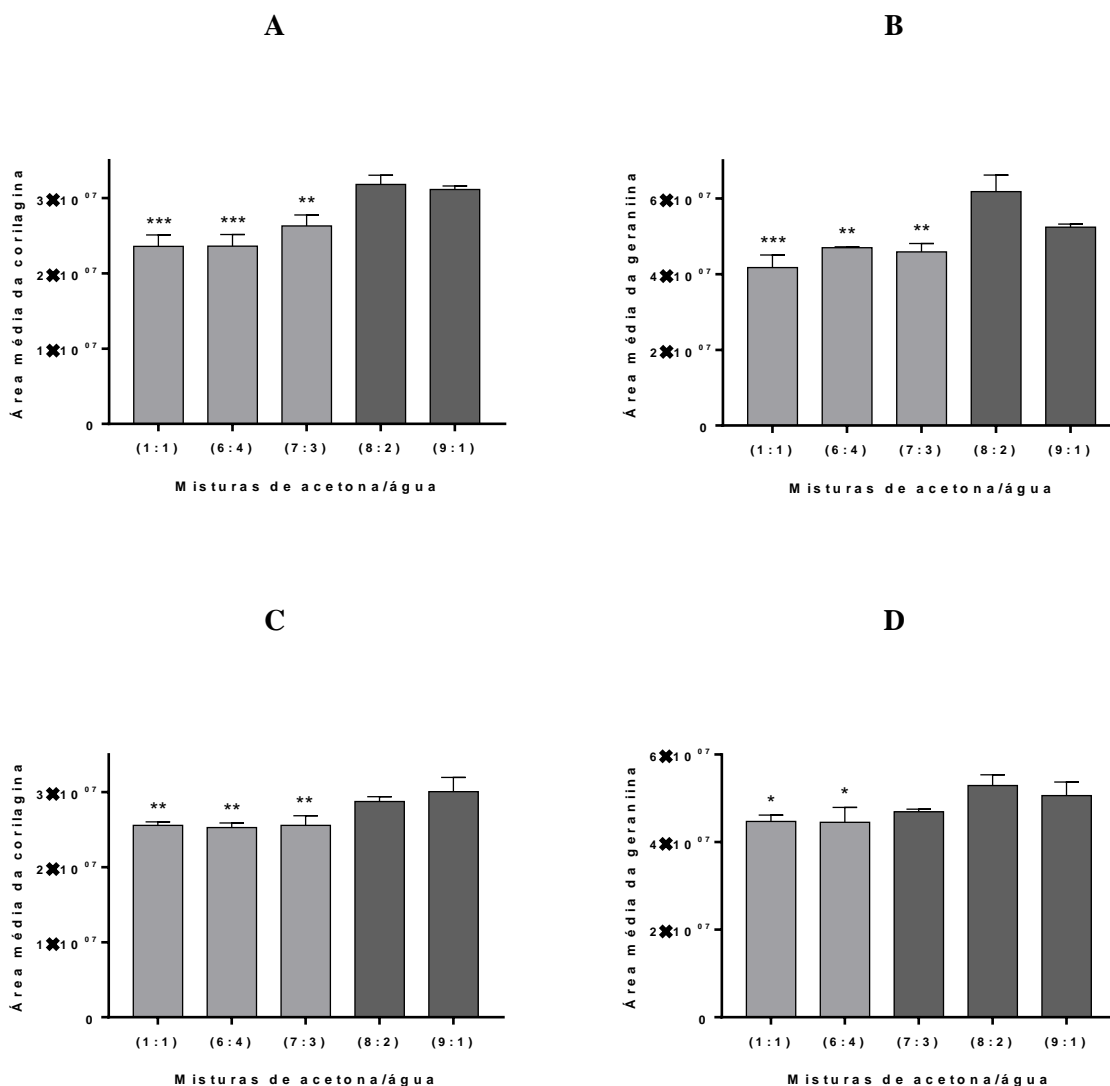


Figura 29 – Áreas médias sob os picos correspondentes à corilagina e à geraniina quantificadas nos extratos de DVCCB (A e B, respectivamente) e EECCB (C e D, respectivamente) obtidos com diferentes misturas de acetona/água. As barras representam a média de três replicatas \pm EPM. As diferenças significativas entre as médias foram determinadas por análise de variância simples (*One way ANOVA*) seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey*; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

Os resultados obtidos com DVCCB indicam que, para corilagina e geraniina (Figura 29 A e B, respectivamente), as misturas de acetona/água 8:2 e 9:1 apresentaram áreas médias significativamente superiores às outras condições avaliadas, comprovando suas eficiências extrativas. Um padrão similar foi observado na extração da corilagina (Figura 29 C) em amostra de EECCB, diferentemente do ocorrido para a geraniina (Figura 29 D), que apresentou áreas semelhantes na extração com acetona/água (7:3), (8:2) e (9:1), superiores às obtidas com acetona/água (1:1) e (6:4). Ressalta-se, ainda, que acetona/água 8:2, em comparação à mistura 9:1, apresentou, em termos absolutos, áreas médias superiores em todas as condições testadas

(Figura 29 A, B e D), com exceção da corilagina extraída de EECCB (Figura 29 C). Desta forma, optou-se pela mistura acetona/água 8:2 como solvente extrator.

As áreas sob os picos de corilagina e geraniina em DVCCB e EECCB, obtidas pela extração com acetona/água 8:2, foram comparadas com aquelas do extrato etanólico das cascas de *C. brasiliense*, com a fração em EtOAc e com a fração cromatográfica FR16C. Ao se analisar as áreas do pico da corilagina nos cromatogramas da Figura 30 fica evidente que a extração com acetona/água 8:2 foi mais eficiente do que o extrato etanólico e a fração em EtOAc. No entanto, o fracionamento cromatográfico (FR16C) foi ligeiramente mais eficiente em enriquecer no composto de interesse. Em relação à extração da geraniina, constatamos que a eficiência da mistura acetona/água 8:2 na extração de DVCCB e EECCB, além de ter sido marcadamente superior àquela obtida para o extrato etanólico e para a fração em EtOAc, superou o enriquecimento obtido em coluna de Sephadex LH-20 (fração FR16C) (Figura 31). Logo, conclui-se que a mistura acetona/água 8:2 foi eficiente na extração da geraniina e corilagina, possibilitando um bom rendimento na obtenção destes compostos. Além disso, devido à limitação de massa do extrato EECCB, optou-se por conduzir a extração da droga vegetal (DVCCB) com acetona/água 8:2.

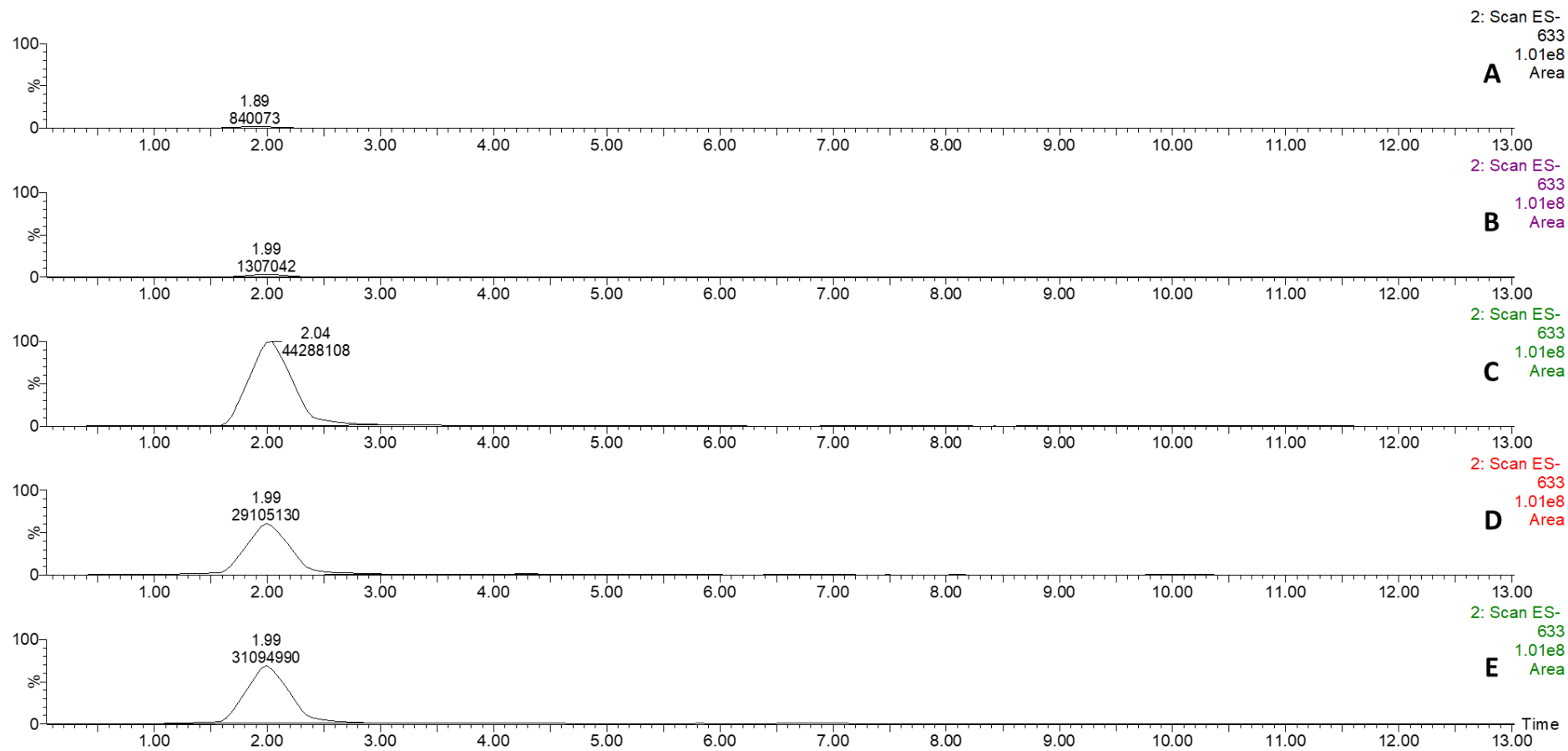


Figura 30 – Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-MS/MS com detecção em modo negativo de ionização (ESI⁻) do íon negativo $[M-H]^-$ de m/z 633 (corilagina). (A) EECCB; (B) fração em EtOAc; (C) fração 16C; (D) extrato acetona/água 8:2 de EECCB; (E) extrato acetona/água 8:2 de DVCCB. Condições de análise: vide parte Experimental seção 4.10.1.2. Pico 1 (tR = 1,99 min).

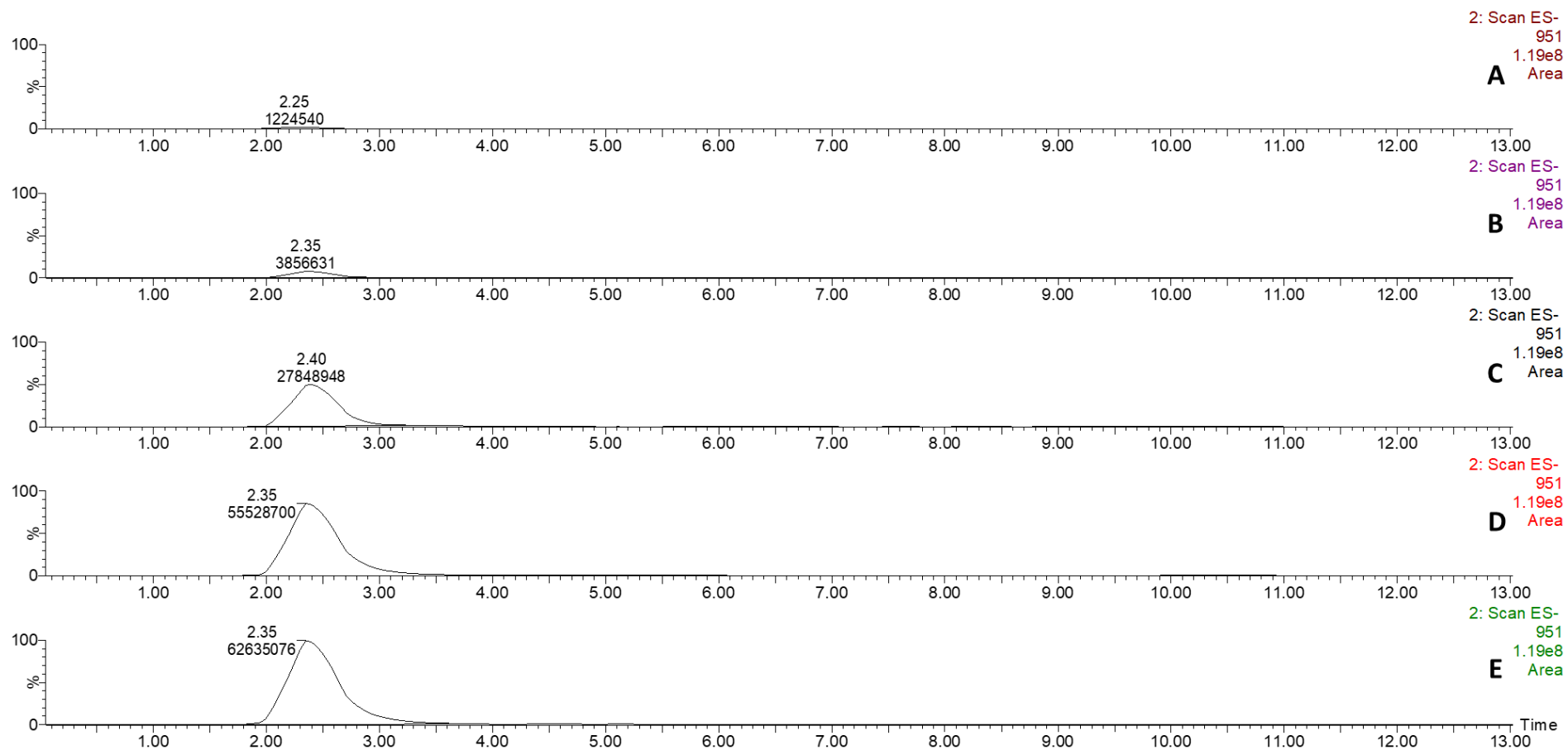


Figura 31 – Cromatogramas obtidos por CLUE-ESI-MS/MS com detecção em modo negativo de ionização (ESI⁻) do íon negativo [M-H]⁻ de *m/z* 951 (formas hemiacéticas hidratadas A e B da geraniina). (A) EECCB; (B) fração em EtOAc; (C) fração 16C; (D) extrato acetona/água 8:2 de EECCB; (E) extrato acetona/água 8:2 de DVCCB. Condições de análise: vide parte Experimental seção 4.10.1.2. Pico 2 (t_R = 2,35 min).

5.6 Isolamento dos elagitaninos, caracterização química por CLUE-ESI-MS/MS e confirmação estrutural inequívoca por RMN

Os resultados dos ensaios biológicos *in vitro* (seção 5.3) indicaram que a fração FR16C, enriquecida em taninos, apresentou atividade inibitória significativa sobre a α -glicosidase, assim como efeitos antidiabéticos promissores no teste de tolerância ao amido *in vivo* (seção 5.7.1) e no ensaio *in vivo* em modelo experimental de DMT2 (seção 5.7.2). Dessa forma, procedeu-se ao fracionamento 1 por CLAE em escala preparativa de FR16C (875 mg) (seção 4.9.1.1), sendo obtidas as subfrações T1 a T20, as quais foram caracterizadas por CLUE-ESI-MS/MS (item 5.6.1). Na sequência foi realizado o fracionamento 2 por CLAE em escala preparativa de SFR-T11 (115 mg) (seção 4.9.1.2), sendo obtidas as substâncias isoladas SI-T1A (52 mg) e SI-T2A (15 mg) que tiveram suas fórmulas moleculares determinadas por CLUE-ESI-MS/MS (item 5.6.1) e suas estruturas químicas confirmadas inequivocamente por análises de RMN (item 5.6.2).

5.6.1 Caracterização química por CLUE-ESI-MS/MS

A abordagem adotada para a caracterização química das subfrações T1 a T20 consistiu na identificação dos elagitaninos majoritários anteriormente identificados em FR16C. Foram realizadas então análises por CLUE-ESI-MS/MS nos modos positivo e negativo de ionização das subfrações supracitadas (vide parte Experimental seção 4.10.1). As substâncias majoritárias de interesse (corilagina, geraniina e outros elagitaninos relacionados) foram identificadas nas amostras T11, T13 e T14, as quais encontram-se resumidas na Tabela 7.

Tabela 7 – Identificação por CLUE-ESI-MS das substâncias majoritárias nas subfrações (SFR) T11, T13 e T14.

SFR ou SI	Pico	tR (min)	UV-Vis (λ_{\max})	[2M-H] ⁻ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	[M-2H] ²⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)	MM (g/mol)	Substância sugerida
SFR-T11	4	3,20	217, 267	1267 (2)	633 (100)	-	657 (65) ^{II} , 465 (75) ^{III}	634	Corilagina
SFR-T11	5	4,26	220, 276	-	933 (5) ^I	466 (20)	-	934	Geraniina
SFR-T11	5a,5b ^{IV}	4,26	220, 276	-	951 (100)	-	975 (20) ^{II} , 783 (100) ^{III}	952	Geraniina (hemiacetais)
SFR-T11	6	5,27	219, 275	-	965 (100)	-	989 (25) ^{II} , 797 (75) ^{III}	966	Elagitanino não identificado
SFR-T13	-	4,40	221, 279	-	925 (100)	462 (20)	949 (15) ^{II} , 757 (100) ^{III}	926	Elagitanino não identificado
SFR-T14	-	4,85	220, 275	-	953 (100)	476 (65)	977 (25) ^{II} , 785 (75) ^{III}	954	Elagitanino não identificado

tR = tempo de retenção; min = minutos; UV-Vis = ultravioleta-visível; λ_{\max} = comprimento de onda máximo de absorção; [M-H]⁻ = íon negativo; [M+H]⁺ = íon positivo; MM = massa molecular; m/z = relação massa-carga; ^I[M+H-H₂O]⁺; ^{II}[M+Na]⁺; ^{III}[M-galoil]⁺; ^{IV}formas hemiacetálicas A e B da geraniina (hidratadas).

A subfração T11 (115 mg), além de ter sido obtida com rendimento superior (15,7%) apresentou após análise por CLUE-ESI-MS os picos majoritários 4 em m/z 633 $[M-H]^-$ e 657 $[M+Na]^+$; 5 em m/z 933 $[M-H]^-$ e 466 $[M-2H]^{2-}$; e 5a/5b em m/z 951 $[M-H]^-$ e 975 $[M+Na]^+$, que foram identificados como corilagina, geraniina e formas hemiacetálicas da geraniina. SFR-T11 também revelou a presença do pico minoritário 6 em m/z 965 $[M-H]^-$ e 989 $[M+Na]^+$ correspondente a um elagitanino relacionado não identificado. SFR-T13 (23 mg), apesar de ter sido obtida com rendimento inferior (3,7%) apresentou um pico majoritário em m/z 925 $[M-H]^-$ e 949 $[M+Na]^+$ indicando um elagitanino relacionado não identificado. SFR-T14 (81 mg), além de obtida com rendimento satisfatório (11,3%) também revelou um elagitanino relacionado não identificado em m/z 953 $[M-H]^-$ e 977 $[M+Na]^+$.

Dentre as três subfrações disponíveis, optou-se pelo fracionamento 2 por CLAE em escala preparativa de SFR-T11 (115 mg) (seção 4.9.1.2) em virtude do seu maior rendimento em massa e por conter dois elagitaninos majoritários, que apesar de serem conhecidos na literatura (corilagina e geraniina) por ora ainda não foram isolados a partir das cascas do fruto de *C. brasiliense*. Em consequência foram obtidas as substâncias isoladas (SI) T1A (52 mg) e T2A (15 mg), que também foram caracterizadas por CLUE-ESI-MS.

SI-T1A apresentou-se como um sólido marrom-amarelado, cujo espectro no UV, obtido *on line* pelo detector de DAD do sistema de CLUE-ESI-MS (Figura 32), indicou máximos de absorção em 220 e 276 nm evidenciando a presença de grupo cromofórico conjugado. Na Figura 33 é apresentado o perfil cromatográfico obtido pelo detector DAD (A) e pelo detector de massas nos modos positivo (B) e negativo (C) de ionização.

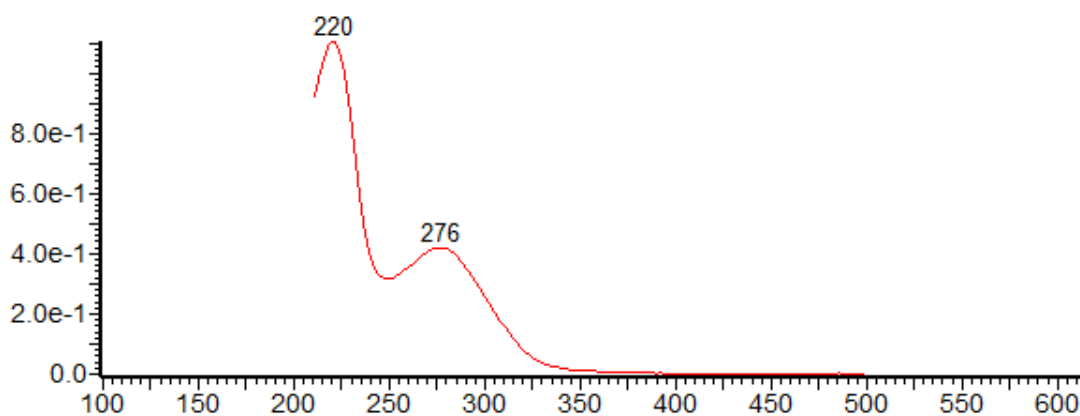


Figura 32 – Espectro no UV obtido para SI-T1A.

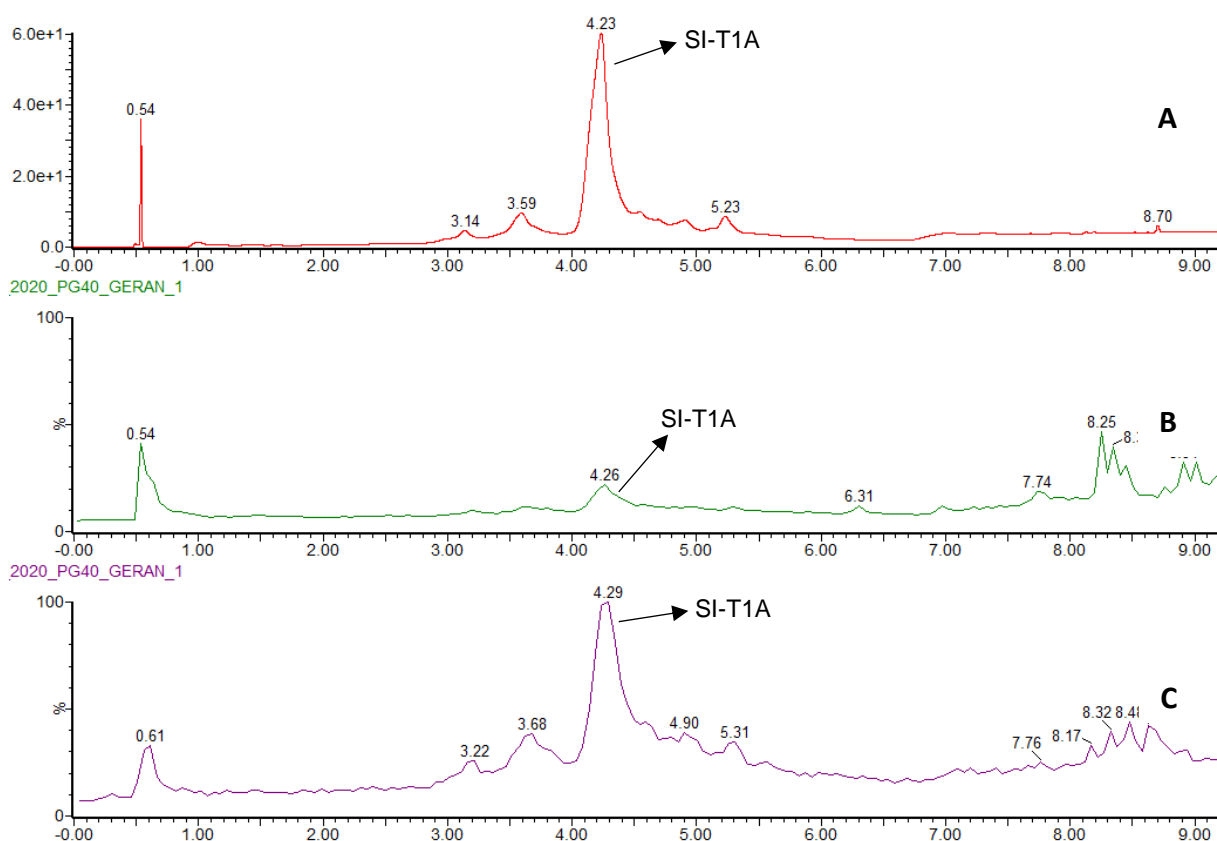


Figura 33 – Perfis cromatográficos obtidos para SI-T1A por CLUE-ESI-MS, com detecção no UV (A) e por MS nos modos positivo (B) e negativo (C) de ionização.

Os espectros de massas obtidos por CLUE-ESI-MS nos modos positivo (pico tR de 4,26 min) e negativo (pico tR de 4,29 min) de ionização estão representados nas Figuras 34 A e B, respectivamente.

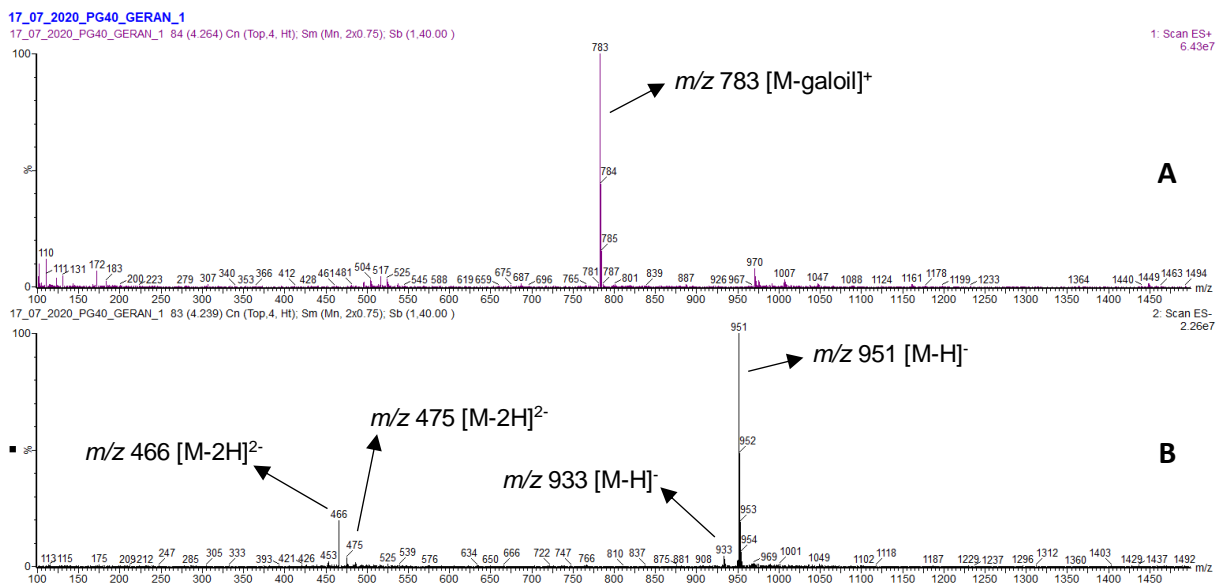


Figura 34 – Espectros de massas obtidos para SI-T1A por CLUE-ESI-MS nos modos positivo (A) e negativo (B) de ionização para os picos tR de 4,26 e 4,29 min, respectivamente.

O espectro de massas obtido para T1A no modo positivo de ionização (Figura 34 A) forneceu o íon positivo em m/z 783 $[M\text{-galoil}]^+$ compatível com a perda de uma unidade galoíla a partir de uma das formas hemiacetálicas (hidratadas) da geraniina ($M = 952$). Além disso, no espectro de massas obtido no modo negativo de ionização (Figura 34 B) destacam-se os íons negativos em m/z 951 $[M\text{-H}]^-$ e m/z 475 $[M\text{-2H}]^{2-}$ compatíveis com uma das formas hemiacetálicas da geraniina. Observam-se também, ainda que em menor intensidade, dois íons negativos em m/z 933 $[M\text{-H}]^-$ e m/z 466 $[M\text{-2H}]^{2-}$ compatíveis com a forma cristalina (desidratada) da geraniina. Portanto, os picos encontrados nos espectros de massas citados corroboram as fórmulas moleculares $C_{41}H_{28}O_{27}$ para as formas hemiacetálicas A ou B (hidratadas) e $C_{41}H_{26}O_{26}$ para a forma cristalina (desidratada) da geraniina.

SI-T2A apresentou-se, por sua vez, como um sólido branco-amarelado, cujo espectro no UV (Figura 35), indicou máximos de absorção em 217 e 266 nm evidenciando também a extensão da ressonância com grupo cromóforo conjugado. Na Figura 36 é apresentado o perfil cromatográfico obtido pelo detector DAD (A) e pelo detector de massas nos modos positivo (B) e negativo (C) de ionização.

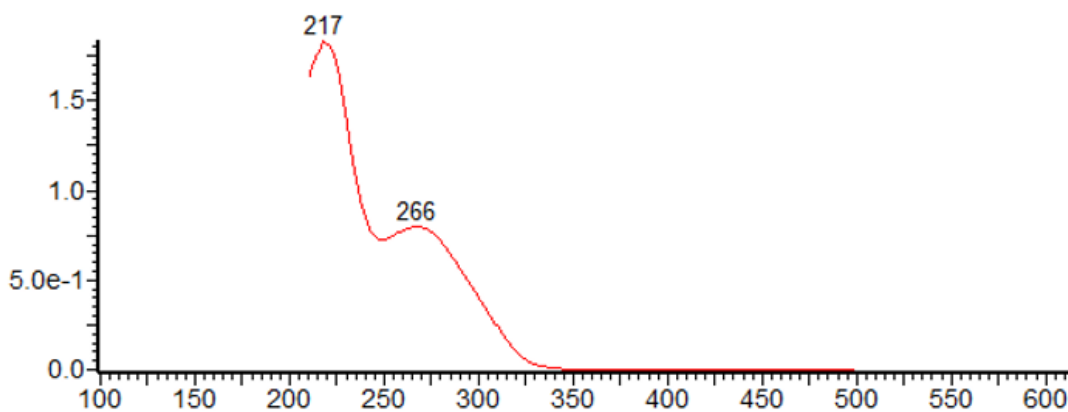


Figura 35 – Espectro no UV obtido para SI-T2A.

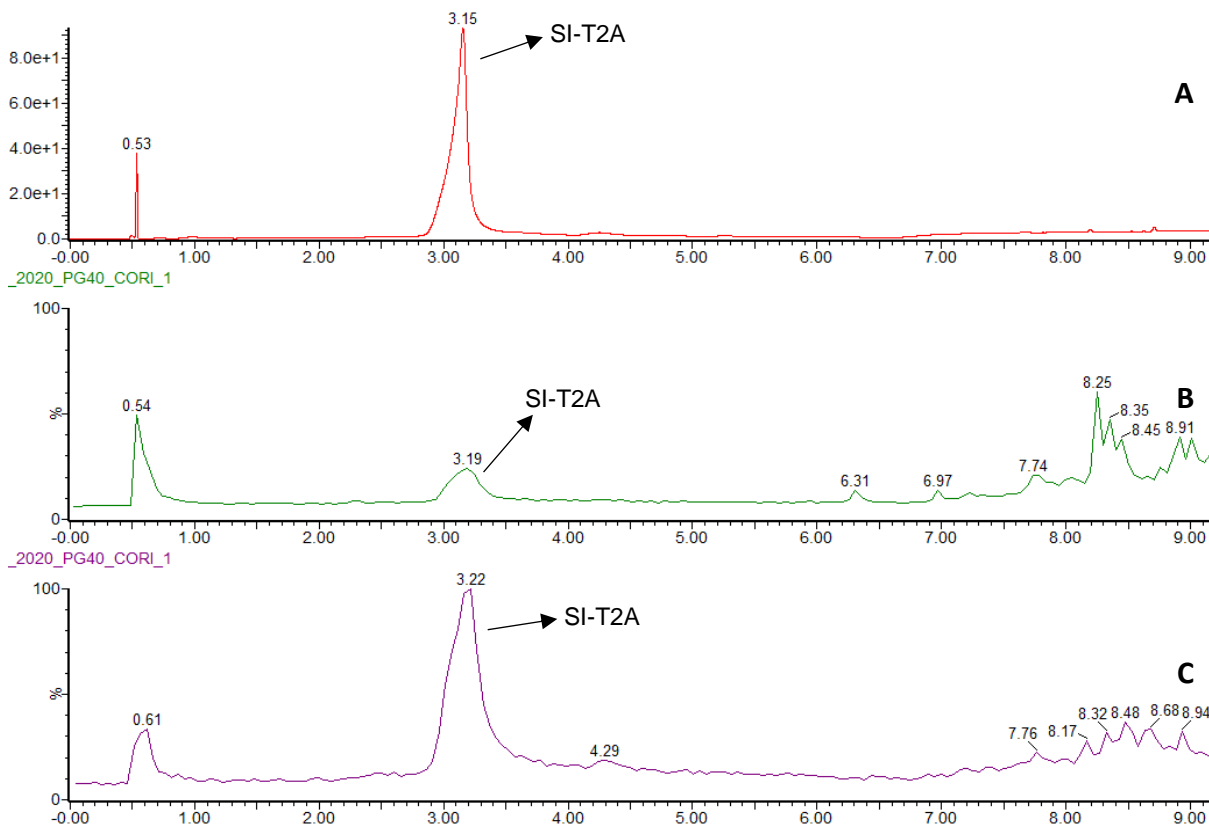


Figura 36 – Perfis cromatográficos obtidos para SI-T2A por CLUE-ESI-MS, com detecção no UV (A) e por MS nos modos positivo (B) e negativo (C) de ionização.

Os espectros de massas obtidos por CLUE-ESI-MS nos modos positivo (pico tR de 3,19 min) e negativo (pico tR de 3,22 min) de ionização estão representados nas Figuras 37 A e B, respectivamente.

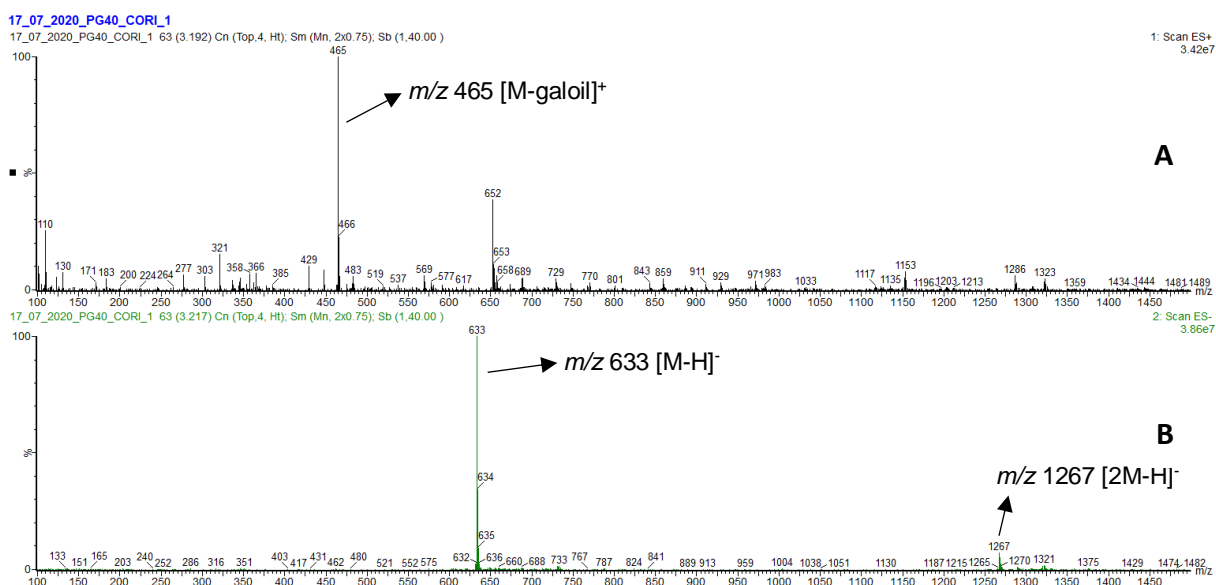


Figura 37 – Espectros de massas obtidos para SI-T2A por CLUE-ESI-MS nos modos positivo (A) e negativo (B) de ionização para os picos tR de 3,19 e 3,22 min, respectivamente.

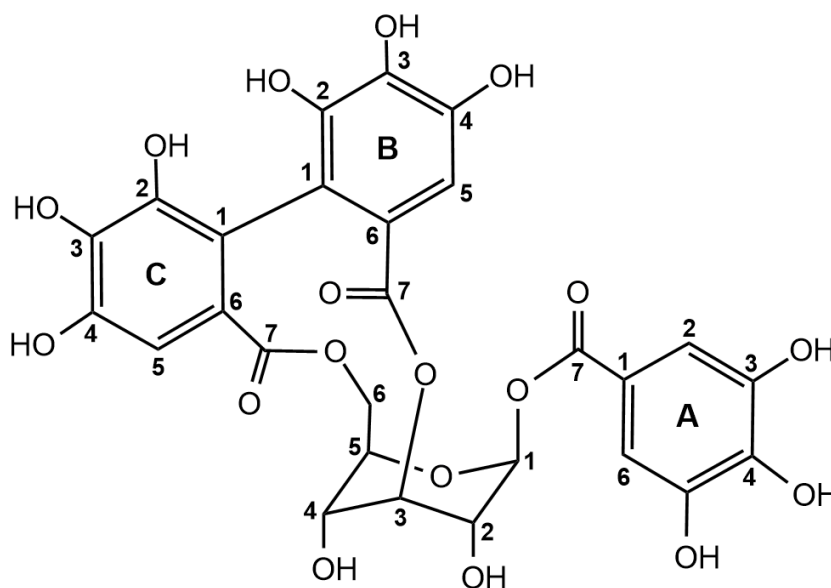
O espectro de massas obtido para T2A no modo positivo de ionização (Figura 37 A) exibiu o íon positivo em m/z 465 $[M\text{-galoil}]^+$ compatível com a perda de uma unidade galoíla a partir da corilagina ($M = 634$). Curiosamente, no espectro de massas obtido em ESI^- (Figura 37 B) observam-se os íons negativos em m/z 633 $[M\text{-H}]^-$ e m/z 1267 $[2M\text{-H}]^-$ compatíveis com a corilagina e sua respectiva forma dimérica. A análise dos espectros de massas confirmou a fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{18}$ para a corilagina.

5.6.2 Confirmação estrutural das substâncias isoladas por RMN

A caracterização estrutural das substâncias isoladas T1A e T2A foi realizada por RMN, empregando experimentos 1D (^1H , ^{13}C e DEPT-135) e 2D (COSY, HSQC e HMBC).

5.6.2.1 Confirmação estrutural da substância T2A

Os dados das análises por CLUE-ESI-MS para a subfração T11 e substância isolada T2A (item 5.6.1) indicaram que o pico com $t_R \approx 3,20$ min tratava-se da corilagina (26). Assim, a atribuição dos sinais dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 38) e de ^1H (Figura 40) obtidos para T2A foi realizada a partir de comparação com valores de deslocamentos químicos descritos na literatura para corilagina (Kumaran & Karunakaran, 2006; Lee et al., 2017; Thitilertdecha et al., 2010), os quais estão descritos nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.



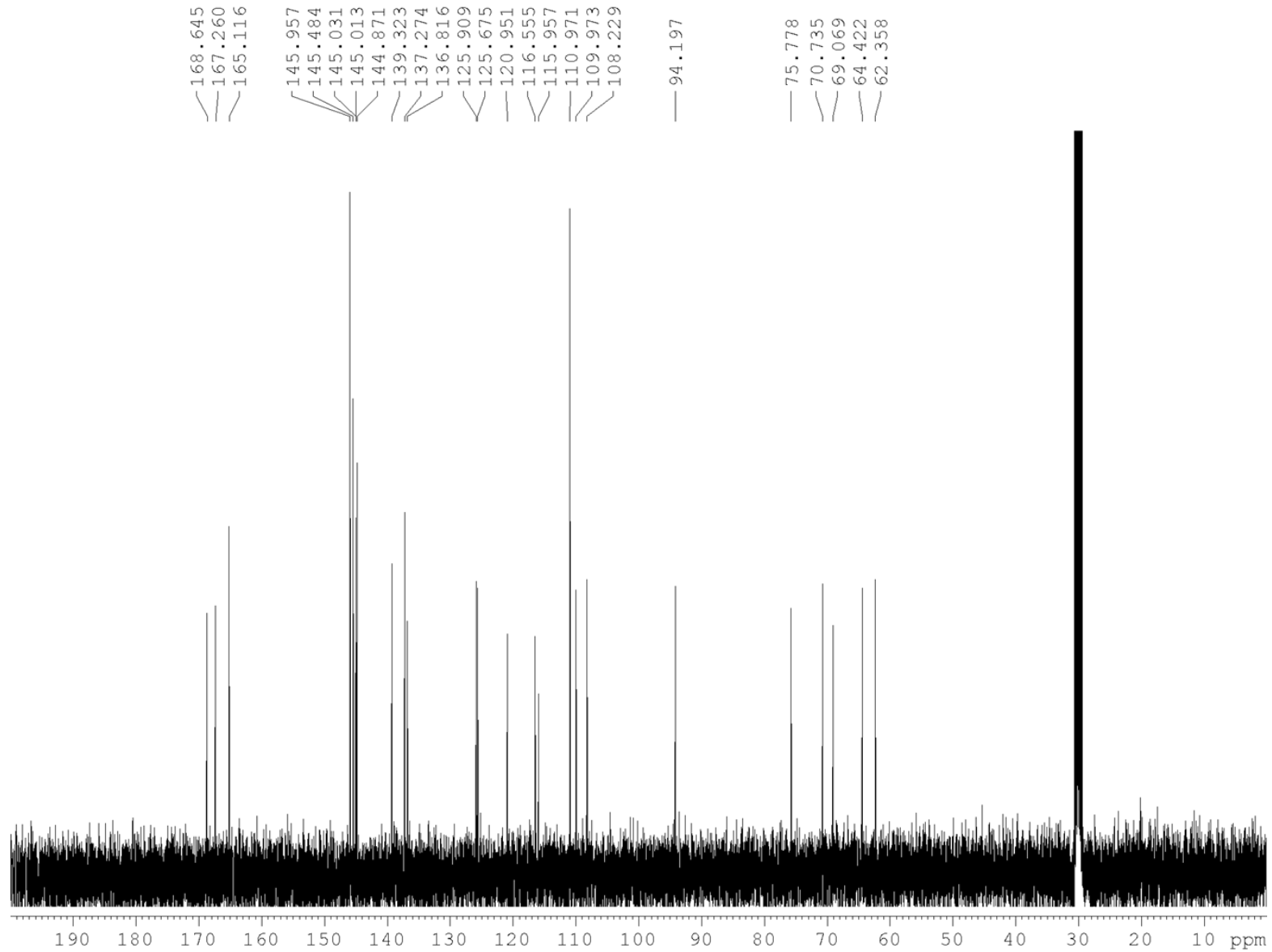


Figura 38 – Espectro de RMN de ^{13}C obtido para T2A (100 MHz, CD_3COCD_3).

Tabela 8 – Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C obtidos para T2A (100 MHz, CD_3COCD_3).

C	Parte da molécula	1 (T2A)		2	3
		δ (ppm)	DEPT-135	δ (ppm)	δ (ppm)
C-4	Glc	62,36	CH	62,06	62,6
C-6	Glc	64,42	CH_2	64,15	65,1
C-2	Glc	69,07	CH	68,77	69,6
C-3	Glc	70,74	CH	70,40	71,7
C-5	Glc	75,77	CH	75,51	76,3
C-1	Glc	94,20	CH	93,96	95,1
C-2,6	Gal anel A	110,97	CH	110,70	111,1
C-1	Gal anel A	120,95	C	120,72	122,1
C-4	Gal anel A	139,32	C	139,03	140,5
C-3,5	Gal anel A	145,96	C	145,71	146,5
C7 (C=O)	Gal anel A	165,12	C	164,87	166,8
C-5	HHDP anel C	108,23	CH	107,97	108,4
C-5	HHDP anel B	109,97	CH	109,77	110,3
C-1	HHDP anel C	115,96	C	115,76	117,4
C-1	HHDP anel B	116,56	C	116,27	120,7
C-6	HHDP anel C	125,68	C	125,40	125,8
C-6	HHDP anel B	125,91	C	125,66	126,2
C-3	HHDP anel C	136,82	C	136,53	-
C-3	HHDP anel B	137,27	C	137,00	-
C-2,4	HHDP anel B	144,87/145,01	C	144,63/144,76	145,5/145,6
C-2,4	HHDP anel C	145,03/145,48	C	144,79/145,21	145,7/146,1
C-7 (C=O)	HHDP anel B	167,26	C	167,00	168,7
C-7 (C=O)	HHDP anel C	168,65	C	168,37	170,2

Nota: δ (ppm): deslocamento químico em ppm; **1:** valores de δ e atribuições do DEPT-135 obtidos neste trabalho para T2A; **2:** valores de δ relatados por Thitilertdechta et al. (2010) para corilagina (CD_3COCD_3 , 100 MHz); **3:** valores de δ relatados por Lee et al. (2017) para corilagina (CD_3COCD_3 , 75 MHz). Glc: glicose; Gal: galoil; HHDP: hexahidroxidifenoila.

O espectro de RMN de ^{13}C obtido para T2A apresentou 27 sinais de carbono (Figura 38, Tabela 8), compatíveis com o elagitanino corilagina, sugerido pelo espectro de massas anteriormente discutido (item 5.6.1, Figura 37). A análise do espectro de RMN de ^{13}C e do subspectro DEPT-135 (Figuras 38 e 39) permitiu identificar 17 carbonos não hidrogenados, 9 carbonos metínicos e 1 carbono metilênico (Tabela 8). Os carbonos oximetínicos C-4, C-2, C-3 e C-5 da porção glicosídica (Glc) apresentaram valores de deslocamento químico de δ 62,36; 69,07; 70,74 e 75,77 ppm. O carbono oximetilênico C6 (Glc) apresentou valor de δ de 64,42 ppm, enquanto o carbono anomérico C-1 (Glc) foi atribuído ao sinal em δ 94,20 ppm. A porção galoila (Gal) apresentou carbonos aromáticos com δ de 110,97 e 120,95 ppm (C-2,6 e C-1) e aromáticos oxigenados com δ de 139,32 e 145,96 ppm (C-4 e C-3,5). Por sua vez, as porções hexahidroxidifenoila (HHDP) C e B apresentaram sinais com valores de deslocamento químico compatíveis com 6 carbonos aromáticos não oxigenados e 6 carbonos aromáticos oxigenados nos intervalos de δ (ppm) de 108,23 (C-5, HHDP anel C) a 125,91 (C-6, HHDP anel B) e de

136,82 (C-3, HHDP anel C) a 145,48 (C-4, HHDP anel C). Os sinais em δ 165,12; 167,26 e 168,65 ppm foram atribuídos, respectivamente, às carbonilas em C-7 da unidade Gal do anel A; C-7 do HHDP do anel B, e C-7 do HHDP do anel C (Pavia et al., 2010).

As atribuições dos sinais do espectro de RMN ^{13}C de T2A (Figuras 38 e 39) foram condizentes com os valores de δ descritos na literatura para a corilagina, em espectros obtidos no mesmo solvente (Tabela 8), indicando tratar-se da mesma substância (Lee et al., 2017; Thitilertdecha et al., 2010).

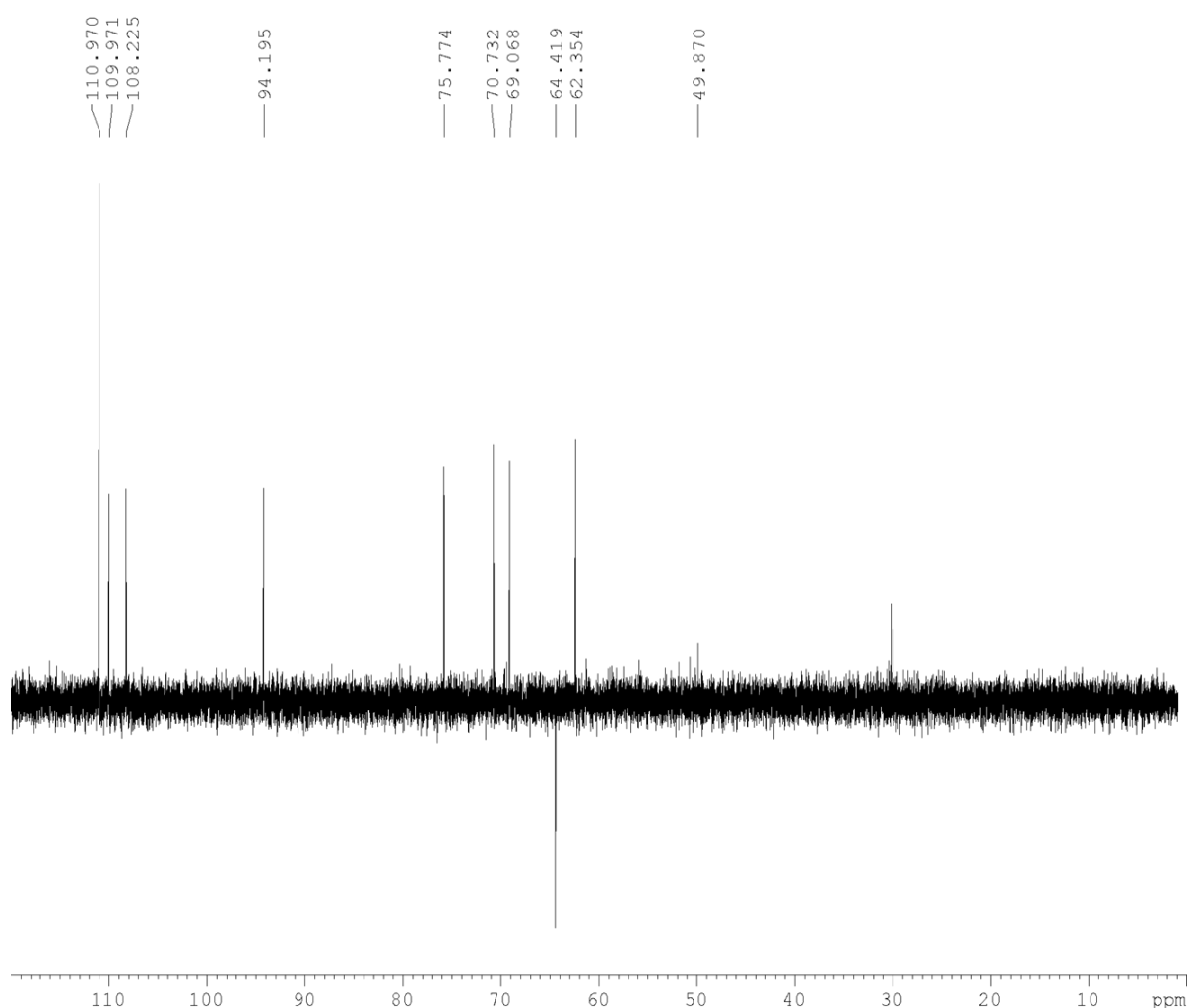


Figura 39 – Subespectro DEPT-135 obtido para T2A (100 MHz, CD_3COCD_3).

O espectro de RMN ^1H obtido para T2A (Figuras 40 e 41) exibiu um singlete em δ 7,13 ppm (2H, s) atribuído aos prótons aromáticos H-2,6 (Gal anel A); dois singletos em δ 6,84 e 6,70 ppm atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-5 (1H, s, HHDP anel B) e H-5 (1H, s, HHDP anel C); e sete sinais no intervalo de δ 4,06 a 6,37 ppm, correspondentes aos hidrogênios da porção Glc. O próton anomérico H-1 (Glc) em δ 6,37 ppm, com constante de

acoplamento escalar de 1,6 Hz (J), indicou tratar-se do anômero β da unidade glicopiranosídica na conformação de cadeira invertida (1C_4). Sprenger et al. (2016) estudaram o efeito dos solventes na conformação do anel glicopiranosídico por meio de análises de 1H -RMN da corilagina em soluções de DMSO- d_6 e metanol- d_4 . O espectro em DMSO- d_6 indicou um próton anomérico (H1-Glc) em δ 6,2 ppm e com J de 7,3 Hz, valor frequentemente reportado para a forma β na conformação de cadeira (4C_1). Entretanto, após evaporação do solvente e solubilização da corilagina em metanol- d_4 , o deslocamento químico de H1-Glc foi ligeiramente alterado para 6,3 ppm e J alterou bruscamente para 2,2 Hz. Esses resultados também corroboram dados de 1H -RMN recentemente publicados para corilagina em metanol- d_4 os quais sugerem uma conformação de cadeira invertida (1C_4) para a unidade de glicose com todos os hidrogênios em posição equatorial (Sudjaroen et al., 2012). Dessa forma, o valor de $J = 1,6$ Hz (H1-Glc) obtido neste trabalho sugere fortemente que o anel glicopiranosídico da corilagina em acetona- d_6 também se apresenta como um anômero β na conformação (1C_4).

Os valores de δ_H encontrados para T2A (Tabela 9) são compatíveis com os descritos na literatura para a corilagina (Kumaran & Karunakaran, 2006; Thitilertdecha et al., 2010).

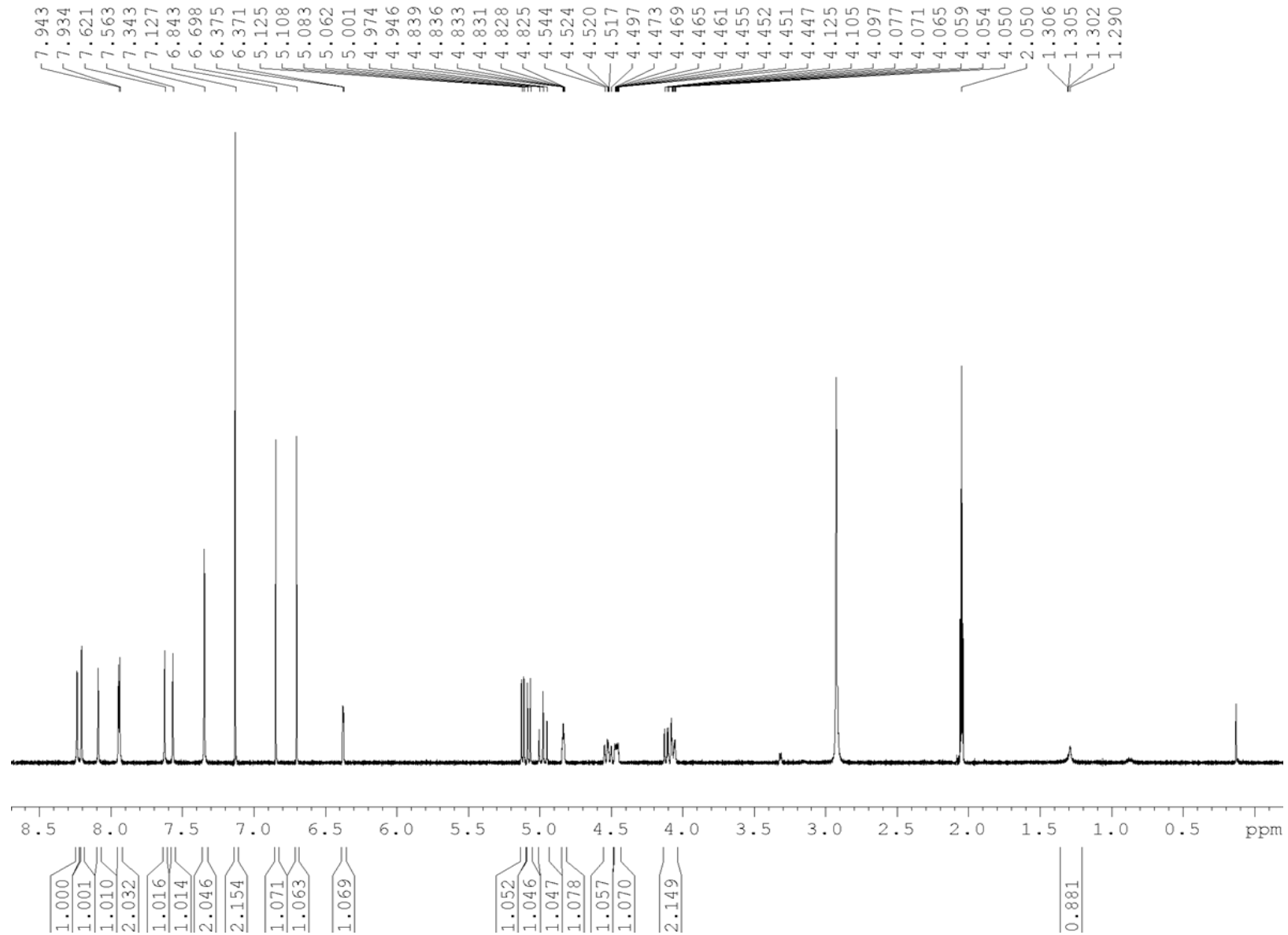


Figura 40 – Espectro de RMN de ^1H obtido para T2A (400 MHz, CD_3COCD_3).

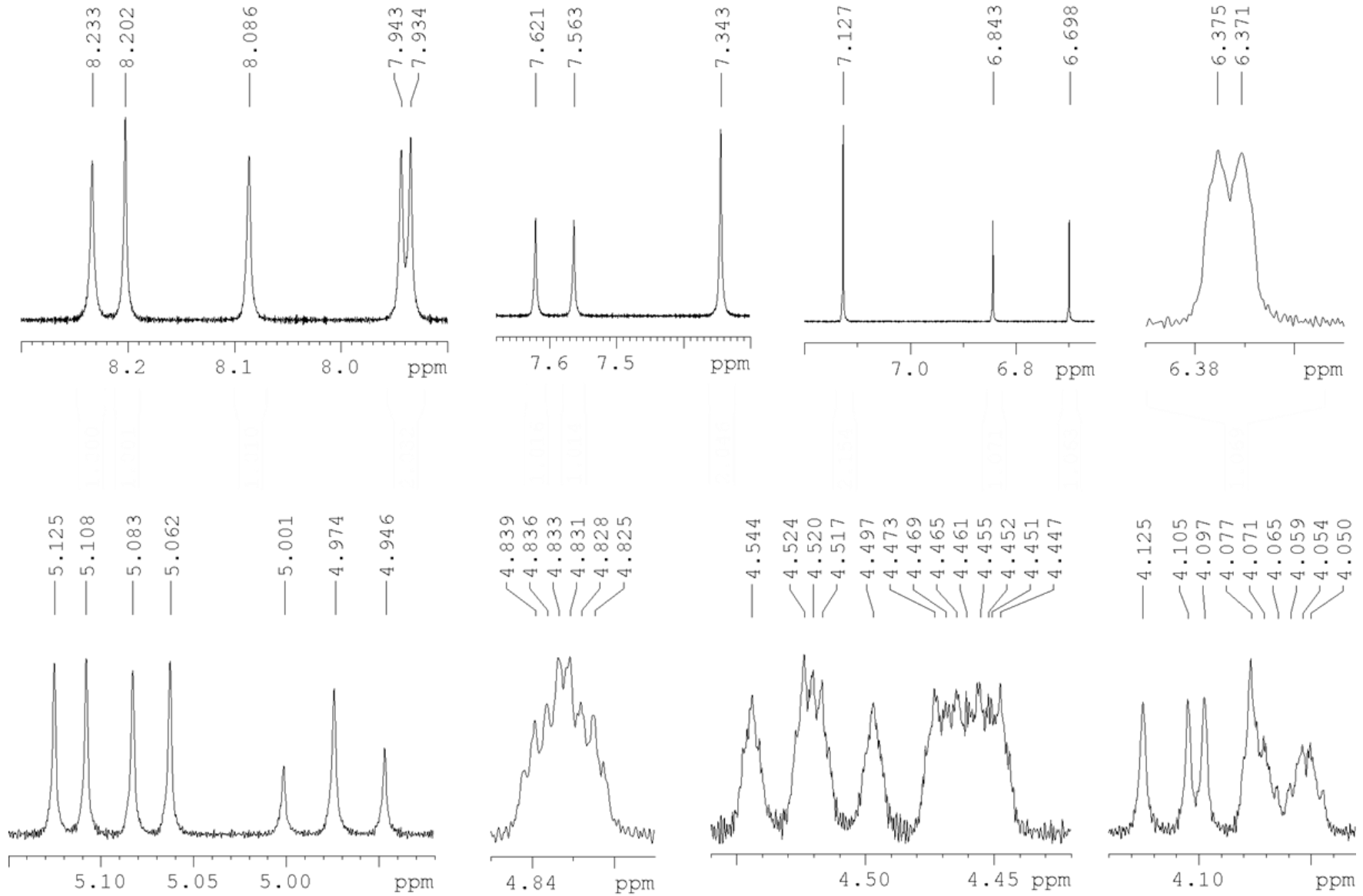


Figura 41 – Expansão do espectro de RMN de ^1H obtido para T2A (400 MHz, CD_3COCD_3).

Tabela 9 – Atribuições dos sinais de RMN de ^1H obtidos para T2A (400 MHz, CD_3COCD_3).

H	Parte da molécula	1 (T2A)				2				3			
		δ (ppm)	M	In	J (Hz)	δ (ppm)	M	In	J (Hz)	δ (ppm)	M	In	J (Hz)
H-2,6	Gal anel A	7,13	s	2H	-	7,10	s	2H	-	7,13	s	2H	-
H-5	HHDP anel B	6,84	s	1H	-	6,85	s	1H	-	6,85	s	1H	-
H-5	HHDP anel C	6,70	s	1H	-	6,70	s	1H	-	6,70	s	1H	-
H-1	Glc	6,37	d	1H	1,6	6,42	d	1H	1,8	6,38	s	1H	-
H-6'	CH_2 -Glc	4,97	t	1H	11	5,10	t	1H	10,9	4,98	t	1H	11
H-6''	CH_2 -Glc	4,10	dd	1H	3,2 e 8	4,14	br s	1H	-	4,11	dd	1H	2,8 e 8
H-3	Glc	4,83	br s	1H	-	4,85	br s	1H	-	4,84	br s	1H	-
H-5	Glc	4,52	t	1H	9,4	4,50	m	1H	-	4,53	t	1H	9,4
H-4	Glc	4,46	br s	1H	-	4,40	br s	1H	-	4,46	br s	1H	-
H-2	Glc	4,06	d	1H	8,4	-	-	-	-	4,06	br s	1H	-

Nota: δ (ppm): deslocamento químico em ppm; **M:** multiplicidade; **J (Hz):** constante de acoplamento escalar em Hertz; **1:** valores de δ , M e J obtidos neste trabalho para T2A; **2:** valores de δ , M e J relatados por Kumaran & Karunakaran (2006) para corilagina (CD_3COCD_3 , 270 MHz); **3:** valores de δ , M e J relatados por Thitilertdech et al. (2010) para corilagina (CD_3COCD_3 , 400 MHz). Gal: galoil; HHDP: hexahidroxidifenoila; Glc: glicose; s: singleto; d: duplete; dd: duplo duplete; t: tripleto; q: quarteto; m: multiplete; br s: *broad shape* (sinal largo).

As atribuições do espectro de RMN ^1H obtido para T2A foram confirmadas pela análise do mapa de contornos homonuclear COSY (Figura 42). É possível verificar acoplamentos do tipo J na unidade de glicose por meio das manchas de correlação H1/H2 (Glc), H2/H3 (Glc), H3/H4 (Glc), H4/H5 (Glc), H5/H6a (Glc), H5/H6b (Glc), OH2/H2 (Glc) e OH4/H4 (Glc). Além disso, foram observados acoplamentos ‘W’ de longa distância ($^4J_{\text{HH}}$) na unidade glicopiranosídica, evidenciados pelas manchas de correlação H1/H3 (Glc), H3/H5 (Glc), e H2/H4 (Glc). Esses dados possibilitaram confirmar que a unidade glicopiranosídica da corilagina trata-se do anômero β (Hatano et al., 1988; Chae et al., 2014).

Os sinais relativos aos carbonos da porção glicosídica, assim como das unidades HHDP (anéis B e C) e galoíla, observados no espectro de RMN ^{13}C de T2A foram atribuídos com base nos dados do mapa de correlações ^1H - ^{13}C (HMQC). As correlações ^1H - ^{13}C observadas no mapa de contorno HMQC (Figuras 43 e 44) possibilitaram confirmar as atribuições dos sinais de ^{13}C listados na tabela 8.

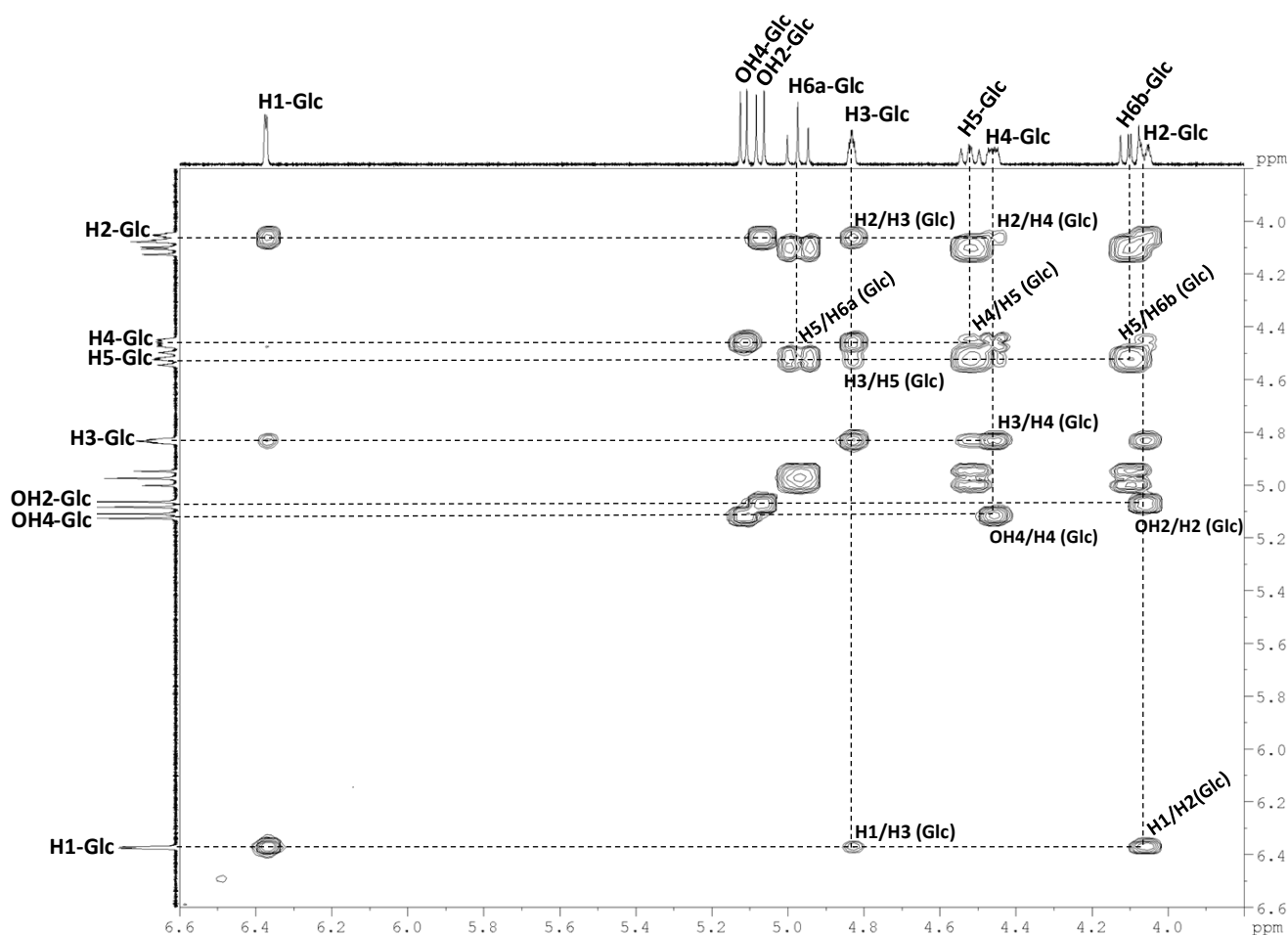


Figura 42 – Expansão do mapa de contornos COSY (400 MHz, CD_3COCD_3) obtido para T2A.

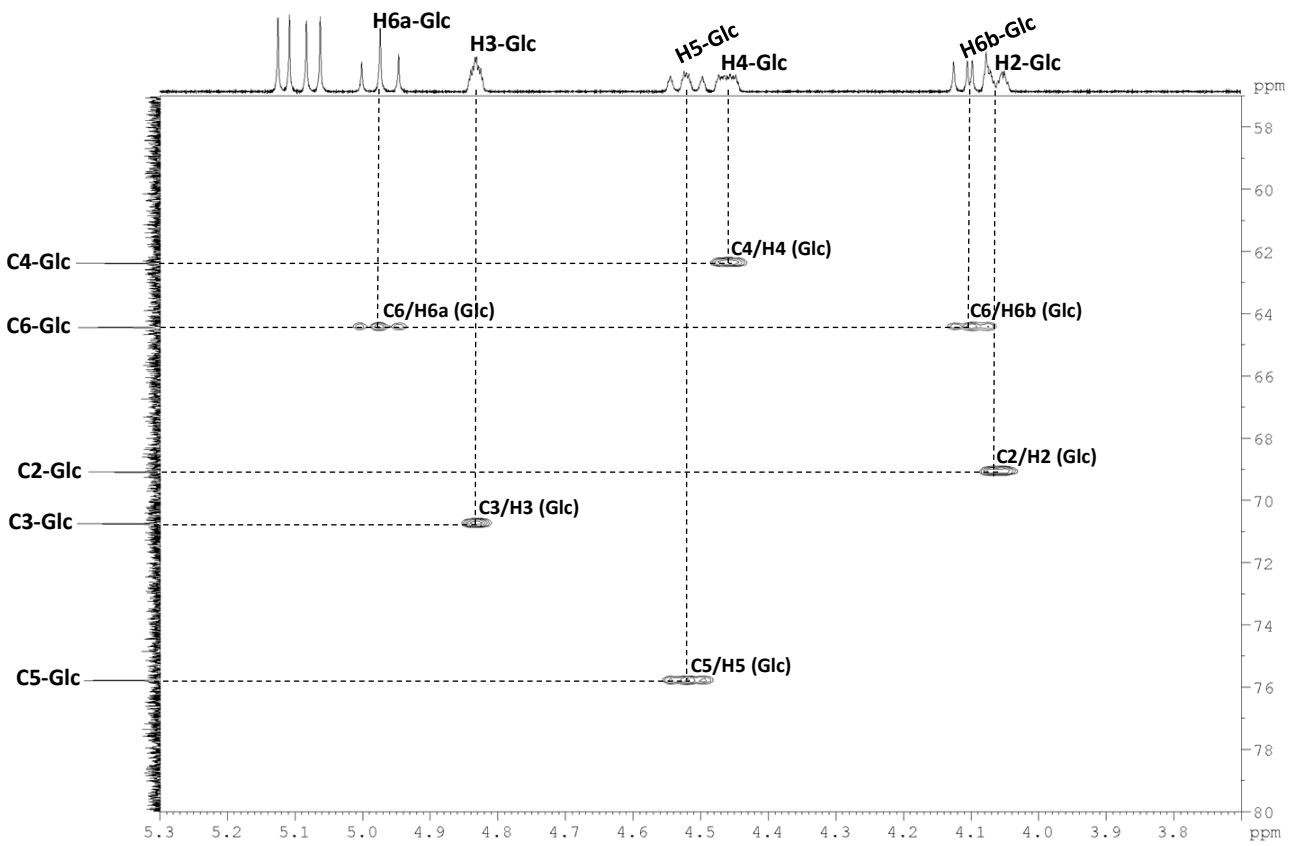


Figura 43 – Expansão do mapa de contornos HMQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T2A.

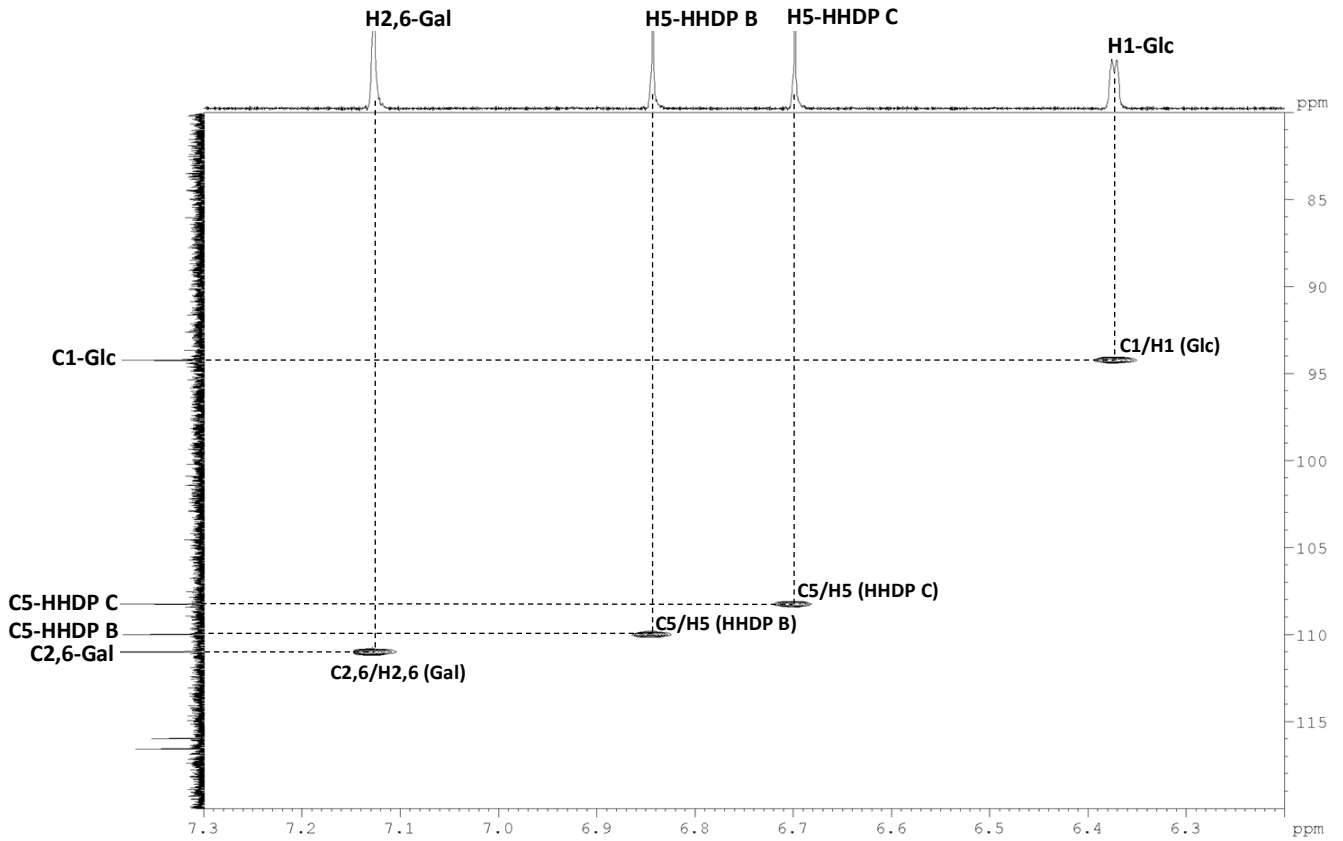


Figura 44 – Expansão do mapa de contornos HMQC (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T2A.

Os sítios de ligação dos grupos galoíla e HHDP foram confirmados pela análise das correlações do mapa de contornos HMBC (Figura 45). Foram verificados acoplamentos de longa distância ^{13}C - ^1H ($^3J_{\text{CH}}$) por intermédio das manchas de correlação C7 (C=O, Gal)/H1-Glc e C7 (C=O, HHDP C)/H6a-Glc, indicando a ligação dos grupos galoíla e HHDP aos carbonos C-1 e C-6 da unidade de glicose, respectivamente. Também foram identificadas manchas de correlação $^3J_{\text{CH}}$ entre os hidrogênios aromáticos e as carbonilas das ligações éster do grupo HHDP, a saber, C7/H5 (HHDP B) e C7/H5 (HHDP C) (Chae et al., 2014).

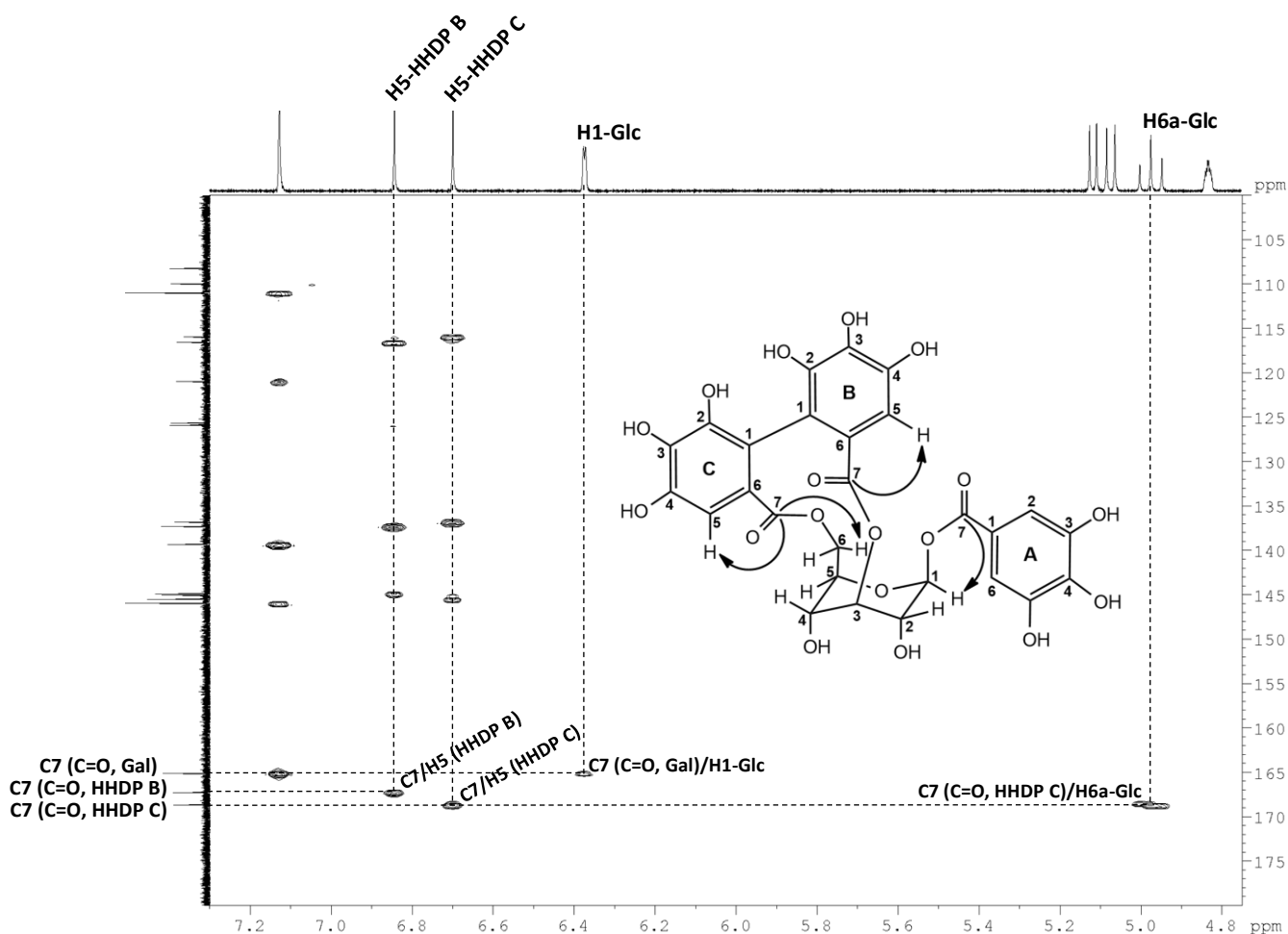


Figura 45 – Expansão do mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD_3COCD_3) obtido para T2A.

Os espectros de RMN de ^1H obtidos apresentaram sinais bem resolvidos e um grau de refinamento que permitiram determinar as constantes de acoplamento escalares (J) para 5 dos 7 prótons da unidade glicosídica, ao contrário das atribuições descritas na literatura para a corilagina que apresentaram até 3 valores de J . Além disso, é a primeira vez que foi registrado um duplete com valor de J calculado para o sinal em δ 4,06 ppm atribuído a H-2(Glc). Com

base nos dados experimentais descritos para T2A e pela comparação com os dados relatados na literatura, a estrutura química de T2A foi confirmada como sendo corilagina.

Importante ressaltar que não foram encontrados na literatura estudos sobre o isolamento e elucidação estrutural inequívoca por RMN para a corilagina obtida a partir das cascas do fruto de *Caryocar brasiliense*. Desta forma trata-se do primeiro relato nesse trabalho sobre sua obtenção e determinação estrutural a partir de um subproduto do fruto do pequi.

5.6.2.2 Confirmação estrutural da substância T1A

Análises da subfração T11 e substância isolada T1A por CLUE-ESI-MS (item 5.6.1) indicaram que o pico com $t_R \approx 4,26$ min tratava-se da geraniina (27). Dessa forma, a atribuição dos sinais dos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 47) e de ^1H (Figura 49) obtidos para T1A foi realizada a partir da comparação com os valores de deslocamentos químicos descritos na literatura (Din et al., 2013; Kurihara et al., 2014) para as formas hemiacetálicas (27-A e 27-B) da geraniina (Figura 46), presentes em solução acetônica. Os dados obtidos estão descritos nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

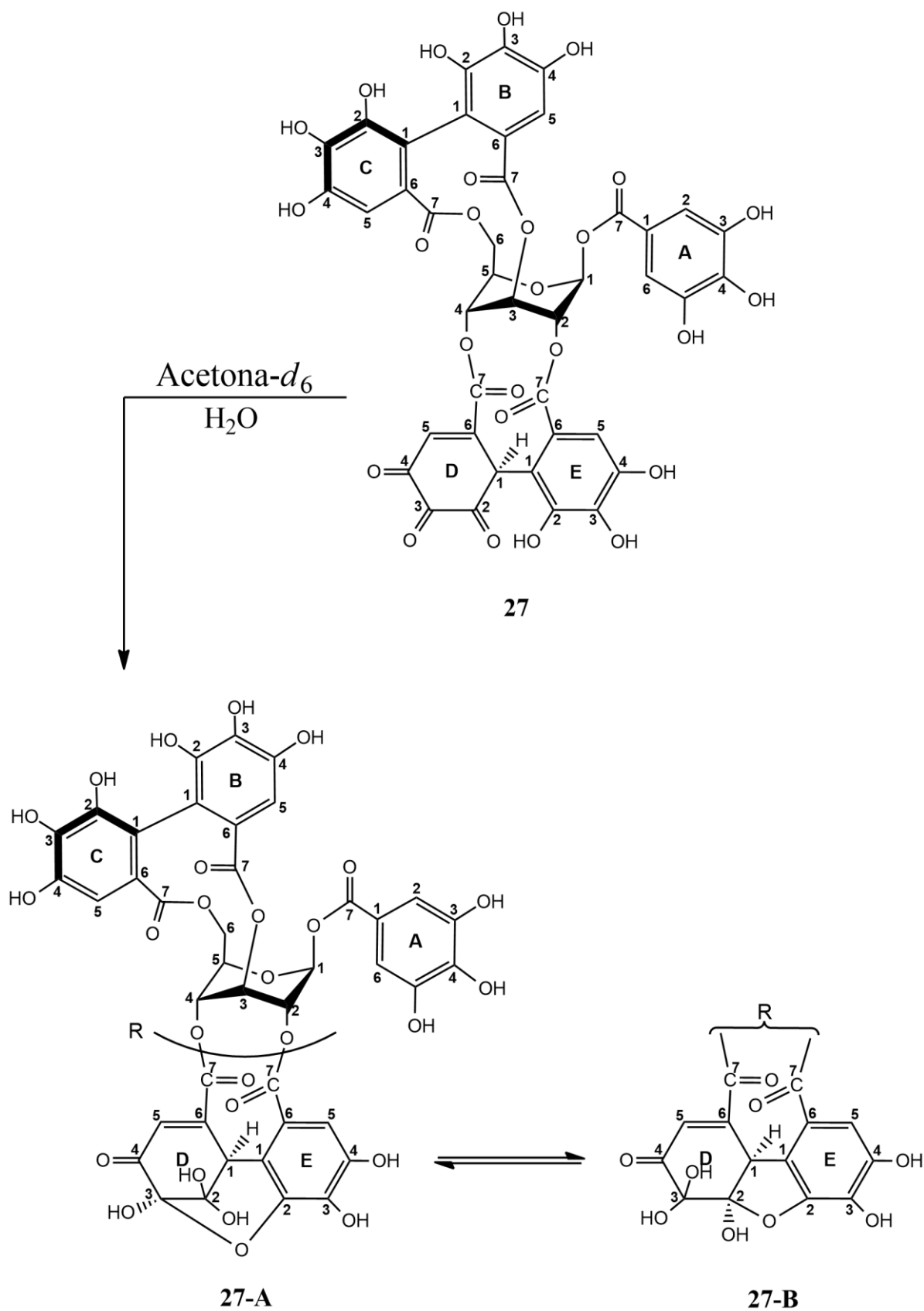


Figura 46 – Estrutura cristalina (27) e formas hemiacetálicas hidratadas (27-A e 27-B) da geraniina.

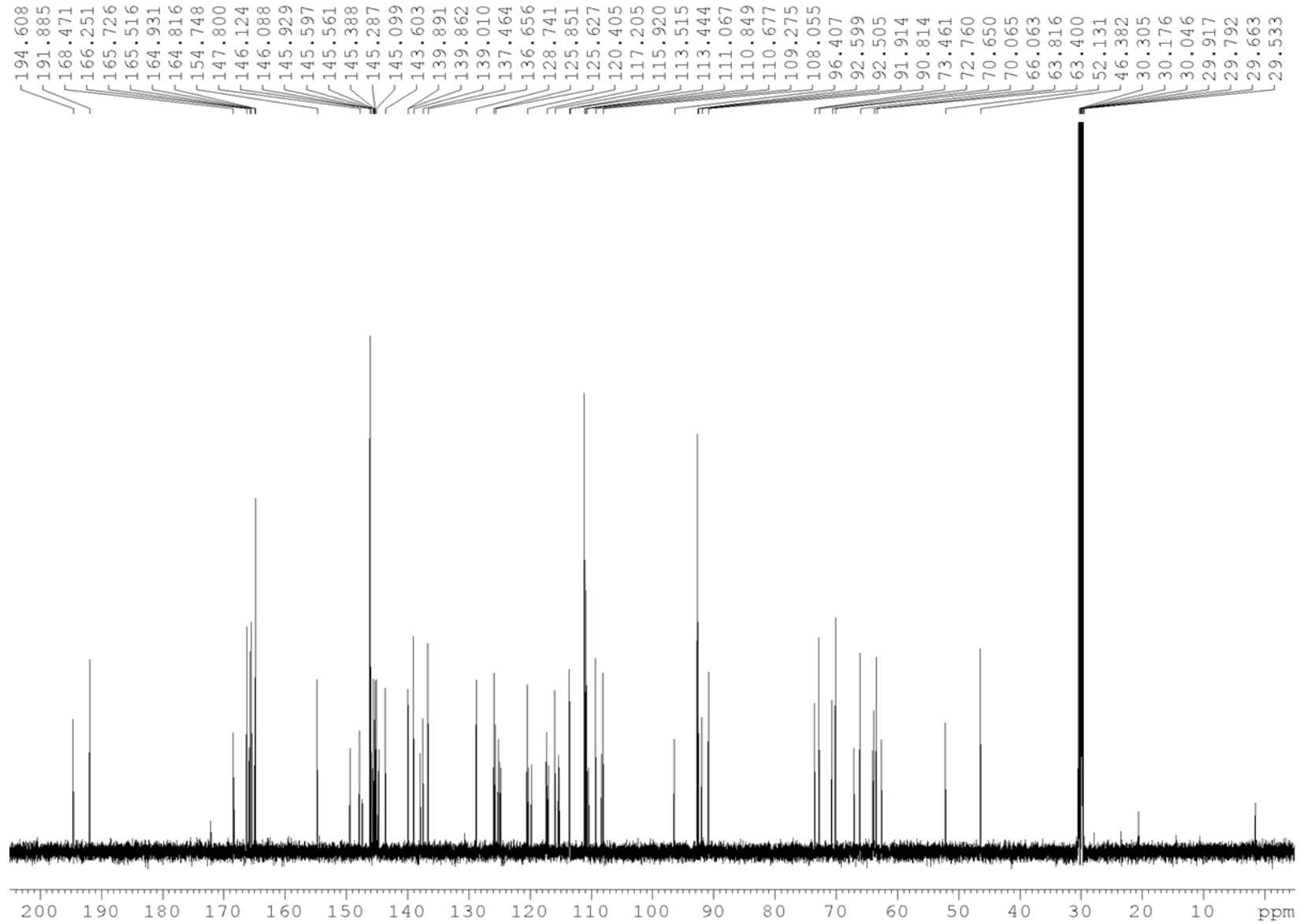


Figura 47 – Espectro de RMN de ^{13}C obtido para T1A (150 MHz, CD_3COCD_3).

De acordo com dados da literatura, quando a geraniina (**27**) é dissolvida em acetona- d_6 contendo 10% de D_2O e mantida em solução por 6 horas, ela sofre reações de hidratação produzindo uma mistura de formas hemiacetálicas (27-A e 27-B) na proporção 1:1, o que, em tese, facilitaria a interpretação dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C obtidos. Por outro lado, mais de 12 horas são necessárias para que a mistura de hemiacetais atinja a proporção 1:1, quando dissolvida no solvente deuterado anidro (Yamada et al., 2018). Entretanto, devido ao histórico de baixa estabilidade da geraniina frente à hidrólise, optou-se pela solubilização de T1A em acetona- d_6 anidra à 25°C e tempo de experimento de 24 horas no espectrômetro de RMN.

O espectro de RMN de ^{13}C obtido para T1A apresentou 41 sinais de carbonos em duplicidade, devido às configurações distintas do grupo DHHDP em anéis de 6 e 5 membros, referentes às formas hemiacetálicas hidratadas 27-A e 27-B da geraniina, respectivamente (Figura 47, Tabela 10). Cada conjunto de carbonos apresentou um par de sinais de ressonância com intensidades diferentes, sendo aqueles com maiores áreas correspondentes à forma 27-A da geraniina. Isso ocorreu devido à extensão do equilíbrio da mistura, que por não ter atingido a proporção 1:1 intensificou os sinais de uma das formas hemiacetálicas. Apesar disso, todos os sinais apresentaram intensidades suficientes para serem detectados e identificados no espectro de RMN de ^{13}C .

Após análise e interpretação dos dados do espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (Figuras 47 e 48) de T1A foi possível identificar 28 carbonos quaternários, 12 carbonos metínicos e 1 carbono metilênico para cada uma das formas hemiacetálicas da geraniina (Tabela 10). Os carbonos oximetínicos C-3, C-4, C-2, e C-5 da porção glicosídica (Glc) das formas A e B apresentaram valores de deslocamento químico de δ 63,4/62,5; 66,1/67,0; 70,1/70,7; e 72,8/73,5 ppm. Os carbonos oximetilênicos C-6 (Glc) apresentaram valores de δ de 63,8 e 63,9 ppm (formas A e B), enquanto os carbonos anoméricos C-1 (Glc) foram atribuídos aos sinais em δ 90,8 e 91,9 ppm (formas A e B). A porção galoila (Gal) apresentou carbonos aromáticos com δ de 110,7/111,1 (C-2/6; forma A); 110,4/110,8 ppm (C-2/6; forma B); 125,9/125,6 (C-1; formas A e B) e carbonos aromáticos oxigenados em δ 139,9/139,9 (C-4, formas A e B); 146,1/146,1 (C-3/5; forma A); e 146,1/147,8 (C-3/5; forma B). Por sua vez, as porções hexahidroxidifenoíla (HHDP) C e HHDP B apresentaram 6 carbonos aromáticos com valores de deslocamento químico de 108,1 ppm (C-5, HHDP anel C) a 124,9 ppm (C-6, HHDP anel B) para a forma A, e de 108,2 ppm (C-5, HHDP anel C) a 120,4 ppm (C-6, HHDP anel B) para a forma B. Também foram identificados 6 carbonos aromáticos oxigenados nos intervalos de δ de 136,7 ppm (C-3, HHDP anel C) a 145,6 ppm (C-2, HHDP anel B) para a forma A, e de 136,6 ppm (C-3, HHDP anel C) a 145,6 ppm (C-2, HHDP anel B) para a forma B. Os sinais em δ

Tabela 10 – Atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C obtidos para T1A (150 MHz, CD_3COCD_3).

C	Parte da molécula	1 (T1A)			2	
		Forma A δ (ppm)	Forma B δ (ppm)	DEPT-135	Forma A δ (ppm)	Forma B δ (ppm)
C-3	Glc	63,4	62,5	CH	63,2	62,4
C-6	Glc	63,8	63,9	CH ₂	63,7	63,7
C-4	Glc	66,1	67,0	CH	65,9	66,9
C-2	Glc	70,1	70,7	CH	69,9	70,5
C-5	Glc	72,8	73,5	CH	72,6	73,3
C-1	Glc	90,8	91,9	CH	90,6	91,8
C-2,6	Gal anel A	110,7/111,1	110,4/110,8	CH	110,7/110,9	110,5/110,8
C-1	Gal anel A	125,9	125,6	C	125,7	125,5
C-4	Gal anel A	139,9	139,9	C	139,7	139,7
C-3,5	Gal anel A	146,1/146,1	146,1/147,8	C	145,9/145,9	145,9/147,6
C7 (C=O)	Gal anel A	168,5	168,3	C	168,3	168,2
C-5	HHDP anel C	108,1	108,2	CH	107,9	108,1
C-5	HHDP anel B	108,1	108,2	CH	107,9	108,1
C-1	HHDP anel C	115,3	117,0	C	115,8	116,8
C-1	HHDP anel B	117,2	117,3	C	117,1	117,2
C-6	HHDP anel C	120,4	120,3	C	120,2	120,1
C-6	HHDP anel B	124,9	120,4	C	124,8	120,2
C-3	HHDP anel C	136,7	136,6	C	136,5	136,5
C-3	HHDP anel B	137,9	137,9	C	137,8	137,3
C-4	HHDP anel C	145,1	144,7	C	144,9	144,6
C-2	HHDP anel C	145,3	144,8	C	145,1	145,0
C-4	HHDP anel B	145,4	145,2	C	145,4	145,2
C-2	HHDP anel B	145,6	145,6	C	145,8	145,4
C7 (C=O)	HHDP anel C	164,8	164,9	C	164,6	164,8
C7 (C=O)	HHDP anel B	165,7	165,9	C	165,6	165,7
C-1	DHHDP anel D	46,4	52,1	CH	46,2	52,0
C-2	DHHDP anel D	92,6	109,3	C	92,5	109,1
C-3	DHHDP anel D	96,4	92,5	C	96,2	92,4
C-5	DHHDP anel D	128,7	125,1	CH	128,6	125,0
C-6	DHHDP anel D	154,7	149,4	C	154,6	149,2
C-7 (C=O)	DHHDP anel D	165,5	165,5	C	165,4	165,0
C-4 (C=O)	DHHDP anel D	191,9	194,6	C	191,7	194,5
C-5	DHHDP anel E	113,5	113,4	CH	113,4	113,3
C-1	DHHDP anel E	115,9	115,2	C	115,7	115,1
C-6	DHHDP anel E	119,7	124,8	C	119,6	124,6
C-3	DHHDP anel E	139,0	137,5	C	138,8	137,7
C-2	DHHDP anel E	143,6	147,4	C	143,5	147,2
C-4	DHHDP anel E	144,7	145,9	C	144,5	145,9
C-7 (C=O)	DHHDP anel E	166,3	166,3	C	166,1	167,2

Nota: δ (ppm): deslocamento químico em ppm; **1:** valores de δ e atribuições do DEPT-135 obtidos neste trabalho para T1A; **2:** valores de δ relatados por Kurihara et al. (2014) para as formas hemiacetálicas A e B da geraniina (CD_3COCD_3 , 125 MHz). Glc: glicose; Gal: galoil; HHDP: hexahidroxidifenoila; DHHDP: desidrohexahidroxidifenoila.

164,8/164,9; 165,7/165,9; e 168,5/168,3 ppm foram atribuídos, respectivamente, às carbonilas das formas A e B em C-7 do HHDP do anel C; C-7 do HHDP do anel B e C-7 da Gal do anel

A. O anel E do grupamento DHHDP apresentou três carbonos aromáticos em δ 113,5/113,4 ppm (C-5, formas A e B); 115,9/115,2 ppm (C-1, formas A e B); e 119,7/124,8 ppm (C-6, formas A e B); três carbonos aromáticos oxigenados em δ 139,0/137,5 ppm (C-3, formas A e B); 143,6/147,4 ppm (C-2, formas A e B); e 144,7/145,9 ppm (C-4; formas A e B); e uma carbonila em 166,3/166,3 ppm (C-7, formas A e B). O anel D (DHHDP) apresenta em sua estrutura ciclohexênica 1 carbono alicíclico metínico em δ 46,4/52,1 ppm (C-1, formas A e B); 2 carbonos olefínicos em 128,7/125,1 ppm (C-5, formas A e B) e 154,7/149,4 ppm (C-6, formas A e B); além de 2 carbonilas em δ 165,5/165,5 ppm (C-7, formas A e B) e 191,9/194,6 ppm (C-4, formas A e B), cujos valores de deslocamento químico apresentaram ligeiras variações entre as formas hemiacetálicas (Pavia et al., 2010). De maneira oposta, os valores de δ referentes aos carbonos C-2 e C-3 do anel D apresentaram variações significativas entre as formas hemiacetálicas A e B. Assim, o valor de δ do carbono diol (C-2) é de 92,6 ppm para a forma A e de 109,3 ppm para a forma B. Isso ocorreu devido à mutarotação do anel furanosídico da forma A (6 membros) para a estrutura piranosídica (5 membros) da forma B, com conseqüente alteração do deslocamento químico do carbono contendo o grupo diol (92,6 ppm), resultando na formação de uma ligação de éter cíclico (109,3 ppm) em C-2. De forma análoga, a mutarotação modificou o valor de deslocamento químico de C-3 de 96,4 ppm (forma A) para 92,5 ppm (forma B), decorrente da alteração da ligação éter (forma A) para grupo diol (forma B) em C-3 (Okuda et al., 1980; Din et al., 2013).

As atribuições dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C de T1A (Figuras 47 e 48) foram concordantes com os valores relatados na literatura para as formas hemiacetálicas hidratadas A e B da geraniina, em espectros obtidos no mesmo solvente (Tabela 10), indicando tratar-se do mesmo composto químico (Kurihara et al., 2014).

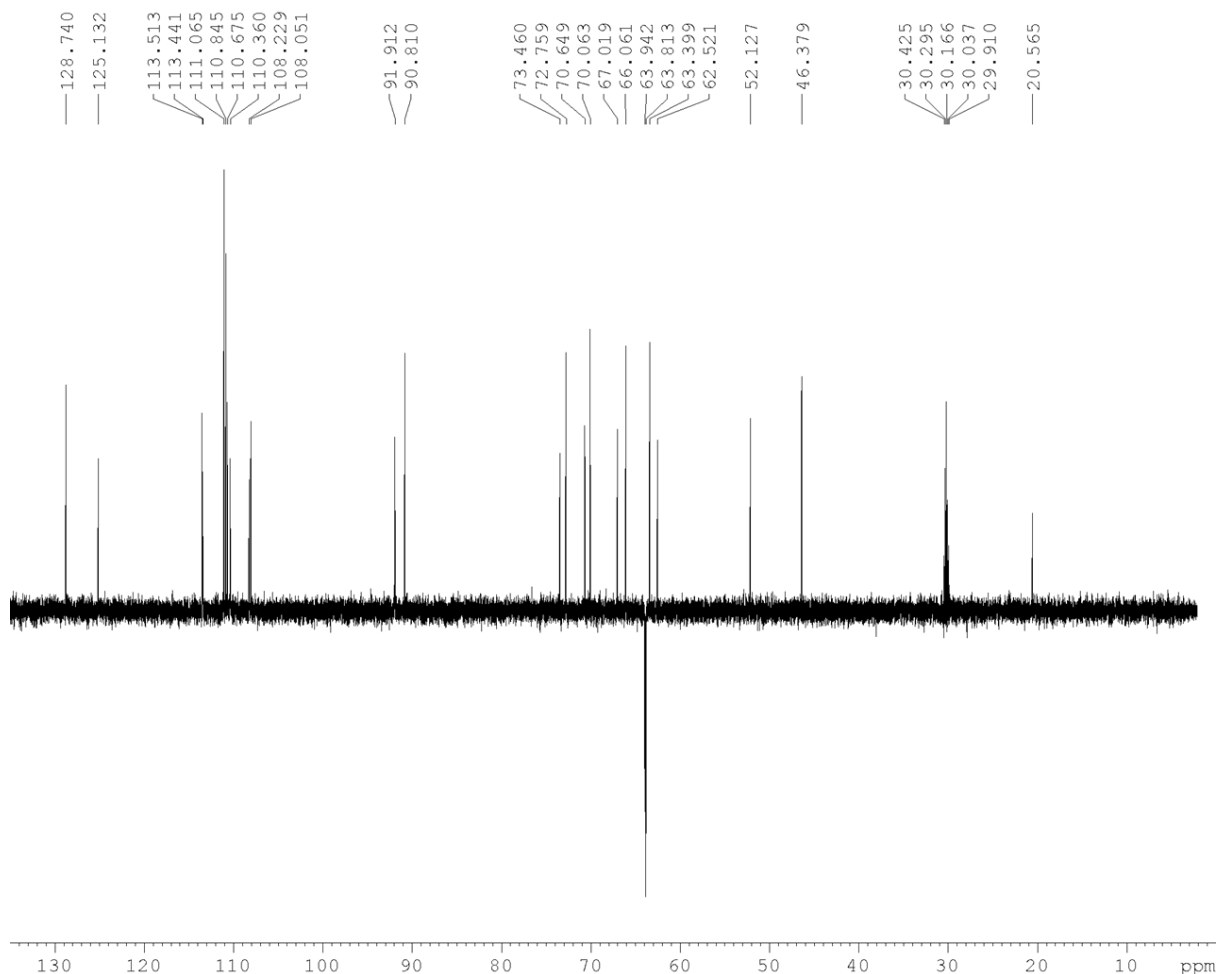


Figura 48 – Subespectro DEPT-135 obtido para T1A (150 MHz, CD_3COCD_3).

De modo análogo ao observado no espectro de RMN de ^{13}C , os sinais dos prótons correspondentes às formas hemiacetálicas hidratadas A e B apareceram com intensidades distintas no espectro de RMN de ^1H obtido para T1A. Após a integração e avaliação dos sinais, observou-se que os sinais dos hidrogênios relativos à forma 26-B apresentaram intensidade cerca de 3 vezes inferior à observada para os sinais da forma 26-A, indicando uma mistura de formas hemiacetálicas na proporção de 3:1 (formas A e B, respectivamente). Apesar da complexidade para processamento do espectro de RMN ^1H de T1A, a diferença observada nos valores das integrais (In) dos sinais facilitou a identificação dos sinais correspondentes às formas hemiacetálicas A (In $\approx 1,00$) e B (In $\approx 0,33$) da geraniina.

O espectro de RMN de ^1H obtido para T1A (Figuras 49 e 50) exibiu um singleto em δ 7,26 ppm (In $\approx 0,31$, 1H, s) atribuído ao próton aromático H-5 (DHHDP anel E) da forma B, bem como um singleto em δ 7,21 ppm (In $\approx 1,99$, 2H, s), atribuído aos prótons aromáticos H-2/6 (Gal anel A) da forma A. Também foi observado um singleto em δ 7,20 ppm (In $\approx 1,54$) atribuído ao próton aromático H-5 (DHHDP anel E) da forma A, parcialmente sobreposto aos

sinais acima discriminados em δ 7,21 e 7,26 ppm. Adicionalmente, observou-se um singlete em δ 7,15 ppm ($I_n \approx 1,05$, 1H, s) atribuído ao próton aromático H-5 (HHDP anel C) da forma A; um singlete em δ 7,09 ppm ($I_n \approx 0,30$, 1H, s) atribuído ao próton aromático H-5 (HHDP anel C) da forma B; dois singletos em δ 6,67 e 6,65 ppm atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios aromáticos H-5 da forma A ($I_n \approx 1,07$, 1H, s, HHDP anel B) e H-5 da forma B ($I_n \approx 0,38$, 1H, s, HHDP anel B). Os dois singletos largos parcialmente sobrepostos em δ 6,56 e 6,55 ppm foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios glicosídicos H-1 da forma B ($I_n \approx 0,35$, 1H, br s, Glc) e H-1 da forma A ($I_n \approx 1,05$, 1H, br s, Glc). O singlete em δ 6,53 ppm ($I_n \approx 0,98$, 1H, s) foi atribuído ao próton olefínico H-5 (DHHDP anel D) da forma A, enquanto o duplete em δ 6,25 ppm ($I_n \approx 0,36$, 1H, d) foi atribuído ao próton olefínico H-5 (DHHDP anel D) da forma B. Por sua vez, o multiplete em δ 5,58 ppm ($I_n \approx 0,48$, 1H, m) foi relacionado à H-2 (Glc) da forma B e o singlete largo em δ 5,56 ppm ($I_n \approx 1,08$, 1H, br s) à H-2 (Glc) da forma A. O multiplete centrado em δ 5,51 ppm apresentou valor de integral próximo a 2,28, referente à soma dos sinais atribuídos aos hidrogênios glicosídicos H-3 e H-4 (Glc) da forma A ($I_n \approx 2,00$, 2H, m) e H-3 (Glc) da forma B ($I_n \approx 0,28$, 1H, m). O duplete largo em δ 5,42 ppm ($I_n \approx 0,41$, 1H, br d) foi atribuído a H-4 (Glc) da forma B enquanto o singlete em δ 5,16 ppm ($I_n \approx 1,12$, 1H, s) foi associado a H-1 (DHHDP anel D) da forma A. Por sua vez, o tripleto e multiplete parcialmente sobrepostos em δ 4,94 ppm foram atribuídos ao hidrogênio H-6' (CH₂-Glc) da forma A ($I_n \approx 1,00$, 1H, t) e próton H-1 (DHHDP anel D) da forma B ($I_n \approx 0,53$, 1H, m), respectivamente. O multiplete centrado em δ 4,80 ppm e o duplete duplo em δ 4,77 ppm, parcialmente sobrepostos, foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios glicosídicos H-6a e H-5 da forma B ($I_n \approx 0,88$, 2H, m, Glc) e H-5 da forma A ($I_n \approx 1,00$, 1H, dd, Glc). Por fim, o duplete duplo em δ 4,43 ppm ($I_n \approx 0,51$, 1H, dd) foi atribuído a H-6b (CH₂-Glc) da forma B, enquanto o duplete duplo em δ 4,30 ppm ($I_n \approx 1,21$, 1H, dd) foi creditado à H-6b (CH₂-Glc) da forma A.

Os valores de δ_H encontrados para T1A (Tabela 11) apresentaram grande correspondência com aqueles descritos na literatura para as formas hemiacetálicas hidratadas A e B da geraniina (Kurihara et al., 2014).

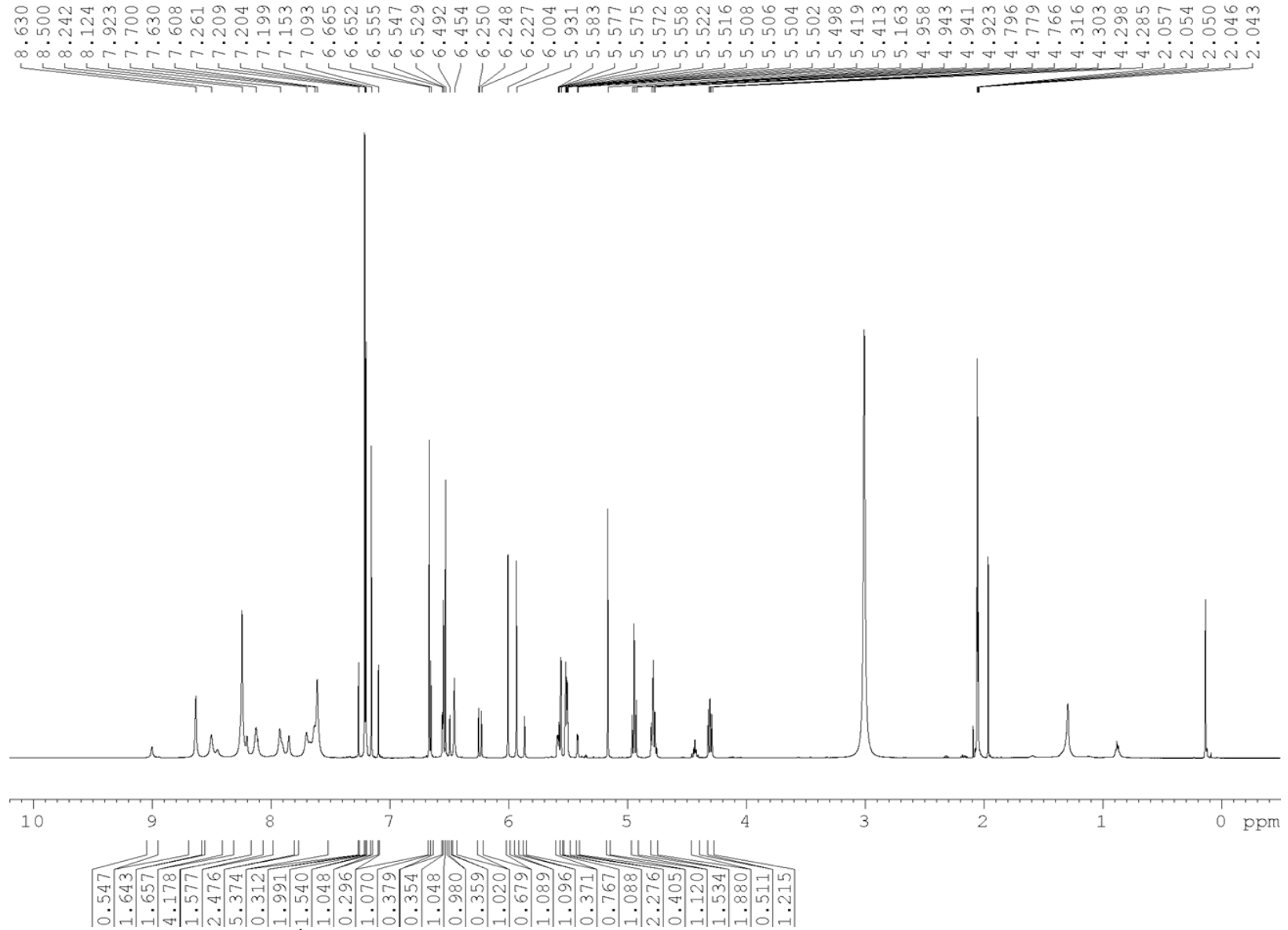


Figura 49 – Espectro de RMN de ^1H obtido para T1A (600 MHz, CD_3COCD_3).

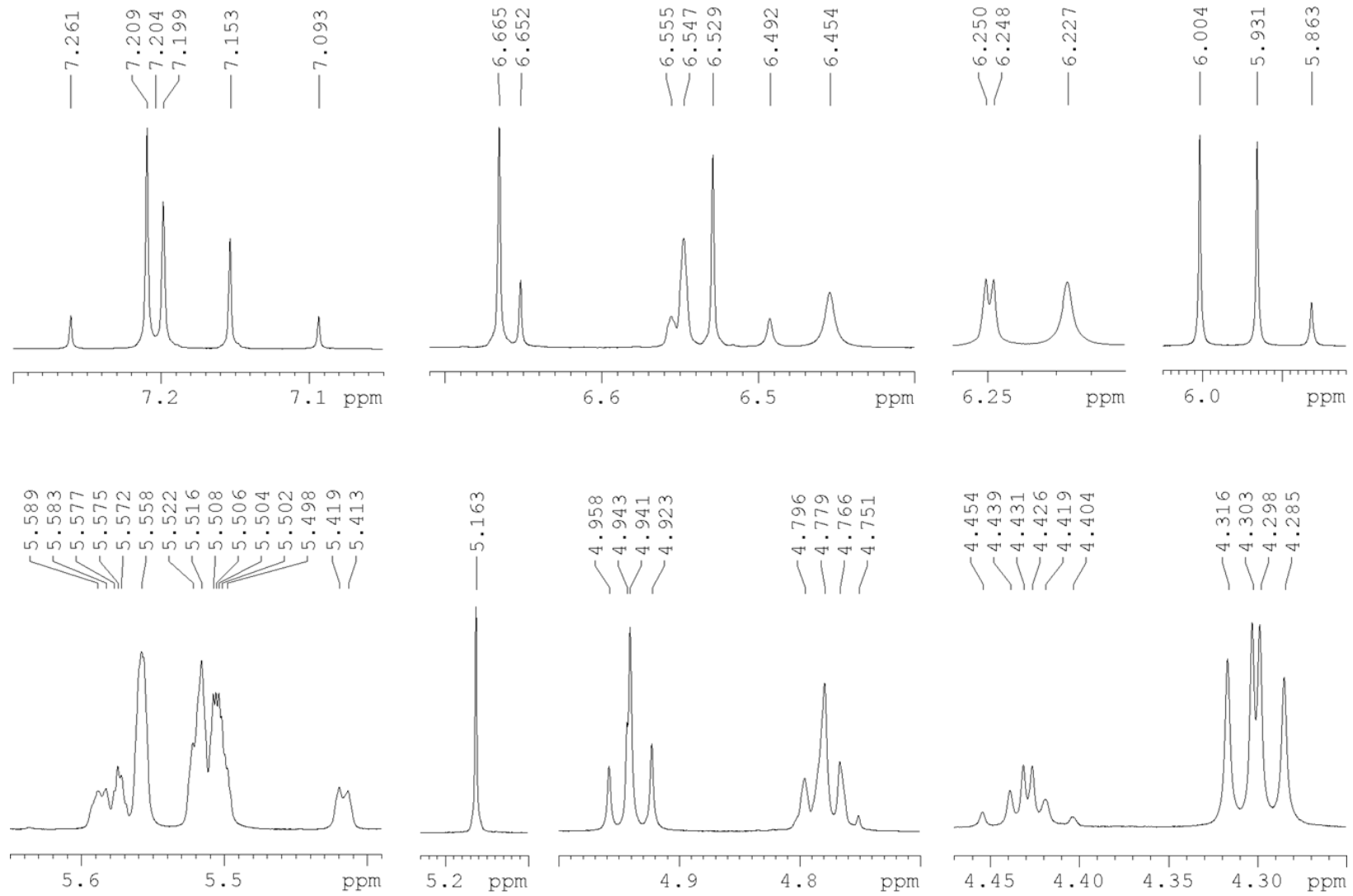


Figura 50 – Expansão do espectro de RMN de ^1H obtido para T1A (600 MHz, CD_3COCD_3).

Tabela 11 – Atribuições dos sinais de RMN de ¹H obtidos para T1A (600 MHz, CD₃COCD₃).

H	Parte da molécula	1(T1A) - Forma A				1 (T1A) - Forma B				2 - Forma A				2 - Forma B			
		δ (ppm)	M	In	J (Hz)	δ (ppm)	M	In	J (Hz)	δ (ppm)	M	In	J (Hz)	δ (ppm)	M	In	J (Hz)
H-2,6	Gal anel A	7,21	s	2H	-	7,20	s	2H	-	7,22	s	2H	-	7,21	s	2H	-
H-5	HHDP anel C	7,15	s	1H	-	7,09	s	1H	-	7,16	s	1H	-	7,10	s	1H	-
H-5	HHDP anel B	6,67	s	1H	-	6,65	s	1H	-	6,68	s	1H	-	6,66	s	1H	-
H-1	Glc	6,55	br s	1H	-	6,56	br s	1H	-	6,55	br s	1H	-	6,56	br s	1H	-
H-2	Glc	5,56	br s	1H	-	5,58	m	1H	-	5,59	br s	1H	-	5,59	br s	1H	-
H-3	Glc	5,51	m	1H	-	5,51	m	1H	-	5,52	br s	1H	-	5,52	br s	1H	-
H-4	Glc	5,51	m	1H	-	5,42	br d	1H	4	5,52	br s	1H	-	5,42	br d	1H	4
H-6'	CH ₂ -Glc	4,94	t	1H	11	4,80	m	1H	-	4,95	t	1H	11	4,79	m	1H	-
H-5	Glc	4,77	dd	1H	8; 11	4,80	m	1H	-	4,79	dd	1H	8; 11	4,79	m	1H	-
H-6''	CH ₂ -Glc	4,30	dd	1H	8; 11	4,43	dd	1H	5; 8	4,31	dd	1H	8; 11	4,44	dd	1H	5; 8
H-5	DHHDP anel E	7,20	s	1H	-	7,26	s	1H	-	7,21	s	1H	-	7,13	s	1H	-
H-5	DHHDP anel D	6,53	s	1H	-	6,25	d	1H	1,4	6,55	s	1H	-	6,26	d	1H	1,3
H-1	DHHDP anel D	5,16	s	1H	-	4,94	m	1H	-	5,18	s	1H	-	4,95	m	1H	-

Nota: δ (ppm): deslocamento químico em ppm; **M:** multiplicidade; **J (Hz):** constante de acoplamento escalar em Hertz; **1:** valores de δ, M e J obtidos neste trabalho para as formas hemiacetálicas A e B de T1A; **2:** valores de δ, M e J relatados por Kurihara et al. (2014) para as formas hemiacetálicas A e B da geraniina (CD₃COCD₃, 600 MHz). Gal: galoil; HHDP: hexahidroxidifenóila; Glc: glicose; DHHDP: desidrohexahidroxidifenóila; s: singleto; d: dupleteo; dd: duplo dupleteo; t: tripleteo; m: multipleteo; br s: *broad shape* (sinal largo); br d: dupleteo largo.

Algumas das atribuições do espectro de RMN de ^1H obtido para T1A, referentes às formas hemiacetálicas hidratadas A e B, foram confirmadas pela análise do mapa de contornos homonuclear COSY (Figuras 51 e 52). Para a forma hemiacetálica A (Figura 51) foi possível verificar acoplamentos escalares do tipo J na unidade de glicose por meio das manchas de correlação H1/H2 (Glc), H4/H5 (Glc), H5/H6a (Glc), H5/H6b (Glc) e H6a/H6b (Glc). Também foram observados acoplamentos ‘W’ de longa distância ($^4J_{\text{HH}}$) no anel glicopiranosídico indicados pelas manchas de correlação entre H1/H3 (Glc) e H3/H5 (Glc). Para o hemiacetal B (Figura 52), foram identificados acoplamentos do tipo J na unidade de glicose por meio das manchas de correlação H1/H2 (Glc), H5/H4 (Glc), H6b/H5 (Glc) e H6a/H6b (Glc). Os acoplamentos ‘W’ de longa distância ($^4J_{\text{HH}}$) foram identificados pelas manchas de correlação entre H1/H3 (Glc), H3/H5 (Glc), H2/H4 (Glc) e H1/H5 (DHHDP anel D). Além disso, os acoplamentos escalares (J) entre H1/H2 e H4/H5 (Glc) e de longa distância ($^4J_{\text{HH}}$) entre H1/H3 e H3/H5 (Glc) supracitados comprovaram que para ambas estruturas hemiacetálicas hidratadas A e B da geraniina o núcleo glicopiranosídico na forma β adotou uma conformação do tipo cadeira invertida ($^1\text{C}_4$) com todos os hidrogênios em posição equatorial (Hatano et al., 1988; Yamada et al., 2018).

As atribuições dos sinais de ressonância dos carbonos do núcleo glicosídico, da porção galoíla e das unidades HHDP (anéis B e C) e DHHDP (anéis D e E), realizadas pela análise do espectro de RMN de ^{13}C de T1A, foram confirmadas pela interpretação do mapa de contornos heteronuclear HMQC (Figuras 53-56). As manchas de correlação observadas permitiram confirmar as atribuições dos sinais de RMN de ^{13}C descritas na tabela 10 para as formas hemiacetálicas A (Figuras 53 e 54) e B (Figuras 55 e 56) da geraniina.

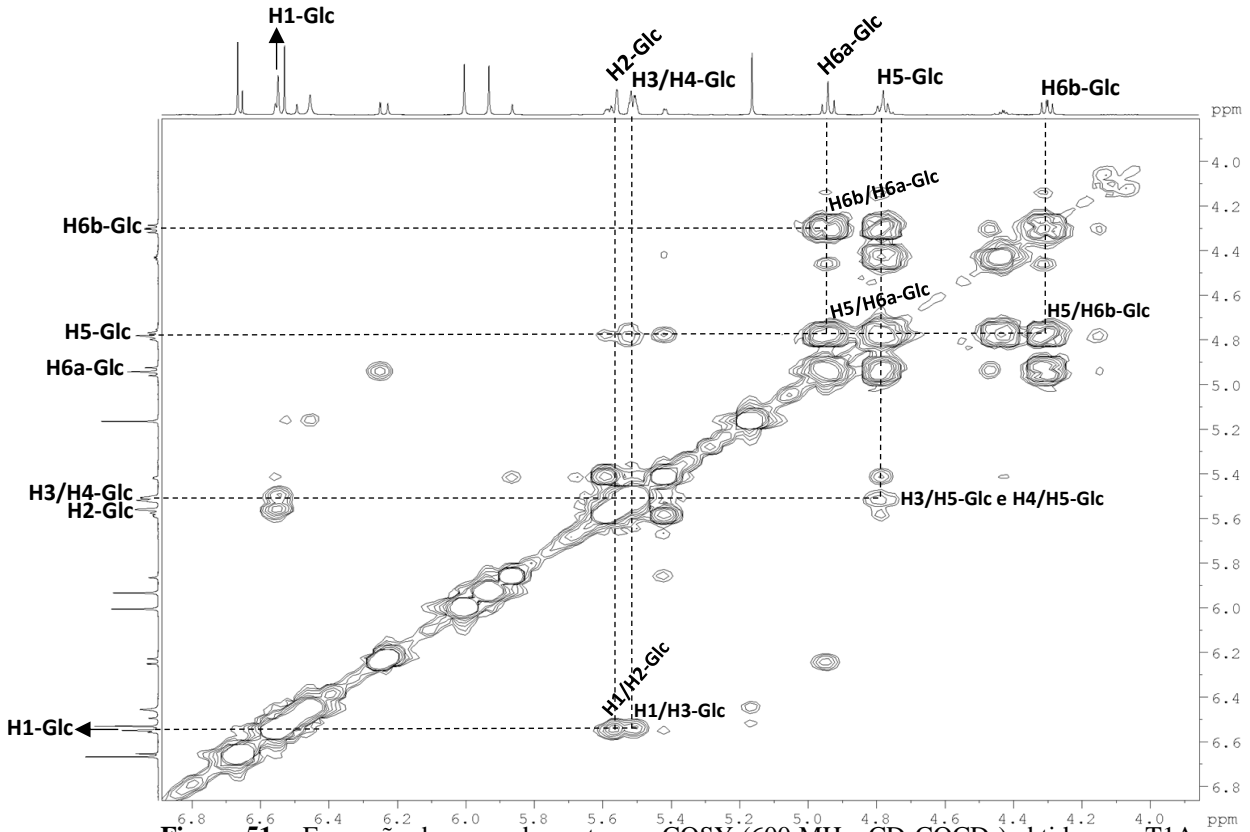


Figura 51 – Expansão do mapa de contornos COSY (600 MHz, CD₃COCD₃) obtido para T1A, evidenciando as correlações entre os hidrogênios da forma hemiacetálica A.

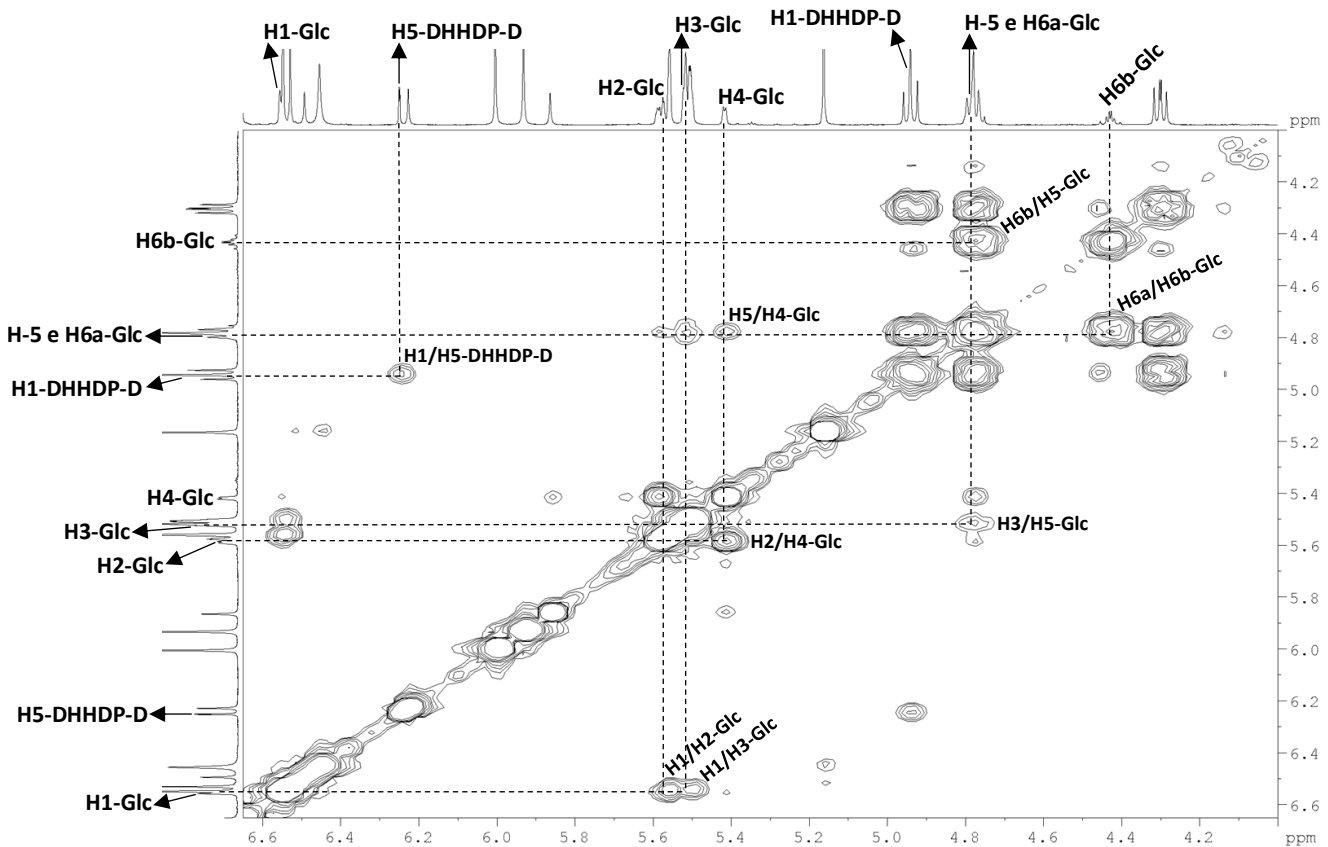


Figura 52 – Expansão do mapa de contornos COSY (600 MHz, CD₃COCD₃) obtido para T1A, evidenciando as correlações entre os hidrogênios da forma hemiacetálica B.

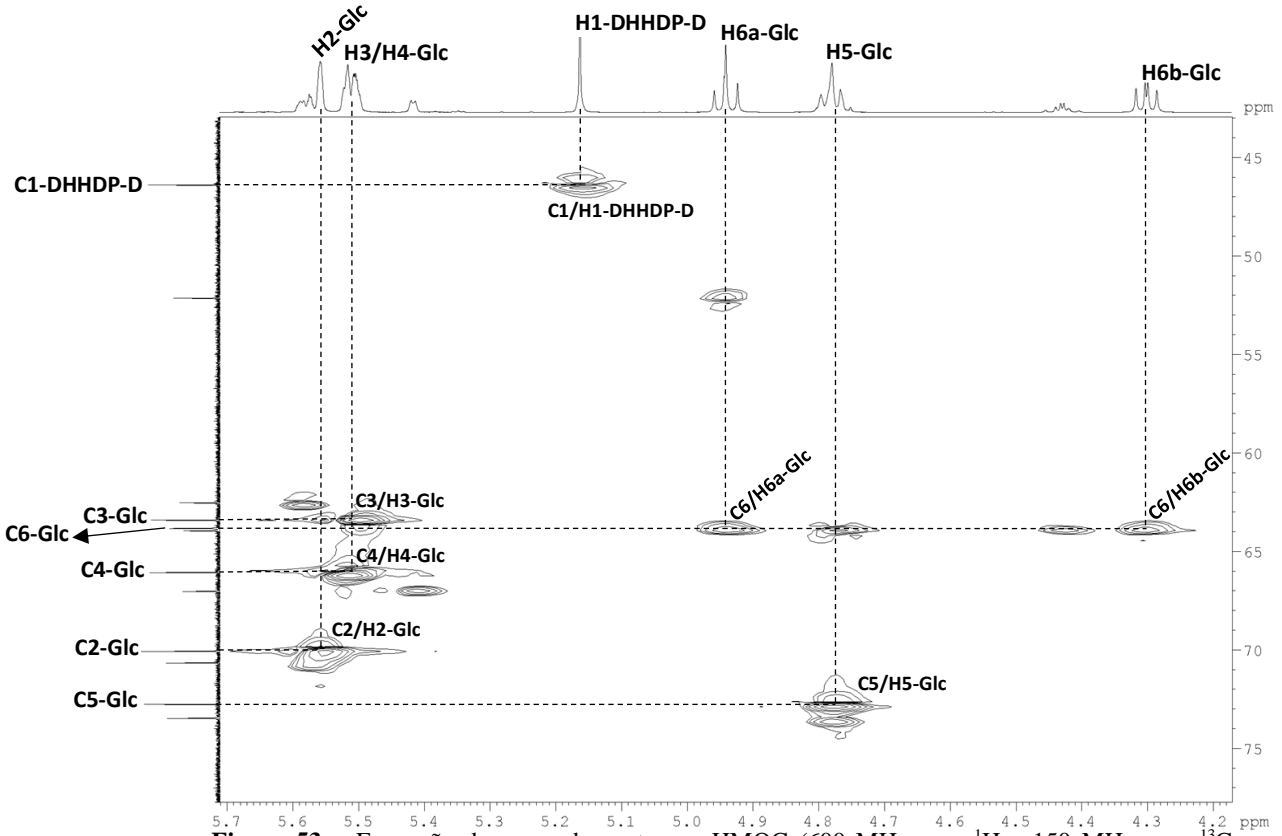


Figura 53 – Expansão do mapa de contornos HMQC (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T1A, evidenciando as correlações ^1H - ^{13}C da forma hemiacetálica A (δ_{C} de 40-80 ppm).

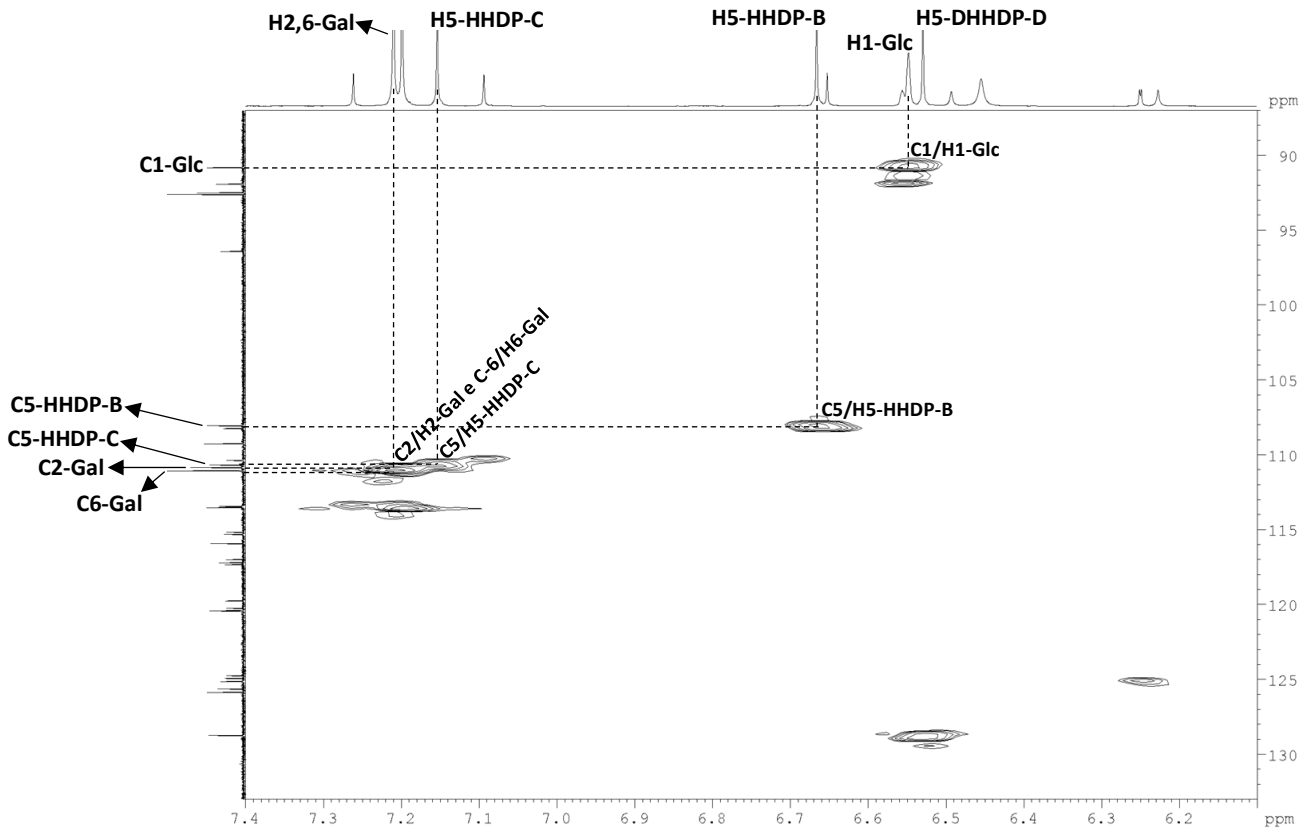


Figura 54 – Expansão do mapa de contornos HMQC (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T1A, evidenciando as correlações ^1H - ^{13}C da forma hemiacetálica A (δ_{C} de 85-135 ppm).

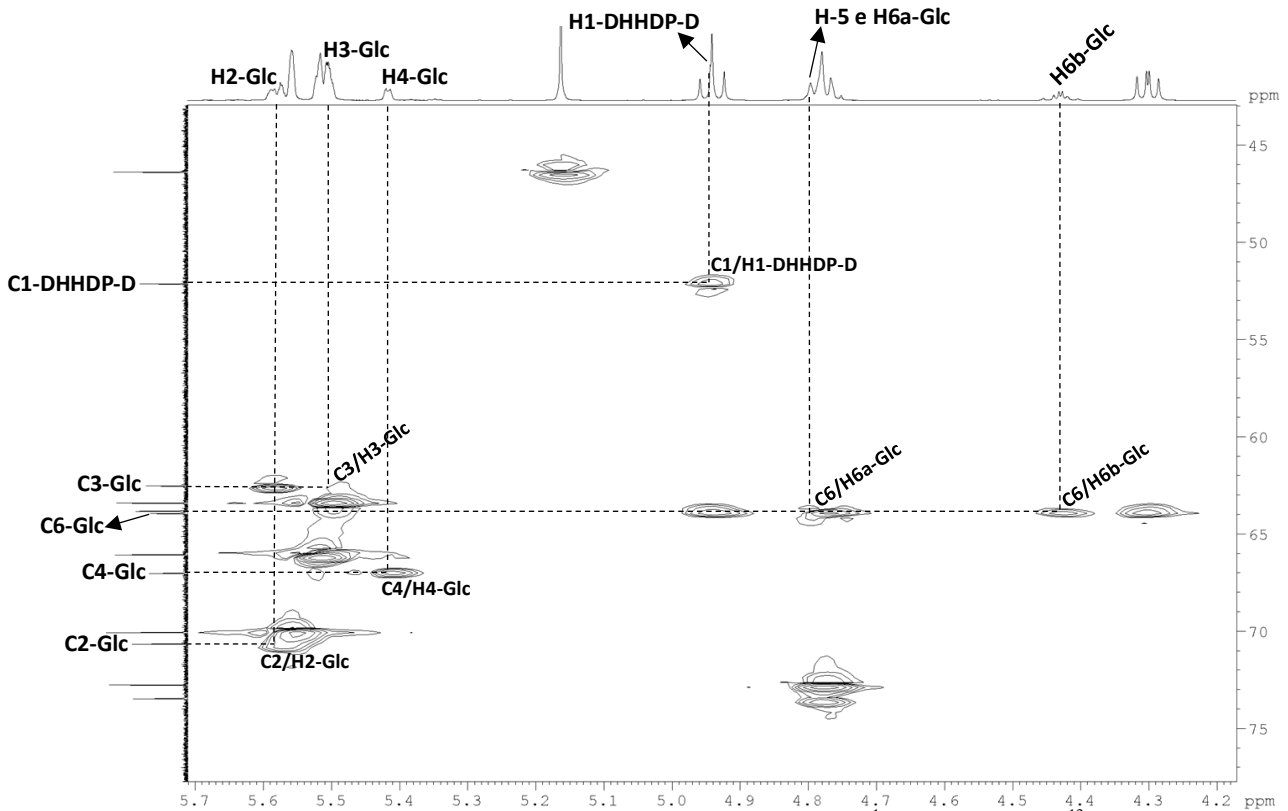


Figura 55 – Expansão do mapa de contornos HMQC (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T1A, evidenciando as correlações ^1H - ^{13}C da forma hemiacetálica B (δ_{C} de 40-80 ppm).

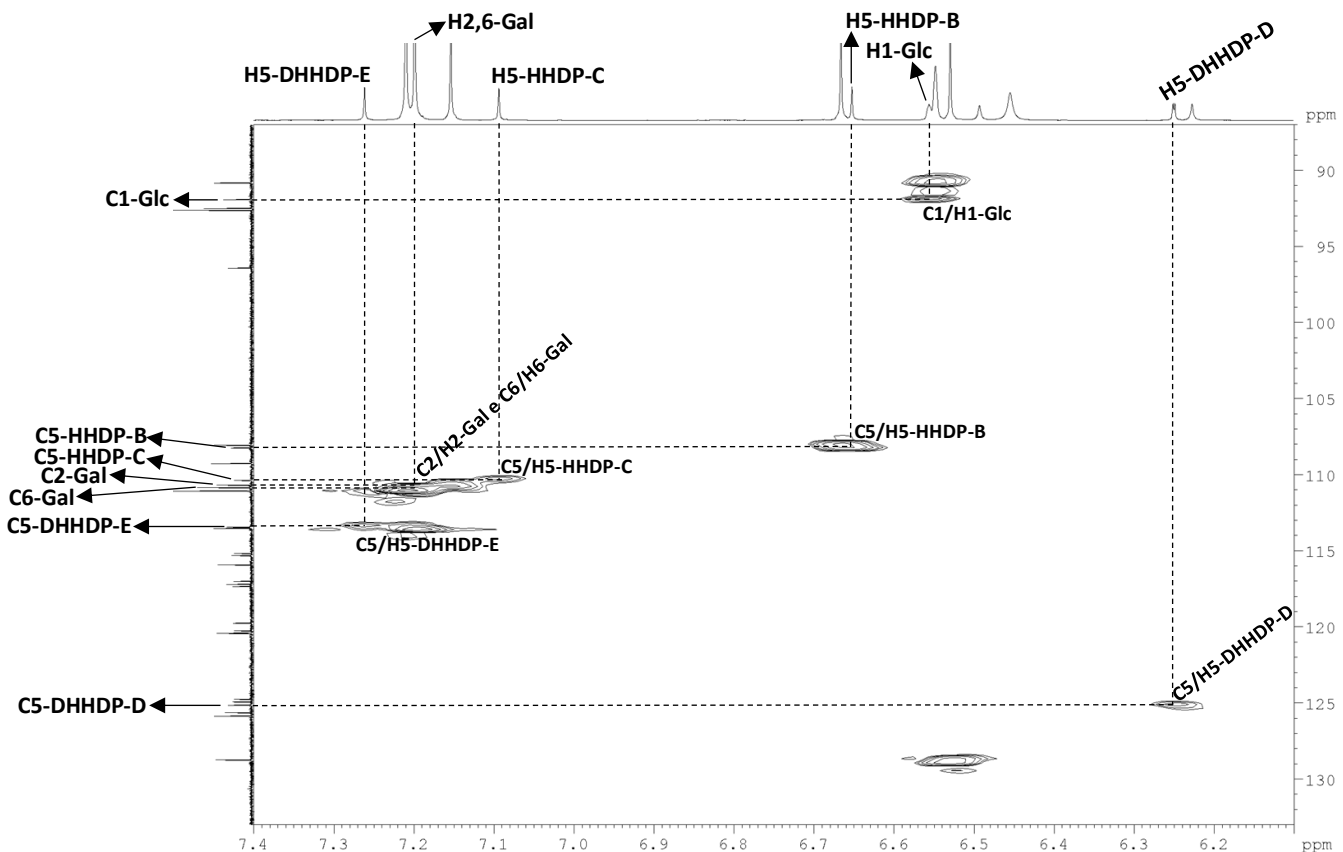


Figura 56 – Expansão do mapa de contornos HMQC (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T1A, evidenciando as correlações ^1H - ^{13}C da forma hemiacetálica B (δ_{C} de 85-140 ppm).

A análise do mapa de contornos HMBC (Figura 57) evidenciou correlações importantes que permitiram definir os sítios de ligação dos grupamentos galoíla, HHDP e DHHDP ao núcleo glicosídico da estrutura hemiacetálica A da geraniina. Foram observadas manchas de correlação do tipo $^3J_{CH}$ entre H1-Glc / C7 (C=O, Gal), H3-Glc / C7 (C=O, HHDP B) e H2-Glc / C7 (C=O, DHHDP E), indicando a ligação dos grupos galoíla, HHDP e DHHDP, respectivamente, aos carbonos C-1 (anomérico), C-3 e C-6 da unidade de glicose. Os dados espectrométricos obtidos estão em conformidade com aqueles anteriormente publicados, e possibilitam atribuir inequivocamente a estrutura molecular das formas hemiacetálicas hidratadas A e B da geraniina (Sudjaroen et al., 2012).

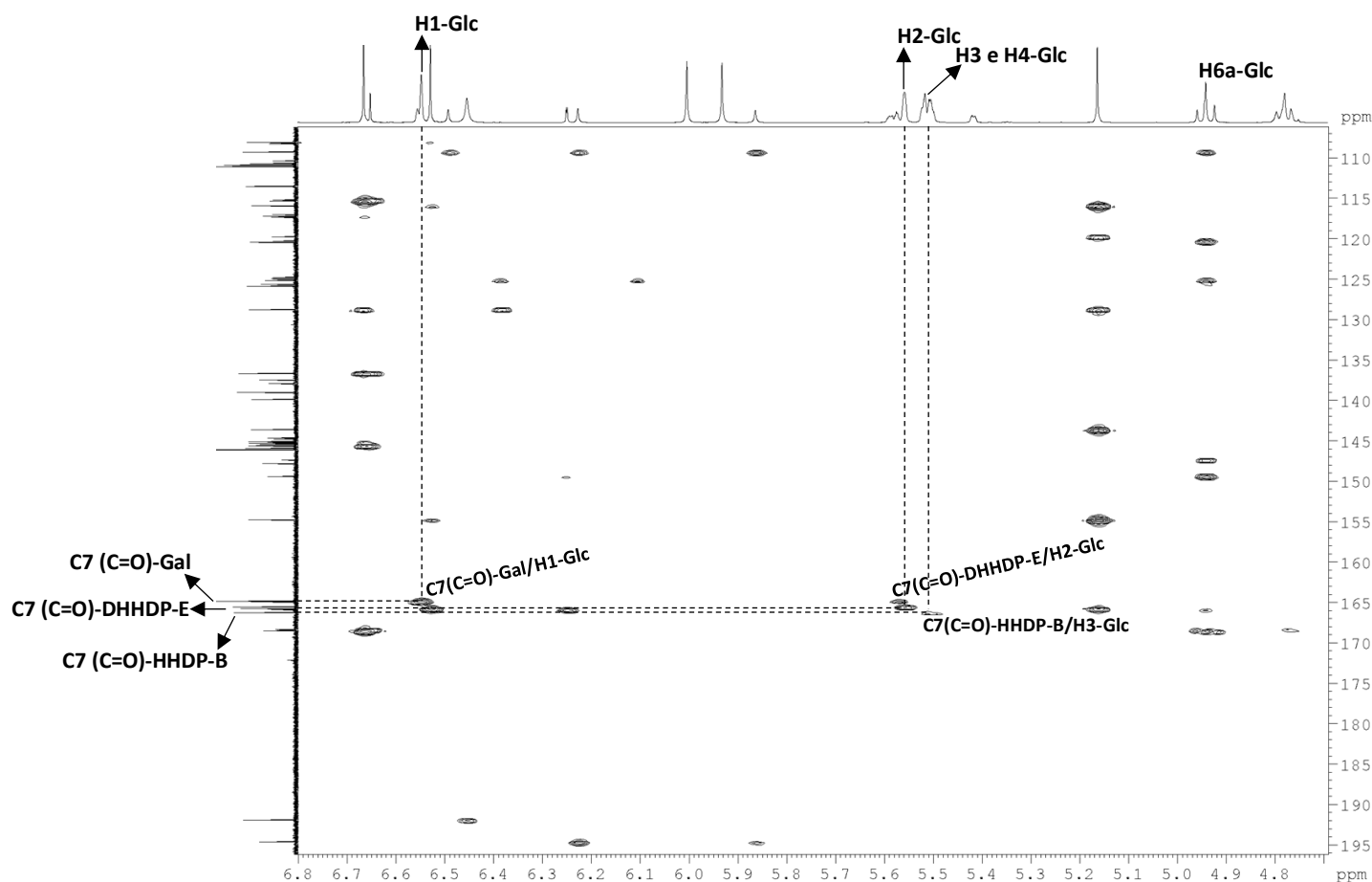


Figura 57 – Expansão do mapa de contornos HMBC (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3COCD_3) obtido para T1A evidenciando as correlações de longa distância ^1H - ^{13}C da forma hemiacetálica A (δ_{C} de 110-195 ppm).

Um acoplamento alílico ($J = 1,4$ Hz) pôde ser observado entre os prótons H-1 e H-5 no anel D da unidade DHHDP da forma B da geraniina (Tabela 11), evidenciado também pela mancha de correlação H1/H5-DHHDP-D no mapa de contornos COSY (Figura 52). Este

acoplamento está de acordo com a conformação do anel ciclohexênico adotada após mutarotação da forma A (anel de 6 membros) para a forma B (hemiacetal de 5 membros). Os ângulos de 90° formados entre as ligações C1/H1 e C5/H5 confirmam a estrutura hemiacetálica B da geraniina (Okuda et al., 1982). Com base nos dados experimentais aqui descritos para T1A e pela comparação com resultados publicados na literatura, a estrutura química de T1A foi inequivocamente atribuída à geraniina em suas formas hemiacetálicas hidratadas A e B.

Até o momento, não foi possível encontrar dados na literatura contemplando a elucidação estrutural inequívoca por RMN da geraniina isolada a partir das cascas do fruto de *Caryocar brasiliense*. Trata-se, portanto, de um trabalho inédito de obtenção e confirmação da estrutura de um elagitanino obtido a partir de um subproduto do fruto do pequi.

5.7 Ensaios *in vivo* para avaliação da atividade antidiabética

Com base nos resultados dos ensaios antihiperlipidêmicos *in vitro* (α -amilase e α -glicosidase) e no perfil fitoquímico obtido por CLUE-ESI-MS/MS, que revelou a presença de taninos hidrolisáveis (corilagina e geraniina) com comprovada ação antidiabética descrita em estudos previamente publicados, resolveu-se avaliar as amostras EECCB, a fração em EtOAc, e as frações cromatográficas 15C e 16C em modelos *in vivo* para investigar suas potenciais atividades no tratamento do DMT2. Dessa forma, procedeu-se à avaliação das amostras citadas no teste de tolerância ao amido *in vivo* (seção 5.7.1) e no ensaio *in vivo* em modelo experimental de DMT2 (seção 5.7.2).

5.7.1 Teste de tolerância ao amido *in vivo*

O teste de tolerância ao amido (TTA), inicialmente proposto em 1954 para o diagnóstico de doenças do pâncreas, baseia-se na premissa de que a amilase é a única enzima fisiológica responsável pela quebra significativa do amido em dissacarídeos, que são prontamente absorvidos pelo trato intestinal (Althausen & Uyeyama, 1954; Nugent & Millhon, 1958). Atualmente, o TTA com camundongos diabéticos ou normoglicêmicos é utilizado como teste pré-clínico para avaliar a potencial atividade antidiabética de extratos, frações e substâncias isoladas. Nesse sentido, pode-se citar o TTA utilizado para confirmar os efeitos hipoglicemiantes *in vivo* de um extrato de cascas de *Ceylon cinnamon* (canela-verdadeira) (Beejmohun et al., 2014), de uma fração flavonoídica hidrometanólica de folhas de amora (Meng et al., 2019), e do alcaloide trigonelina isolado de *Trigonella foenum-graecum*, popularmente conhecido como feno-grego (Hamden et al., 2013).

O extrato de cascas do fruto de *C. brasiliense* (EECCB), a fração em EtOAc e as frações cromatográficas 15C e 16C foram avaliadas no TTA *in vivo* (Figura 58 A e B). Os resultados obtidos demonstraram que EECCB e a fração em EtOAc não foram capazes de reduzir a glicose sanguínea em camundongos após a administração de amido, em comparação ao grupo controle (Figura 58 A). No entanto, o tratamento dos camundongos com a fração 16C (Figura 58 B) ou acarbose (Figura 58 A) reduziu significativamente os níveis da glicose sanguínea 30 e 60 min após a ingestão de amido, em comparação ao grupo controle. Uma hora após a administração do amido, a glicose sanguínea atingiu o pico em todos os grupos, e em seguida começou a cair. Duas horas após a administração do amido, a concentração de glicose no sangue retornou aos níveis iniciais. A medição dos níveis glicêmicos 60 min após a administração do amido indicou que os grupos tratados com a fração 16C e acarbose exibiram níveis de glicose sanguínea de 181 ± 10 mg/dL e 156 ± 11 mg/dL, respectivamente, em comparação com os camundongos do grupo controle (238 ± 11 mg/dL). Por outro lado, a fração 15C não reduziu de maneira significativa os níveis de glicose no sangue dos camundongos após o TTA (Figura 58 B).

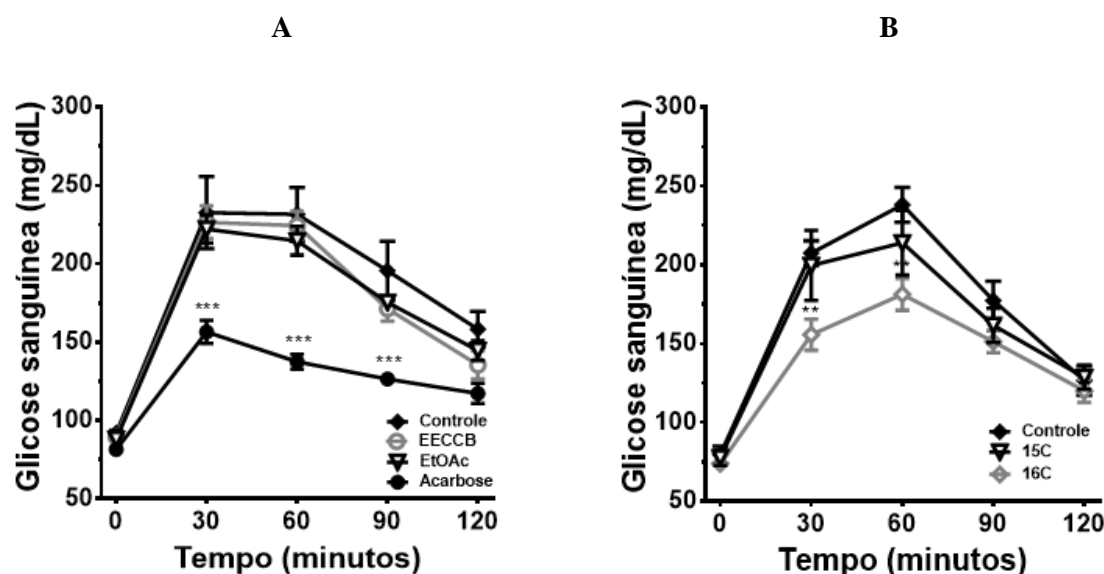


Figura 58 – Teste de tolerância ao amido com administração do extrato etanólico e frações de cascas do fruto de *C. brasiliense*. (A) Extrato etanólico (EECCB) e fração em acetato de etila (EtOAc). (B) Frações cromatográficas 15C e 16C obtidas a partir de EECCB. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 5$ animais por grupo). Diferenças significativas entre o controle e todos os grupos de tratamento usando análise de variância com dois fatores (*two-way ANOVA*), seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Dunnnett*; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ versus controle. Acarbose (10 mg/kg; controle positivo).

Até o presente momento, este é o primeiro relato sobre o potencial efeito antidiabético *in vivo* de uma fração cromatográfica obtida do extrato etanólico de cascas do fruto do pequi

(EECCB), aqui demonstrado pelos resultados obtidos no TTA com a fração 16C. Curiosamente, o efeito inibitório *in vitro* da fração 16C sobre a enzima digestiva α -glicosidase demonstrou uma boa correlação com os resultados do TTA *in vivo*. Além disso, nossos dados *in vivo* e *in vitro* indicam claramente um aumento na potência biológica da fração 16C em comparação ao EECCB, indicando que os taninos hidrolisáveis caracterizados nesta fração (seção 5.5) podem contribuir para o efeito biológico.

5.7.2 Ensaio *in vivo* em modelo experimental de DMT2

O modelo experimental “Baixa dose de estreptozotocina com suplementação de nicotinamida” (LD-STZ-NA) selecionado para estudo foi originalmente desenvolvido por Masiello et al. (1998) em ratos e posteriormente adaptado por Nakamura et al. (2006) para indução de DMT2 em camundongos (Joost et al., 2012). Neste modelo, o DMT2 é induzido por meio de um pré-tratamento com solução de frutose para desenvolvimento de RI seguido da administração de dois compostos — STZ e NA. STZ é um conhecido agente diabetogênico que exerce ação citotóxica nas células β pancreáticas dos camundongos, enquanto NA é administrada para proteger parcialmente essas células contra os danos excessivos causados por STZ. O modelo LD-STZ-NA vem sendo bastante utilizado pois, além de produzir uma patogênese semelhante ao DMT2 humano, possui baixo custo de execução e adequada estabilidade para estudos antidiabéticos de longo prazo (Szkudelski, 2012).

Durante o delineamento experimental do modelo LD-STZ-NA em camundongos, optou-se pela realização do estudo crônico cuja etapa de tratamento dos animais uma vez ao dia durante 30 dias demandou uma quantidade considerável de amostra. Devido ao baixo rendimento cromatográfico e consequente limitação da massa obtida de FR16C, a qual foi reservada para a etapa de isolamento dos taninos hidrolisáveis, foram selecionadas para estudo as amostras EECCB e fração EtOAC. O extrato em acetona/água 8:2 das cascas do pequi contendo corilagina e geraniina em concentrações superiores não foi utilizado neste estudo em modelo LD-STZ-NA por ter sido produzido posteriormente ao início deste experimento.

No presente ensaio *in vivo*, o DMT2 foi induzido por meio de pré-tratamento com solução de frutose a 10% e dieta com ração padrão; injeção intraperitoneal (i.p.) de STZ na dose de 100 mg/kg de peso corporal (p.c.); e uma dose protetora de nicotinamida (150 mg/kg p.c.) como um modelo experimental aceitável com resistência à insulina e desenvolvimento de disfunção parcial das células β -pancreáticas (seção 4.12.3.1). A glicemia foi medida após 12 h de jejum no dia 0 e depois semanalmente durante 30 dias. A Figura 59 apresenta os níveis de

glicose sanguínea em função do tempo para os grupos controle (animais saudios), controle da doença (diabéticos), grupo EECCB 100 (animais tratados com EECCB a 100 mg/kg p.c./dia, por 30 dias) e grupo EtOAc 100 (animais tratados com EtOAc a 100 mg/kg p.c./dia, por 30 dias). A administração de estreptozotocina elevou significativamente os níveis de glicose de jejum nos camundongos diabéticos (cerca de 3 vezes) em comparação com os camundongos saudios ($p < 0,001$). Além disso, para ambos os grupos de camundongos tratados com EECCB ou com a fração EtOAc foram observadas reduções significativas nos níveis de glicose de jejum após a segunda ($p < 0,033$ e $p < 0,001$, respectivamente), terceira ($p < 0,033$ e $p < 0,001$, respectivamente) e quarta semana ($p < 0,033$ e $p < 0,002$, respectivamente), em comparação com o grupo de animais diabéticos. No entanto, os efeitos hipoglicêmicos máximos foram detectados no grupo tratado com EtOAc na segunda, terceira e quarta semana, com reduções na glicemia sanguínea de $52,2 \pm 8,1\%$; $55,4 \pm 7,7\%$; e $40,9 \pm 8,6\%$, respectivamente.

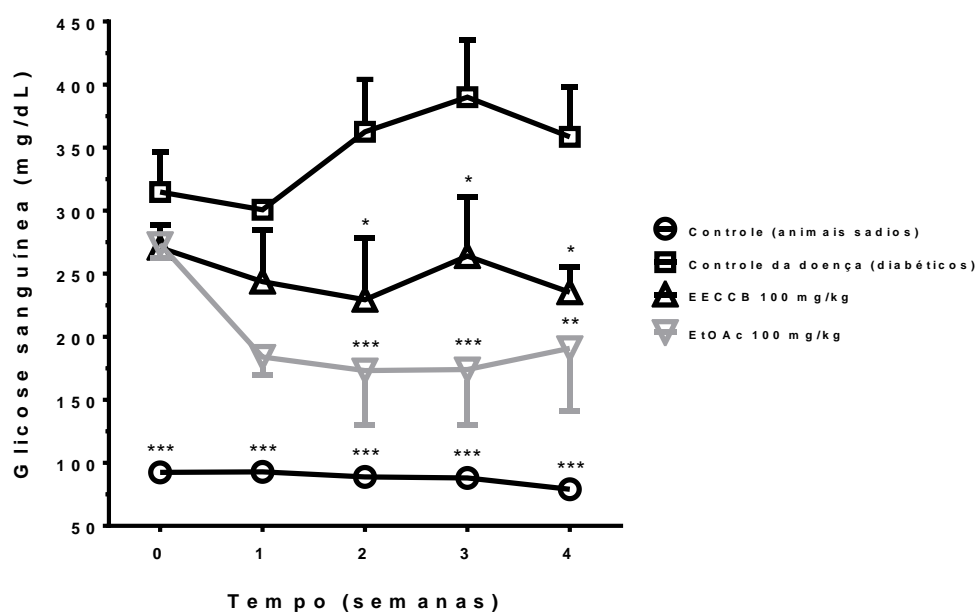


Figura 59 – Efeito do extrato etanólico de cascas do fruto de *C. brasiliense* (EECCB) e da fração em acetato de etila (EtOAc) sobre a glicemia de jejum em camundongos com DMT2. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 5$ animais por grupo). Diferenças significativas entre o grupo controle com animais diabéticos e todos os grupos de tratamento usando análise de variância com dois fatores (*two-way ANOVA*), seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Dunnett*; * $p < 0,033$ ** $p < 0,002$ e *** $p < 0,001$ versus controle com animais diabéticos.

Os efeitos de EECCB e da fração EtOAc sobre a hemoglobina glicada (HbA1c) também foram determinados e os resultados encontram-se na Tabela 12. Foi observado um aumento significativo ($p < 0,001$) no nível de HbA1c em camundongos controle diabéticos em

comparação com os não diabéticos. Dentre as amostras avaliadas, a fração EtOAc reduziu significativamente HbA1c ($p < 0,033$) quando comparada com o grupo controle diabético.

O DMT2 está geralmente associado à hiperglicemia, redução da tolerância à glicose e aumento dos níveis de HbA1c, cuja estimativa é de grande importância para se monitorar a eficácia do tratamento antidiabético (Goldstein, 1995). A redução observada nos níveis de HbA1c pode estar relacionada com as propriedades antioxidantes dos ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis presentes na fração em EtOAc, uma vez que esses agentes são capazes de inibir reações oxidativas associadas à glicação de proteínas (Elgawish et al., 1996).

Até onde se sabe, este é o primeiro estudo relatando o efeito antidiabético de EECCB e fração EtOAc, aqui evidenciado pelos resultados satisfatórios obtidos no ensaio em modelo experimental de DMT2. Os resultados supracitados foram corroborados por estudos em modelos experimentais de DMT2 descritos na literatura para outras espécies vegetais, nos quais foram avaliadas as propriedades antidiabéticas de dois extratos (*Ximenia americana* e *Citrus reticulata*) e uma fração enriquecida (*Hibiscus rosa-sinensis*) contendo majoritariamente compostos polifenólicos como os taninos, ácidos fenólicos, e flavonoides, ou seja, substâncias bioativas similares às identificadas previamente no extrato EECCB e fração EtOAc.

Nesse sentido, *Ximenia americana* var *caffra*, uma espécie arbórea africana, teve sua potencial atividade hipoglicemiante avaliada em ratos após indução do DMT2 por injeção i.p. de STZ a 60 mg/kg p.c. Os ratos hiperglicêmicos foram tratados por via oral com o extrato metanólico de raízes de *X. americana* (ERXA) na dose de 100 mg/kg p.c./dia por 10 dias. A glibenclamida (600 µg/kg p.c./dia) foi usada como fármaco de referência. Os ratos diabéticos tratados com ERXA exibiram uma redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis de glicose, assim como elevações consideráveis ($p < 0,01$) dos níveis insulínicos comparados ao grupo controle diabético. O efeito antidiabético se deve provavelmente aos compostos identificados nas raízes por LC-MS incluindo ácidos fenólicos (ácidos gálico, quínico e málico), taninos condensados (ésteres, dímeros e trímeros de catequinas) e flavan-3-ol (Sobeh et al., 2017). Em outro estudo, o efeito antihiperglicêmico do extrato etanólico de cascas do fruto de *Citrus reticulata* (EECR), conhecido como tangerina, foi avaliado em modelo de DMT2 induzido em ratos após injeções i.p. de STZ e NA nas doses de 50 e 120 mg/kg p.c., respectivamente. EECR (100 mg/kg p.c./dia), metformina (50 mg/kg p.c./dia) ou veículo foram administrados por gavagem oral aos três grupos de ratos diabéticos e grupo controle normal durante 28 dias. O tratamento com EECR reduziu significativamente ($p < 0,05$) o nível de frutossamina sérica e o índice HOMA-IR em comparação ao grupo controle diabético. A atividade antidiabética foi relacionada aos ácidos fenólicos e flavonoides identificados em EECR incluindo ácido gálico, hesperidina,

quercetina e tangeretina (Ali et al., 2020). O efeito antidiabético da fração em acetato de etila de pétalas de *Hibiscus rosa-sinensis* (AEHRS) foi avaliado em ratos com DMT2 induzido por injeção i.p. de STZ (40 mg/kg p.c.). Os ratos diabéticos foram tratados com AEHRS por via oral na dose de 25 mg/kg p.c./dia por 60 dias. A metformina (100 mg/kg p.c./dia) foi usada como droga de referência. Ao final do tratamento crônico, AEHRS e metformina reduziram significativamente ($p < 0,05$) os níveis de glicose sanguínea e HbA1c comparados ao grupo controle diabético. As atividades hipoglicemiantes foram atribuídas aos compostos fenólicos identificados por LC-MS como os ácidos clorogênico, caféico, siríngico, p-cumárico, ferúlico, elágico, cinâmico e o flavonoide miricetina (Pillai & Mini, 2016).

Apesar dos hipoglicemiantes sintéticos serem amplamente indicados devido à sua elevada eficácia no tratamento do DMT2 (Kazemian et al., 2015), alguns deles podem apresentar efeitos adversos indesejáveis, tornando-se necessário encontrar outras alternativas (Hashemnia et al., 2012; Kazemian et al., 2015). Além dos efeitos adversos, os agentes antidiabéticos atuais apresentam uma grande deficiência, pois são concebidos apenas para controlar ou amenizar os sintomas do DMT2 e não para tratar ou curá-lo definitivamente. Em contrapartida, um único extrato ou fração de uma espécie de planta com comprovada ação antidiabética pode conter diversos fitoquímicos, atuando em várias vias metabólicas e, essencialmente, exercendo efeitos múltiplos ou sinérgicos (Chang et al., 2013). Nesse sentido, EECCB e fração EtOAc, apresentam-se como promissoras alternativas para tratamento ou controle do DMT2, visto que além de apresentarem potencial efeito antidiabético comprovado por meio dos ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados no presente trabalho, foram identificados em sua composição fitoquímica vários ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis com propriedades antioxidantes e hipoglicemiantes já consagradas na literatura, e que poderiam atuar de maneira sinérgica ou até mesmo em múltiplos alvos bioquímicos.

Os efeitos de EECCB e da fração EtOAc sobre o perfil lipídico, marcadores hepáticos e ácido úrico foram determinados e os resultados encontram-se na Tabela 12.

Um aumento nos níveis de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e ácido úrico foi observado em camundongos controle diabéticos em comparação ao grupo controle não diabético. Essas alterações foram significativas ($p < 0,001$) para todos os parâmetros bioquímicos avaliados. Enquanto a administração de EECCB a camundongos diabéticos provocou diminuição significativa apenas dos níveis séricos de TGL ($p < 0,001$) e ALT ($p < 0,002$), o tratamento com a fração EtOAc reduziu significativamente os marcadores lipídicos CT ($p < 0,001$) e TGL ($p <$

0,001), as enzimas hepáticas AST ($p < 0,033$) e ALT ($p < 0,002$) e o ácido úrico ($p < 0,002$), quando comparados com o grupo controle diabético.

Tabela 12 – Efeitos do tratamento dos camundongos em modelo de DMT2 com EECCB e com a fração em EtOAc sobre HbA1c, perfil lipídico, marcadores hepáticos e ácido úrico

	HbA1c (mg/dL)	TGL (mg/dL)	CT (mg/dL)	AST (mg/dL)	ALT (mg/dL)	Acido úrico (mg/dL)
CN	5,8 ± 0,5	129,3 ± 13,0	101,7 ± 4,4	97,2 ± 5,0	61,2 ± 13,9	1,3 ± 0,1
CD	10,7 ± 1,4 ^{***}	188,0 ± 15,3 ^{***}	147,4 ± 18,3 ^{***}	176,8 ± 29,5 ^{***}	154,3 ± 26,1 ^{***}	3,5 ± 0,4 ^{***}
D-MF-200	8,9 ± 0,4 ^{***,†}	111,4 ± 11,9 ^{†††}	100,9 ± 14,6 ^{†††}	146,7 ± 17,8 ^{**}	122,2 ± 9,3 ^{***}	1,5 ± 0,2 ^{†††}
D-EECB-100	10,4 ± 0,9 ^{***}	130,4 ± 15,7 ^{†††}	124,2 ± 11,8	157,2 ± 19,1 ^{**}	102,8 ± 10,2 ^{**,††}	3,4 ± 0,4 ^{***}
D-EtOAc-100	8,9 ± 0,9 ^{***,†}	129,8 ± 17,4 ^{†††}	98,8 ± 17,0 ^{†††}	135,2 ± 23,5 [†]	110,2 ± 24,8 ^{**,††}	2,5 ± 0,5 ^{***,††}

HbA1c: hemoglobina glicada; TGL: triglicerídeos; CT: colesterol total; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; CN: Controle normal; CD: Controle diabético; D-MF-200: Diabético + Metformina a 200 mg/kg p.c./dia; D-EECCB-100: Diabético + EECCB a 100 mg/kg p.c./dia; D-EtOAc-100: Diabético + Fração em EtOAc a 100 mg/kg p.c./dia. Os valores foram expressos como a média ± EPM (n = 5). As diferenças significativas entre as médias foram determinadas por análise de variância simples (*One way ANOVA*) seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey*; **p* < 0,033 ***p* < 0,002 e ****p* < 0,001 versus CN; †*p* < 0,033 ††*p* < 0,002 e †††*p* < 0,001 versus CD.

A dislipidemia associada ao DMT2 constitui um importante fator de risco para doenças cardiovasculares (Kazemian et al., 2015). Os efeitos sobre os marcadores lipídicos obtidos após tratamento crônico dos camundongos com EECCB (redução no nível de TGL) e fração EtOAc (redução nos níveis de CT e TGL), indicaram suas potenciais atividades hipolipemiantes. Após pesquisa nas bases científicas foi encontrado um estudo em modelo experimental de dislipidemia induzida em ratos após injeção i.p. de tylopaol a 400 mg/kg p.c. Nesse ensaio os ratos tratados por gavagem oral com óleo do fruto de *Caryocar coriaceum* na dose de 1000 mg/kg p.c./dia durante 15 dias apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) nos níveis de colesterol total e triglicerídeos comparados ao grupo controle de ratos com dislipidemia (Figueiredo et al., 2016). Em outro estudo realizado com camundongos suplementados com diferentes fontes lipídicas, o tratamento por via oral dos animais com óleo do fruto de *Caryocar brasiliense* na dose de 1000 mg/kg p.c./dia reduziu significativamente ($p < 0,05$) a hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e o nível de colesterol LDL-c em comparação com o grupo controle suplementado com óleo de soja (1000 mg/kg p.c./dia) após 90 dias de tratamento (Silva et al., 2020). No entanto, não foram encontrados até o momento estudos sobre o perfil lipídico de animais tratados com extratos ou frações obtidos de cascas de frutos do gênero *Caryocar* em modelos experimentais de DMT2 ou dislipidemia. Trata-se, portanto, do primeiro relato das atividades hipolipemiantes de um extrato e sobretudo de uma fração em EtOAc obtida a partir das cascas do fruto de *C. brasiliense*.

Uma elevação consistente na atividade das enzimas AST e ALT pode ser interpretada como preditiva de DMT2 (Harris, 2005). Além disso a estreptozotocina empregada na indução do DMT2 pode causar lesões no fígado e elevar a concentração desses marcadores hepáticos. Os efeitos inibitórios sobre as enzimas hepáticas dos camundongos diabéticos tratados por 30 dias com o extrato EECCB, que reduziu o nível de ALT ($p < 0,002$) ou com a fração EtOAc que reduziu os níveis de ALT ($p < 0,002$) e AST ($p < 0,033$) indicam a natureza hepatoprotetora das substâncias presentes nessas amostras. Esses efeitos se devem possivelmente à presença dos ácidos fenólicos e taninos hidrolisáveis presentes em EECCB e EtOAc, os quais são conhecidos por terem propriedades antioxidantes e por atuarem na inibição de enzimas que ativam a liberação de mediadores inflamatórios (Gonzalez-Gallego et al., 2007), evitando assim o dano hepatocelular. Esses resultados foram corroborados por um estudo *in vivo* realizado com ratos suplementados com dieta hiperlipídica (DHL) composta por dieta padrão AIN-93M (Reeves et al., 1993) acrescida de 2% de colesterol puro e 25% de óleo de soja. Os ratos suplementados com dieta H + 2,4% de polpa de pequi (HPp) durante 8 semanas exibiram nível significativamente inferior na enzima ALT ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle

suplementado com DHL (Viana, 2015). De acordo com Naves et al. (2018) a análise da polpa do fruto de *Caryocar brasiliense* por HPLC-ESI-HRMS/MS revelou a presença dos ácidos gálico, protocatequínico, catequínico, epicatequínico, cumárico e principalmente ácido elágico. Dessa forma, confirmam-se as propriedades hepatoprotetoras do extrato e fração EtOAc os quais apresentam substâncias fenólicas similares como os ácidos gálico e elágico com comprovadas atividades antioxidantes. Não existem até o momento trabalhos publicados descrevendo os efeitos de EECCB e fração EtOAc sobre a redução das enzimas hepáticas. Este é o primeiro estudo indicando os potenciais efeitos hepatoprotetores das cascas do fruto de *Caryocar brasiliense*.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir dos ensaios *in vitro* de inibição das enzimas do trato gastrointestinal (α -amilase e α -glicosidase) e ensaios *in vivo*, a saber teste de tolerância amido e ensaio em modelo experimental de DMT2 relatados para EECCB e frações derivadas, indicam que as cascas do fruto de *C. brasiliense* contêm elagitaninos com atividade hipoglicêmica, potencialmente úteis para o desenvolvimento futuro de um produto fitoterápico ou nutracêutico com propriedades antidiabéticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA - American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.37, supl.1: S81–90, 2014a.

ADA - American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2014. **Diabetes Care**, v.37, supl. 1: S14–80, 2014b.

ADA - American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2019. **Diabetes Care**, v.42, supl. 1: S1–193, 2019.

ADA - American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2021. **Diabetes Care**, v.44, supl. 1: S1–232, 2021.

AGARWAL, G.; CARCACHE, P. J. B.; ADDO, E. M.; KINGHORN, A. D. Current status and contemporary approaches to the discovery of antitumor agents from higher plants. **Biotechnology Advances**, v.38, id.107337, 2020.

AIGHA, I. I.; ABDELALIM, E. M. NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic β cell development, identity, and proliferation. **Stem Cell Research & Therapy**, v.11, n.1, 2020.

AKBARI, M.; HASSAN-ZADEH, V. IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes. **Inflammopharmacology**, v.26, n.3, p.685-698, 2018.

ALONGI, M.; ANESE, M. Effect of coffee roasting on in vitro α -glucosidase activity: Inhibition and mechanism of action. **Food Research International**, v.111, p.480-487, 2018.

ALSAHLI, M.; GERICH, J. E. Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.133, p.1-9, 2017.

ALTHAUSEN, T. L.; UYEYAMA, K. New test of pancreatic function based on starch tolerance. **Annals of Internal Medicine**, v.41, p.563-575, 1954.

ALVES, D. R.; MORAIS, S. M.; PELLISSIER, F.; SAPLA, M. M. M.; VASCONCELOS, F. R.; SILVA, I. N. G.; SOUSA, H. A.; ASSOLINI, J. P.; COSTA, I.; PAVANELLI, W. R.; FREIRE, F. C. O. Flavonoid composition and biological activities of ethanol extracts of *Caryocar coriaceum* Wittm., a native plant from Caatinga Biome. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2017, ID6834218, p.1-7, 2017.

ARMSTRONG, C. ADA updates standards of medical care for patients with diabetes mellitus. **American Family Physician**, v.95, n.1, p.40-43, 2017.

ASCARI, J.; TAKAHASHI, J. A.; AMÉLIA, M.; BOAVENTURA, D. Phytochemical and biological investigations of *Caryocar brasiliense* Camb. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v.9(1), p.20-28, 2010.

ASCARI, J.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. The phytochemistry and biological aspects of Caryocaraceae family. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.2, p.293-308, 2013.

AWOTIDEBE, T. O.; ADEDOYIN, R. A.; AFOLABI, M. A.; OPIYO, R. Knowledge, attitude and practice of exercise for plasma blood glucose control among patients with type-2 diabetes. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v.10, n.2, p.S1-S6, 2016.

BALLAK, D. B.; STIENSTRA, R.; TACK, J. C.; DINARELLO, A. C.; DIEPEN, V. A. J. IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: Focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. **Cytokine**, v.75, p.280–290, 2015.

BANSAL, N. Pré-diabetes diagnosis and treatment: A review. **World Journal of Diabetes**, v.6, n.2, p.296-303, 2015.

BEEJMOHUN, V.; PEYTAVY-IZARD, M.; MIGNON, C.; MUSCENTE-PAQUE, D.; DEPLANQUE, X.; RIPOLL, C.; CHAPAL, N. Acute effect of Ceylon cinnamon extract on postprandial glycemia: alpha-amylase inhibition, starch tolerance test in rats, and randomized crossover clinical trial in healthy volunteers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, n.351, 2014.

BERARDINI, N.; REINHOLD, C.; SCHIEBER, A. Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.18, p.2208-2216, 2004.

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscidal activity against *Biomphalaria glabrata* of brazilian cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v.73, p.428-430, 2002.

BHATT, J. K.; THOMAS, S.; NANJAN, M. J. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. **Nutrition Research**, v.32, p.537-541, 2012.

BRAGA, F. C.; SERRA, C. P.; VIANA JÚNIOR, N. S.; OLIVEIRA, A. B.; CÔRTEZ, S. F.; LOMBARDI, J. A. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. **Fitoterapia**, v.78, n.5, p.353-358, 2007.

BRASNYÓ, P.; MOLNÁR, G. A.; MOHÁS, M.; MARKÓ, L.; LACZY, B.; CSEH, J.; MIKOLÁS, E.; SZIJÁRTÓ, I. A.; MÉREI, A.; HALMAI, R.; MÉSZÁROS, L. G.; SÜMEGI, B.; WITTMANN, I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. **British Journal of Nutrition**, v.106, p.383-389, 2011.

BREDA, C. A.; GASPERINI, A. M.; GARCIA, V. L.; MONTEIRO, K. M.; BATAGLION, G. A.; EBERLIN, M. N.; TEIXEIRA DUARTE, M. C. Phytochemical analysis and antifungal activity of extracts from leaves and fruit residues of brazilian savanna plantas aiming its use as safe fungicides. **Natural Products and Bioprospecting**, v.6, n.4, p.195-204, 2016.

BRUZZONE, S.; BODRATO, N.; USAI, C.; GUIDA, L.; MORESCHI, I.; NANO, R.; ANTONIOLI, B.; FRUSCIONE, F.; MAGNONE, M.; SCARFI, S.; DE FLORA, A.; ZOCCHI,

E. Abscisic acid is an endogenous stimulator of insulin release from human pancreatic islets with cyclic ADP ribose as second messenger. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.47, p.32188-32197, 2008.

BURGESS, T. A.; ROBICH, M. P.; CHU, L. M.; BIANCHI, C.; SELLKE, F. W. Improving glucose metabolism with resveratrol in a swine model of metabolic syndrome through alteration of signaling pathways in the liver and skeletal muscle. **Archives of Surgery**, v.146, n.5, p.556-564, 2011.

BURHANS, M. S.; HAGMAN, D. K.; KUZMA, J. N.; SCHMIDT, K. A.; KRATZ, M. Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus. **Comprehensive Physiology**, p.1-58, 2018.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, p.2141-2153, 2004.

CAHN, A.; CEFALU, W. T. Clinical considerations for use of initial combination therapy in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.39, n.2, p.S137-S145, 2016.

CALANNA, S.; CHRISTENSEN, M.; HOLST, J. J.; LAFERRÈRE, B.; GLUUD, L. L.; VILSBØLL, T.; KNOP, F. K. Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses of clinical studies. **Diabetologia**, v.56, n.5, p.965-972, 2013.

CALDEIRA, A. S. P.; MBIAKOP, U. C.; PÁDUA, R. M.; VAN DE VENTER, M.; MATSABISA, M. G.; CAMPANA, P. R. V.; CORTES, S. F.; BRAGA, F. C. Bioguided chemical characterization of pequi (*Caryocar brasiliense*) fruit peels towards an anti-diabetic activity. **Food Chemistry**, v.345, id.128734, p.1-10, 2021.

CAMPANA, P. R. V. Fitoquímica e atividade vasodilatadora in vitro de *Mansoa hirsuta* D. C. **Tese. Faculdade de Farmácia**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

CAMPLING, B. G.; PVM, J.; GALBRAITH, P. R.; COLE, S. P. C. Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells. **Leukemia Research**, v.12, n.10, p.823-831, 1988.

CARDULLO, N.; MUCCILLI, V.; PULVIRENTI, L.; CORNU, A.; POUYSÉGU, L.; DEFFIEUX, D.; QUIDEAU, S.; TRINGALI, C. C-glucosidic ellagitannins and galloylated glucoses as potential functional food ingredients with anti-diabetic properties: a study of α -glucosidase and α -amylase inhibition. **Food Chemistry**, v.313, id.126099, p.1-9, 2020.

CDC - **Centers for Disease Control and Prevention**. Pré-diabetes: your chance to prevent type 2 diabetes, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/diabetes/basics/prediabetes.html>

CEFALU, W. T. Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition. **ILAR Journal**, v.47, n.3, p.186-198, 2006.

CHAE, H-S.; KIM, Y-M.; LEE, E. J.; SONG, H. H.; OH, S-R.; CHOI, Y. H.; CHIN, Y-W. Corilagin with inhibitory activity against no production from *Euphorbia supina*. **Natural Product Sciences**, v.20, n.2, p.126-129, 2014.

CHAN, J. C. N.; ASCHNER, P.; OWENS, D. R.; PICARD, S.; VINCENT, M.; DAIN, M. P.; PILORGET, V.; LOIZEAU, V.; ECHTAY, A.; FONSECA, V. Triple combination of insulin glargine, sitagliptin and metformin in type 2 diabetes: the EASIE post-hoc analysis and extension trial. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v.29, n.1, p.134-141, 2015.

CHAO, P.; HSU, C.; YIN, M. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. **Nutrition & Metabolism**, v.6, n.33, 2009.

CHATTIRANAN, S.; NIYOMTHAI, S.; SABAIJAI, W. Phytochemical screening, total phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of *Leea rubra* blume. **The Science Journal of Phetchaburi Rajabhat University**, n.23, p.19-29, 2012.

CHEN, Y.; QIAO, Y.; XU, Y.; LING, W.; PAN, Y.; HUANG, Y.; GENG, L.; ZHAO, H.; ZHANG, X. Serum TNF- α concentrations in type 2 diabetes mellitus patients and diabetic nephropathy patients: A systematic review and meta-analysis. **Immunology Letters**, v.186, p.52-58, 2017.

CHIANG, J. L.; KIRKMAN, M. S.; LAFFEL, L. M. B.; PETERS, A. L. Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v.37, p.2034-2054, 2014.

CHIRAYATH, H. H. An overview of endothelial dysfunction in diabetes. **Vascular Diseases and Therapeutics**, v.1, n.1, p.1-3, 2016.

CHUKWUMA, C. I.; MOPURI, R.; NAGIAH, S.; CHUTURGOON, A. A.; ISLAM, M. S. Erythritol reduces small intestinal glucose absorption, increases muscle glucose uptake, improves glucose metabolic enzymes activities and increases expression of Glut-4 and IRS-1 in type 2 diabetic rats. **European Journal of Nutrition**, v.57, p.2431-2444, 2018.

CHUNG, A. P.; TON, S. H.; GURTU, S.; PALANISAMY, U. D. Ellagitannin geraniin supplementation ameliorates metabolic risks in high-fat diet-induced obese Sprague Dawley rats. **Journal of Functional Foods**, v.9, p.173-182, 2014.

CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; SANGALETI, C. T.; COSTA, F. O.; MORAIS, T. L.; LOPES, H. F.; MOTTA, J. M.; IRIGOYEN, M. C.; BORTOLOTO, L. A.; ROCHITTE, C. E.; HARRIS, Y. T.; SATAPATHY, S. K.; OLOFSSON, P. S.; AKERMAN, M.; CHAVAN, S. S.; MACKAY, M.; BARNABY, D. P.; LESSER, M. L.; ROTH, J.; TRACEY, K. J.; PAVLOV, V. A. Galantamine alleviates inflammation and insulin resistance in patients with metabolic syndrome in a randomized trial. **JCI Insight**, v.2, n.14, id.93340, 2017.

CORRER, C. J.; COURA-VITAL, W.; FRADE, J. C. Q. P.; NASCIMENTO, R. C. R. M.; NASCIMENTO, L. G.; PINHEIRO, E. B.; FERREIRA, W. M.; REIS, J. S.; MELO, K. F. S.; PONTAROLO, R.; LENZI, M. S. A.; ALMEIDA, J. V.; PEDROSA, H. C.; JOÃO, W. S. J. Prevalence of people at risk of developing type 2 diabetes mellitus and the involvement of community pharmacies in a national screening campaign: a pioneer action in Brazil. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.12, n.1, 2020.

COSTANZO, L. S. **Physiology: endocrine physiology**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, p. 395-460, 2018a.

COSTANZO, L. S. **Physiology: gastrointestinal physiology**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, p. 339-393, 2018b.

COSTANZO, L. S. **Physiology: renal physiology**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, p. 245-310, 2018c.

DAGLIA, M.; LORENZO, A. D.; NABAVI, S. F.; TALAS, Z. S.; NABAVI, S. M. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.15, p.362-372, 2014.

DAMIANI, C. Qualidade e perfil volátil de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) minimamente processado, armazenado sob diferentes temperaturas. **Universidade Federal de Lavras, Brasil**, 127p., 2006.

DE PAULA, J. R.; SALES, B. H. N.; SANTOS, S. C.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; LIÃO, L. M. Composição química dos óleos essenciais das folhas e frutos de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi), in 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **Poços de Caldas, MG, Brazil**, 2000.

DEFRONZO, R. A. Banting lecture: from the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**, v.58, n.4, p.773-795, 2009.

DIN, W. M.; CHUD, J.; CLARKE, G.; JINB, K. T.; BRADSHAW, T. D.; FRYC, J.; WIARTA, C. Antioxidant and cytoprotective effects of an ethanol extract of *Acalypha wilkesiana* var. *macafeana* from Malaysia. **Natural Product Communications**, v.8, n.3, 2013.

DJOUKENG, J. D.; MANSOUR, E. A.; TAPONDJOU, L. A.; LONSTI, D.; TABACCHI, R. Identification of ellagic acid derivatives from stem bark of *syzygium guineense* (Myrtaceae). **Natural Product Communications**, v.2, n.0, p.1-6, 2007.

DONG, Y.; CHEN, Y.-T.; YANG, Y.-X.; ZHOU, X.-J.; DAI, S.-J.; TONG, J.-F.; SHOU, D.; LI, C. Metabolomics study of type 2 diabetes mellitus and the antidiabetic effect of berberine in Zucker diabetic fatty rats using UPLC-ESI-HDMS. **Phytotherapy Research**, v.30, n.5, p.823-828, 2016.

ELGAWISH, A.; GLOMB, M.; FRIEDLANDER, M.; MONNIER, V. M. Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by high glucose in vitro and in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.22, p.12964-12971, 1996.

FECKA, I.; CISOWSKI, W. Tannins and flavonoids from the *Erodium cicutarium* Herb. **Zeitschrift für Naturforsch**, v.60b, p.555-560, 2005.

FLAMINI, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**, v.22, n.4, p.218-250, 2003.

FREEMAN, J. Hot topics in primary care: considerations in the selection of antihyperglycemic therapy for older patients with type 2 diabetes mellitus: a focus on newer therapies. **Journal of Family Practice**, v.64, n.12, p.S59-S66, 2015.

GEÓCZE, K. C.; BARBOSA, L. C. A.; FIDÊNCIO, P. H.; SILVÉRIO, F. O.; LIMA, C. F.; BARBOSA, M. C. A.; ISMAIL, F. M. D. Essential oils from pequi fruits from the brazilian cerrado ecosystem. **Food Research International**, v.54, p.1–8, 2013.

GOBOZA, M.; ABOUA, Y. G.; CHEGOU, N.; OGUNTIBEJU, O. O. Vindoline effectively ameliorated diabetes-induced hepatotoxicity by docking oxidative stress, inflammation and hypertriglyceridemia in type 2 diabetes-induced male Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.112, id.108638, 2019.

GOLDSTEIN, D. E. How much do you know about glycosylated hemoglobin testing ? **Clinical Diabetes**, v.13, p.60-63, 1995.

GONG, H.; HE, Z.; PENG, A.; ZHANG, X.; CHENG, B.; SUN, Y.; ZHENG, L.; HUANG, K. Effects of several quinones on insulin aggregation. **Scientific Reports**, v.4, id.5648, p.1-8, 2014.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. **Nutricion Hospitalaria**, v.22, n.3, p.287-293, 2007.

GRUNDY, S. M. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v.5, p.295–309, 2006.

GUAN, S.; ZHENG, Y.; YU, X.; LI, W.; HAN, B.; LU, J. Ellagic acid protects against LPS-induced acute lung injury through inhibition of nuclear factor kappa B, proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10. **Food and Agricultural Immunology**, v.28, n.6, p.1347-1361, 2017.

GUO, SHUANGLI, ET AL. Inactivation of specific beta cell transcription factors in type 2 diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v.123, n.8, 2013.

GUO, X.; WANG, Y.; WANG, K.; JI, B.; ZHOU, F. Stability of a type 2 diabetes rat model induced by high-fat diet feeding with low-dose streptozotocin injection. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v.19, n.7, p.559-569, 2018.

GUSMAN, G. S.; CAMPANA, P. R. V.; CASTRO, L. C.; CASTILHO, R. O.; TEIXEIRA, M. M.; BRAGA, F. C. Evaluation of the effects of some brazilian medicinal plants on the production of TNF- α and CCL2 by THP-1 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, id.497123, p.1-11, 2015.

HAMDEN, K.; BENGARA, A.; AMRI, Z.; ELFEKI, A. Experimental diabetes treated with trigonelline: effect on key enzymes related to diabetes and hypertension, β -cell and liver function. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.381, p.85-94, 2013.

HAMMAN, R. F.; WING, R. R.; EDELSTEIN, S. L.; LACHIN, J. M.; BRAY, G. A.; DELAHANTY, L.; HOSKIN, M.; KRISKA, A. M.; MAYER-DAVIS, E.; PI-SUNYER, X.;

REGENSTEINER, J.; VENDITTI, B.; WYLIE-ROSETT, J. Effect of weight loss with lifestyle intervention on risk of diabetes. **Diabetes Care**, v.29, n.9, p.2102-2107, 2006.

HANHINEVA, K.; ROGACHEV, I.; KOKKO, H.; ORON, S. M.; VENGER, I.; KARENLAMPI, S.; AHARONI, A. Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria x ananassa*) flowers. **Phytochemistry**, v.69, p.2463-2481, 2008.

HARRIS, E. H. Elevated liver function tests in type 2 diabetes. **Clinical Diabetes**, v.23, n.3, p.115-119, 2005.

HASHEMNIA, M.; ORYAN, A.; HAMIDI, A.-R.; MOHAMMADALIPOUR, A. Blood glucose levels and pathology of organs in alloxan-induced diabetic rats treated with hydro-ethanol extracts of *Allium sativum* and *Capparis spinosa*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.6, n.21, p.1559-1564, 2012.

HATANO, T.; YOSHIDA, T.; SHINGU, T.; OKUDA, T. ¹³C Nuclear magnetic resonance spectra of hydrolyzable tannins. III. Tannins having 1C4 glucose and C-glucosidic linkage. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.36, n.10, p.3849-3856, 1988.

HATTORI, K.; SUKENOBU, N.; SASAKI, T.; TAKASUGA, S.; HAYASHI, T.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; HAZEKI, O. Activation of insulin receptors by lagerstroemin. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.93, p.69-73, 2003.

HAYASHI, T.; MARUYAMA, H.; KASAI, R.; HATTORI, K.; TAKASUGA, S.; HAZEKI, O.; YAMASAKI, K.; TANAKA, T. Ellagitannins from *Lagerstroemia speciosa* as activators of glucose transport in fat cells. **Planta Medica**, v.68, n.2, p.173-175, 2002.

HE, H.; WANG, G.; GAO, Y.; LING, W.; YU, Z.; JIN, T. Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. **World Journal of Diabetes**, v.3, n.5, p.94-104, 2012.

HERMAN, W. H.; YE, W.; GRIFFIN, S. J.; SIMMONS, R. K.; DAVIES, M. J.; KHUNTI, K.; RUTTEN, G. E. H. M.; SANDBAEK, A.; LAURITZEN, T.; BORCH-JOHNSEN, K.; BROWN, M. B.; WAREHAM, N. J. Early detection and treatment of type 2 diabetes reduce cardiovascular morbidity and mortality: A simulation of the results of the anglo-danish-dutch study of intensive treatment in people with screen-detected diabetes in primary care (Addition-Europe). **Diabetes Care**, v.38, n.8, p.1449-1455, 2015.

HERNANDEZ, C.; ASCACIO-VALDÉS, J.; GARZA, H.; WONG-PAZ, J.; AGUILAR, C. N.; MARTÍNEZ-AVILA, G. C.; CASTRO-LÓPEZ, C.; AGUILERA-CARBÓ, A. Polyphenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of extract from *Nephelium lappaceum* L. (Mexican rambutan) husk. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 1-5, 2017.

HERZOG-SOARES, J. D.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI P. H. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliense* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.1-2, 2002.

HONMA, A.; KOYAMA, T.; YAZAWA, K. Anti-hyperglycemic effects of sugar maple *Acer saccharum* and its constituent acertannin. **Food Chemistry**, v.123, n.2, p.390-394, 2010.

HUANG, L.; HOU, L.; XUE, H.; WANG, C. Gallic acid inhibits inflammatory response of RAW264.7 macrophages by blocking the activation of TLR4/NF- κ B induced by LPS. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**, v.32, n.12, p.1610-1614, 2016.

IDF - **International Diabetes Federation**. IDF clinical practice recommendations for managing type 2 diabetes in primary care, 2017. Disponível em: www.idf.org/managing-type2-diabetes

IDF - **International Diabetes Federation**. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium: 2019a. Disponível em: <https://www.diabetesatlas.org/>

IDF - **International Diabetes Federation**. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Factsheets: South and Central America, 2019b. Disponível em: <https://www.diabetesatlas.org/en/resources/>

JANGHORBANI, M.; ADINEH, H.; AMINI, M. Evaluation of the finnish diabetes risk score (FINDRISC) as a screening tool for the metabolic syndrome. **The Review of Diabetic Studies**, v.10, n.4, p.283-292, 2013.

JIANG, Q.-W.; CHEN, M.-W.; CHENG, K.-J.; YU, P.-Z.; WEI, X.; SHI, Z. Therapeutic potential of steroidal alkaloids in cancer and other diseases. **Medicinal Research Reviews**, v.36, n.1, p.119-143, 2015.

JIN, F.; CHENG, D.; TAO, J.; ZHANG, S.; PANG, R.; GUO, Y.; YE, P.; DONG, J.; ZHAO, L. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of corilagin in a rat model of acute cholestasis. **Gastroenterology**, v.13, n.79, 2013.

KADCHUMSANG, S. **Chemical constituents and biological activity of *Leea rubra* Blume ex Spreng**. Unpublished master's thesis, Chiang Mai University, Bangkok, Thailand, 2008.

KANAT, M.; DEFRONZO, R. A.; ABDUL-GHANI, M. A. Treatment of pré-diabetes. **World Journal of Diabetes**, v.6, n.12, p.1207-1222, 2015.

KANG, E. S.; LEE, G. T.; KIM, B. S.; KIM, C. H.; SEO, G. H.; HAN, S. J.; HUR, K. Y.; AHN, C. W.; HA, H.; JUNG, M.; AHN, Y. S.; CHA, B. S.; LEE, H. C. Lithospermic acid B ameliorates the development of diabetic nephropathy in OLETF rats. **European Journal of Pharmacology**, v.579, n.1-3, p.418-425, 2008.

KAZEMIAN, M.; ABAD, M.; HAERI, M.; EBRAHIMI, M.; HEIDARI, R. Anti-diabetic effect of *Capparis spinosa* L. root extract in diabetic rats. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v.5, n.4, 2015.

KELLY, S. D.; NEARY, S. L. Ominous octet and other scary diabetes stories. **Physician Assistant Clinics**, v.5, n.2, p.121-133, 2020.

KHAN, R. M. M.; CHUA, Z. J. Y.; TAN, J. C.; YANG, Y.; LIAO, Z.; ZHAO, Y. From pre-diabetes to diabetes: diagnosis, treatments and translational research. **Medicina**, v.55, ID.546, p.1-30, 2019.

KHURSHEED, R.; SINGH, S. K.; WADHWA, S.; KAPOOR, B.; GULATI, M.; KUMAR, R.; RAMANUNNY, A. K.; AWASTHI, A.; DUA, K. Treatment strategies against diabetes: success so far and challenges ahead. **European Journal of Pharmacology**, v.862, id.172625, p.1-37, 2019.

KIM, S.; JIN, Y.; CHOI, Y.; PARK, T. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. **Biochemical Pharmacology**, v.81, n.11, p.1343-1351, 2011.

KNOWLER, W. C.; BARRETT-CONNOR, E.; FOWLER, S. E.; HAMMAN, R. F.; LACHIN, J. M.; WALKER, E. A.; NATHAN, D. M. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **New England Journal of Medicine**, v.346, n.6, p.393-403, 2002.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J. Nitric oxide radical scavenging active components from *Phyllanthus emblica* l. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.61, n.1, p.1-5, 2006.

KURIHARA, H.; KAWABATA, J.; HATANO, M. Geraniin, a hydrolyzable tannin from *Nymphaea tetragona georgi* (Nymphaeaceae). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.57, n.9, p.1570-1571, 1993.

LEE, I.-S.; JUNG, S.-H.; KIM, C.-S.; KIM, J. S. Phenolic compounds from the leaves of *Homonoia riparia* and their inhibitory effects on advanced glycation end product formation. **Natural Product Sciences**, v.23, n.4, p.274-280, 2017.

LI, X.; DENG, Y.; ZHENG, Z.; HUANG, W.; CHEN, L.; TONG, Q.; MING, Y. Corilagin, a promising medicinal herbal agent. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.99, p.43-50, 2018.

LILY, M.; GODWIN, M. Treating pré-diabetes with metformin: systematic review and meta-analysis. **Canadian Family Physician**, v.55, n.4, p.363-369, 2009.

LIN, Y.-J.; HU, G.; LI, K.-J.; ZHAO, Y.-F.; WEI, J.; ZHEN, Y.-Z. The protection of Rhein lysinate to liver in diabetic mice induced by high-fat diet and streptozotocin. **Archives of Pharmacal Research**, v.38, n.5, p.885-892, 2014.

LIU, H.; HU, C.; ZHANG, X.; JIA, W. Role of gut microbiota, bile acids and their cross-talk in the effects of bariatric surgery on obesity and type 2 diabetes. **Journal of Diabetes Investigation**, v.9, n.1, p.13-20, 2018.

LIU, X.; YAO, L.; SUN, D.; ZHU, X.; LIU, Q.; XU, T.; WANG, L. Effect of breviscapine injection on clinical parameters in diabetic nephropathy: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.12, n.3, p.1383-1397, 2016.

LOPES, T. C.; GONÇALVES, J. R. S.; SOUZA, N. S.; MORAES, D. F. C.; AMARAL, F. M. M.; ROSA, I. G. Avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v.18, n.3, p.23-30, 2011.

LORENZI, H.; SOUZA H. M. **Plantas ornamentais do Brasil (arbustivas, herbáceas e trepadeiras)**. São Paulo: Editora Plantarum; 2001.

LORENZO, J. M.; MUNEKATA, P. E.; PUTNIK, P.; KOVACEVIC, D. B.; MUCHENJE, V.; BARBA, F. J. **Studies in Natural Products Chemistry**: Chapter 6 – Sources, Chemistry, and Biological Potential of Ellagitannins and Ellagic Acid Derivatives. Amsterdam: Elsevier, 189-221, 2018.

LUDWICZUK, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GEORGIEV, M. I. **Pharmacognosy - Fundamentals, Applications and Strategies**: Chapter 11 - Terpenoids. Kingston: Academic Press, 233-266, 2017.

LUNDQVIST, M. H.; ALMBY, K.; ABRAHAMSSON, N.; ERIKSSON, J. W. Is the brain a key player in glucose regulation and development of type 2 diabetes? **Frontiers in Physiology**, v.10, ID457, p.1-23, 2019.

LUO, C.; YANG, H.; TANG, C.; YAO, G.; KONG, L.; HE, H.; ZHOU, Y. Kaempferol alleviates insulin resistance via hepatic IKK/NF- κ B signal in type 2 diabetic rats. **International Immunopharmacology**, v.28, n.1, p.744-750, 2015.

LY, C.; YOCKELL-LELIÈVRE, J.; FERRARO, Z. M.; ARNASON, J. T.; FERRIER, J.; GRUSLIN, A. The effects of dietary polyphenols on reproductive health and early development. **Human Reproduction Update**, v.21, n.2, p.228-248, 2014.

MAGID, A. A.; NAZABADIOKO, L. V.; HARAKAT, D.; MORETTI, C.; LAVAUD, C. Phenolic glycosides from the stem bark of *Caryocar villosum* and *C. glabrum*. **Journal of Natural Products**, v.71, p.914-917, 2008.

MAGNONE, M.; AMERI, P.; SALIS, A.; ANDRAGHETTI, G.; EMIONITE, L.; MURIALDO, G.; FLORA, A.; ZOCCHI, E. Microgram amounts of abscisic acid in fruit extracts improve glucose tolerance and reduce insulinemia in rats and in humans. **The FASEB Journal**, v.29, n.12, p.4783-4793, 2015.

MARSHALL, N. J.; GOODWIN, C. J.; HOLT, S. J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. **Growth Regulation**, v.5, n.2, p.69-84, 1995.

MELO JUNIOR, A. F.; CARVALHO, D.; POVOA, J. S. R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb). **Scientia Forestalis**, n.66, p.56-65, 2004.

MENG, Q.; QI, X.; FU, Y.; CHEN, Q.; CHENG, P.; YU, X.; SUN, X.; WU, J.; LI, W.; ZHANG, Q.; LI, Y.; BIAN, H. Flavonoids extracted from mulberry (*Morus alba* L.) leaf improve skeletal muscle mitochondrial function by activating AMPK in type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, id.112326, 2019.

MEYER, C.; WOERLE, H. J.; DOSTOU, J. M.; WELLE, S. L.; GERICH, J. E. Abnormal renal, hepatic, and muscle glucose metabolism following glucose ingestion in type 2 diabetes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v.287, n.6, p.E1049-E1056, 2004.

MOHAMED, E. A.; AHMAD, M.; ANG, L. F.; ASMAWI, M. Z.; YAM, M. F. Evaluation of α -glucosidase inhibitory effect of 50% ethanolic standardized extract of *Orthosiphon stamineus*

Benth. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, ID.754931, p.1-6, 2015.

MONNIER, L.; LAPINSKI, H.; COLETTE, C. Contributions of fasting and postprandial plasma glucose increments to the overall diurnal hyperglycemia of type 2 diabetic patients: variations with increasing levels of HbA1c. **Diabetes Care**, v.26, n.3, p.881-885, 2003.

MONTEIRO, S. S.; DA SILVA, R. R.; MARTINS, S. C. S.; BARIN, J. S.; DA ROSA, C. S. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of pequi peel (*Caryocar brasiliense* Camb.). **International Food Research Journal**, v.22(5), p.1985-1992, 2015.

MOURA, C. L.; ANDRADE, L. D. H. C. Etnobotânica em quintais urbanos nordestinos: um estudo no bairro da Muribeca, Jaboatão dos Guararapes-PE. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5(S1), p.219, 2007.

MUHAMMAD, M. A.; FALAK, S.; RASHID, N.; AHMED, N.; GARDNER, Q. A.; TARIQ, A.; AKHTAR, M. Complete signal peptide of Tk1884, an α -amylase from *Thermococcus kodakarensis*, is not necessary for extracellular secretion of the enzyme by *Escherichia coli*. **De Gruyter Open**, v.1, p.75-81, 2017.

NA, L.-X.; LI, Y.; PAN, H.-Z.; ZHOU, X.-L.; SUN, D.-J.; MENG, M.; LI, X.-X.; SUN, C.-H. Curcuminoids exert glucose-lowering effect in type 2 diabetes by decreasing serum free fatty acids: a double-blind, placebo-controlled trial. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.57, n.9, p.1569-1577, 2012.

NASAB, S. B.; HOMAELI, A.; KARAMI, L. Kinetic of α -amylase inhibition by *Gracilaria corticata* and *Sargassum angustifolium* extracts and zinc oxide nanoparticles. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.23, id.101478, 2020.

NAUCK, M. A.; MEIER, J. J. Incretin hormones: their role in health and disease. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.20, p.5-21, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v.83, p.770-803, 2020.

NITURE, N. T.; ANSARI, A. A.; NAIK, S. R. Anti-hyperglycemic activity of rutin in streptozotocin-induced diabetic rats: an effect mediated through cytokines, antioxidants and lipid biomarkers. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.52, p.720-727, 2014.

NUGENT, F. W.; MILLHON, W. A. Clinical evaluation of the starch tolerance test. **Journal of the American Medical Association**, v.168, n.17, p.2260-2262, 1958.

OKABE, S.; SUGANUMA, M.; IMAYOSHI, Y.; TANIGUCHI, S.; YOSHIDA, T.; FUJIKI, H. New TNF- α releasing inhibitors, geraniin and corilagin, in leaves of *Acer nikoense*, megusurino-ki. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.24, n.10, p.1145-1148, 2001.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Equilibrated stereostructures of hydrated geraniin and mallotusinic acid. **Tetrahedron Letters**, v.21, p.2561-2564, 1980.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Constituents of *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc. Part 12. Hydrated estereostreure and Equilibration of Geraniin. **J.C.S Perkin I**, p.9-14, 1982.

OLIVEIRA, F. F. B. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do óleo da polpa de pequi na artrite induzida por zymosan em ratos. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, Universidade do ceará**, 2013.

OLIVEIRA, L. M.; RODRIGUES, A. G.; SILVA, E. F.; CERQUEIRA, L. B.; CASTRO, C. H.; PEDRINO, G. R.; CARVALHO, M. H. C.; PONTAROLO, R.; COSTA, E. A.; CAMPOS, F. R.; FILGUEIRA, F. P.; GHEDINI, P. C. Endothelium-dependent vasorelaxant effect of butanolic fraction from *Caryocar brasiliense* Camb. leaves in rat thoracic aorta. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, ID.934142, p.1-9, 2012.

OLIVEIRA, M. M.; GILBERT, B; MORS, W. B. Triterpenes in *Caryocar Brasiliense*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.40, n.4, p.451-452, 1968.

PADHI, S.; NAYAK, A. K.; BEHERA, A. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.131, id.110708, 2020.

PALANISAMY, U. D.; LING, L. T.; MANAHARAN, T.; APPLETON, D. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. **Food Chemistry**, v.127, p.21-27, 2011.

PANEE, J. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. **Cytokine**, v.60, v.1, p.1-12, 2012.

PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Antifungal activity of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) against *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, p.623-627, 2002.

PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F. H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C; M. T.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.625-630, 2006.

PAVIA, D; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear: Espectros de carbono-13 e acoplamento heteronuclear com outros núcleos. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. Brasil: Cengage Universitário, p. 169-217, 2010.

PEREIRA, A.; ARRUDA, M.; DA SILVA, E.; DA SILVA, M.; LEMOS, V.; CORTES, S. Inhibition of α -glucosidase and hypoglycemic effect of stilbenes from the amazonian plant *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Ducke) A. M. G. Azevedo (Leguminosae). **Planta Medica**, v.78, n.1, p.36-38, 2012.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. **Physiological Reviews**, v.98, n.4, p.2133-2223, 2018.

PHAM, A. T.; DVERGSNES, C.; TOGOLA, A.; WANGENSTEEN, H.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.; MALTERUD, K. E. Terminalia macroptera, its current medicinal use and future perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.1486-1491, 2011.

PRASAD, K. N.; YANG, B.; ZHAO, M.; WEI, X.; JIANG, Y.; CHEN, F. High pressure extraction of corilagin from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. **Separation and Purification Technology**, v.70, p.41-45, 2009.

QI, X. M.; WU, G. Z.; WU, Y. G.; LIN, H.; SHEN, J. J.; LIN, S. Y. Renoprotective effect of breviscapine through suppression of renal macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats. **Experimental Nephrology**, v.104, p.147-157, 2006.

RANGSRIWONG, P.; RANGKADILOK, N.; SATAYAVIVAD, J.; GOTO, M.; SHOTIPRUK, A. Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. fruits. **Separation and Purification Technology**, v.66, p.51-56, 2009.

REDDY, S.; AMUTHA, A.; RAJALAKSHMI, R.; BHASKARAN, R.; MONICKARAJ, F.; RANGASAMY, S.; ANJANA, R. M.; ABHIJIT S.; GOKULAKRISHNAN, K.; DAS, A.; MOHAN, V.; BALASUBRAMANYAM, M. Association of increased levels of MCP-1 and cathepsin-D in young onset type 2 diabetes patients (T2DM-Y) with severity of diabetic retinopathy. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v.31, n.5, p.804-809, 2017.

RHEE, S. Y.; KIM, H. J.; KO, S. H.; HUR, K. Y.; KIM, N. H.; MOON, M. K.; PARK, S. O.; LEE, B.; CHOI, K. M.; KIM, J. H. Monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes & Metabolism Journal**, v.41, n.5, p.349-356, 2017.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. **Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences**, maio, 2013.

RIVERA, L.; MORÓN, R.; ZARZUELO, A.; GALISTEO, M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. **Biochemical Pharmacology**, v.77, n.6, p.1053-1063, 2009.

ROCHA, L. B.; MELO, A. M.; PAULA, S. L. A.; NOBRE, S. A. M.; ABREU, I. N. Gallic acid as the major antioxidant in pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit peel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.592-598, 2015.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.110, p.711-717, 2008.

SAENJUM, C.; KADCHUMSANG, S.; CHANSAKAOW, S.; SUTTAJIT, M.; CHAIVYSUT, C. Screening of Lanna medicinal plants with anti-inflammatory property assessed by free radical scavenging activities. **Isan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.3, p.65-73, 2007.

SAISHO, Y. Pancreas volume and fat deposition in diabetes and normal physiology: consideration of the interplay between endocrine and exocrine pancreas. **The Review of Diabetic Studies**, v.13, p.132-147, 2016.

SALMINEN, J. P.; OSSIPOV, V.; LOPONEN, J.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K.; LOPONEN, J.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.864, p. 283–291, 1999.

SBD - **Sociedade Brasileira de Diabetes**. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020. São Paulo: Clannad; 2019.

SCHEEN, A. J. Pharmacological management of type 2 diabetes: what's new in 2017? **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v.10, n.12, p.1383-1394, 2017.

SEINO, Y.; YABE, D.; TAKAMI, A.; NIEMOELLER, E.; TAKAGI, H. Long-term safety of once-daily lixisenatide in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: getgoal-mono-Japan. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v.29, n.8, p.1304-1309, 2015.

SFIKAKIS, P. P. The first decade of biologic TNF antagonists in clinical practice: lessons learned, unresolved issues and future directions. **Current Directions in Autoimmunity**, v.11, p.180-210, 2010.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.7, p.1793-1801, 2006.

SILVA, F. H. L.; FERNANDES, J. S. C.; ESTEVES, E. A.; TITON, M.; SANTANA, R. C. Populações, matrizes e idade da planta na expressão de variáveis físicas em frutos do pequi. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.3, p.806-813, 2012.

SILVA, V. C.; NAPOLITANO, A.; ELETTO, D.; RODRIGUES, C. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis-electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v.17, p.365-375, 2011.

SKYLER, J. S.; BAKRIS, G. L.; BONIFACIO, E.; DARSOW, T.; ECKEL, R. H.; GROOP, L.; GROOP, P.; HANDELSMAN, Y.; INSEL, R. A.; MATHIEU, C.; McELVAINE, A. T.; PALMER, J. P.; PUGLIESE, A.; SCHATZ, D. A.; SOSENKO, J. M.; WILDING, J. P. H.; RATNER, R. E. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. **Diabetes**, v.66, n.2, p.241-255, 2017.

ŚLIWIŃSKA-MOSSOŃ, M.; MILNEROWICZ, H. The impact of smoking on the development of diabetes and its complications. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v.14, n.4, p.265-276, 2017.

SOETIKNO, V.; SARI, F. R.; VEERAVEEDU, P. T.; THANDAVARAYAN, R. A.; HARIMA, M.; SUKUMARAN, V.; LAKSHMANAN, A. P.; SUZUKI, K.; KAWACHI, H.; WATANABE, K. Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF- κ B activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy. **Nutrition & Metabolism**, v.8, n.35, p.1-11, 2011.

SPARKMAN, O. D. Mass spectrometry desk reference, book & media reviews. **Journal of Chemical Education**, v.78, n.2, p.168, 2001.

SPRANGER, J.; KROKE, A.; MOHLIG, M.; HOFFMANN, K.; BERGMANN, M. M.; RISTOW, M.; BOEING, H.; PFEIFFER, A. F. H. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) - potsdam study. **Diabetes**, v.52, n.3, p.812-817, 2003.

SPRENGER, R. F.; THOMASI, S. S.; FERREIRA, A. G.; CASS, Q. B.; JUNIOR, J. M. B. Solution-state conformations of natural products from chiroptical spectroscopy: The case of isocorilagin. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.14, n.13, 2016.

SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. **Indian Journal Medical Research**, v.125, n.3, p.451-472, 2007.

SUDJAROEN, Y.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; WÜRTELE, G.; CHANGBUMRUNG, S.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W. Isolation and characterization of ellagitannins as the major polyphenolic components of Longan (*Dimocarpus longan* Lour) seeds. **Phytochemistry**, v.77, p.226-237, 2012.

SUGIMOTO, M. A.; DA SILVA, M. J. A.; BRITO, L. F.; BORGES, R. S.; AMARAL, F. A.; BOLETI, A. P. A.; ORDOÑEZ, M. E.; TAVARES, J. C.; SOUSA, L. P.; LIMA, E. S. Anti-inflammatory potential of 1-nitro-2-phenylethylene. **Molecules**, v.22, n.11, id.1977, 2017.

SURYANARAYANA, P.; SATYANARAYANA, A.; BALAKRISHNA, N.; KUMAR, P. U.; REDDY, G. B. P. Effect of turmeric and curcumin on oxidative stress and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. **Medical Science Monitor**, v.13, n.12, p.286-292, 2007.

TESTA, R.; BONFIGLI, A. R.; GENOVESE, S.; DE NIGRIS, V.; CERIELLO, A. The possible role of flavonoids in the prevention of diabetic complications. **Nutrients**, v.8, n.310, 2016.

THITILERTDECHA, N.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J. D.; RAKARIYATHAM, N. Identification of major phenolic compounds from *Nephelium lappaceum* L. and their antioxidant activities. **Molecules**, v.15, n.3, p.1453-1465, 2010.

TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G.; CAPIELLO. An overview of matrix effects in liquid chromatography – Mass Spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v.30, p.491-509, 2010.

TUNES, L. G. Investigação da atividade e mecanismos de ação leishmanicida e/ou tripanocida de produtos naturais e um derivado. **Dissertação de mestrado na concentração Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou-CPqRR, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2015.**

TURNER, R. C.; CULL, C. A.; FRIGHI, V.; HOLMAN, R. R. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies, (UKPDS 49). **JAMA**, v.281, n.21, 2005.

VAN BAAR, M. J. B.; VAN RUITEN, C. C.; MUSKIET, M. H. A.; VAN BLOEMENDAAL, L.; IJZERMAN, R. G.; VAN RAALTE, D. H. SGLT2 inhibitors in combination therapy: from

mechanisms to clinical considerations in type 2 diabetes management. **Diabetes Care**, v.41, n.8, p.1543-1556, 2018.

VARGAS, E.; JOY, N. V.; SEPULVEDA, M. A. C. Biochemistry, insulin metabolic effects. Last update: February 1, 2021. **StatPearls [Internet]**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525983/>. Acessado em: 08 de Março, 2021.

VOS, R. C.; VAN AVENDONK, M. J.; JANSEN, H.; GOUDSWAARD, A. N.; VAN DEN DONK, M.; GORTER, K.; KERSSSEN, A.; RUTTEN, G. E. Insulin monotherapy compared with the addition of oral glucose-lowering agents to insulin for people with type 2 diabetes already on insulin therapy and inadequate glycaemic control. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.9, id.CD006992, 2016.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 384 p. 1996.

WANG, X.; LU, Q.; YU, D.-S.; CHEN, Y.-P.; SHANG, J.; ZHANG, L.-Y.; SUN, H.-B.; LIU, J. Asiatic acid mitigates hyperglycemia and reduces islet fibrosis in Goto-Kakizaki rat, a spontaneous type 2 diabetic animal model. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.13, n.7, p.529-534, 2015.

WANG, Z. V.; SCHERER, P. E. Adiponectin, the past two decades. **Journal of Molecular Cell Biology**, v.8, n.2, p.93-100, 2016.

WHITE, M. G.; SHAW, J. A. M.; TAYLOR, R. Type 2 diabetes: the pathologic basis of reversible β -cell dysfunction. **Diabetes Care**, v.39, n.11, p.2080-2088, 2016.

WHO - **World Health Organization**. Diagnosis and management of type 2 diabetes (Hearts-D). Geneva, Switzerland: 2020. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331710>

WILSON, R. D.; ISLAM, M. S. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. **Pharmacological Reports**, v.64, p.129-139, 2012.

XU, L.; LI, Y.; DAI, Y.; PENG, J. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology and mechanisms. **Pharmacological Research**, v.130, p.451-465, 2018.

YAMADA, H.; WAKAMORI, S.; HIROKANE, T.; IKEUCHI, K.; MATSUMOTO, S. Structural revisions in natural ellagitannins. **Molecules**, v.23, n.8, id.1901, 2018.

YANAI, H.; ADACHI, H.; MASUI, Y.; KATSUYAMA, H.; KAWAGUCHI, A.; HAKOSHIMA, M.; WARAGAI, Y.; HARIGAE, T.; HAMASAKI, H.; SAKO, A. Exercise therapy for patients with type 2 diabetes: a narrative review. **Journal of Clinical Medicine Research**, v.10, n.5, p.365-369, 2018.

YANG, B.; KORTESNIEMI, M.; LIU, P.; KARONEN, M.; SALMINEN, J. P. Analysis of hydrolyzable tannins and other phenolic compounds in emblic leafflower (*Phyllanthus emblica* L.) fruits by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60(35), p.8672-8683, 2012.

YANG, S.; HSU, C.; CHOU, W.; FANG, J.; CHUANG, S. Bioactive agent discovery from the natural compounds for the treatment of type 2 diabetes rat model. **Molecules**, v.25, id.5713, p.1-18, 2020.

YISIMAYILI, Z.; GUO, X.; LIU, H.; XU, Z.; ABDULLA, R.; AISA, H. A.; HUANG, C. Metabolic profiling analysis of corilagin in vivo and in vitro using high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.165, p.251-260, 2019.

YKI-JARVINEN, H. Combination therapies with insulin in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.24, n.4, p.758-767, 2001.

YUASA, S.; MARUYAMA, T.; YAMAMOTO, Y.; HIROSE, H.; KAWAI, T.; MATSUNAGA-IRIE, S.; ITOH, H. MCP-1 gene A-2518G polymorphism and carotid artery atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.86, n.3, p.193-198, 2009.

ZHANG, J.; KANG, H.; WANG, L.; ZHAO, X. Chrysophanol ameliorates high-fat diet-induced obesity and inflammation in neonatal rats. **Pharmazie**, v.73, n.4, p.228-233, 2018.

ZHANG, Y. J.; TANAKA, T.; YANG, C. R.; KOUNO, I. New phenolic constituents from the fruit juice of *Phyllanthus emblica*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.49(5), p.537-540, 2001.

ZHANG, Y.; YANG, Z.; LIU, G.; WU, Y.; OUYANG, J. Inhibitory effect of chestnut (*Castanea mollissima* Blume) inner skin extract on the activity of α -amylase, α -glucosidase, dipeptidyl peptidase IV and in vitro digestibility of starches. **Food Chemistry**, id.126847, 2020.

ZHAO, L.; ZHANG, S.; TAO, J.; PANG, R.; JIN, F.; GUO, Y.; DONG, J.; YE, P.; ZHAO, H.; ZHENG, G. Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of corilagin (beta-1-O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose) in vitro. **International Immunopharmacology**, v.8, p.1059-1064, 2008.

ZHENG, X.; ZHU, S.; CHANG, S.; CAO, Y.; DONG, J.; LI, J.; LONG, R.; ZHOU, Y. Protective effects of chronic resveratrol treatment on vascular inflammatory injury in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats: role of NF-kappa B signaling. **European Journal of Pharmacology**, v.720, p.147-157, 2013.

ZHU, Y.; LIU, Q.; ZHOU, Z.; IKEDA, Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. **Stem Cell Research & Therapy**, v.8, n.1, 2017.