

DANIELA GRANJA ARAKAKI

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO
NA REGIÃO CENTRO-OESTE**

LINHA DE PESQUISA: NUTRIÇÃO E METABOLISMO

**PERFIL MINERAL, POTENCIAL TECNOLÓGICO E TERAPÊUTICO DA
CANJIQUEIRA (*Byrsonima cydoniifolia*) E AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS E COM AÇÃO REGENERATIVA**

Orientador: Prof. Dr. Valter Aragão do Nascimento

Campo Grande - MS

2020

DANIELA GRANJA ARAKAKI

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO
NA REGIÃO CENTRO-OESTE**

**LINHA DE PESQUISA: BIOMATERIAIS: ESTUDOS DA
BIOCOMPATIBILIDADE DE APLICAÇÃO**

**PERFIL MINERAL, POTENCIAL TECNOLÓGICO E TERAPÊUTICO DA
CANJIQUEIRA (*Byrsonima cydoniifolia*) E AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS
ANTIMICROBIANOS E COM AÇÃO REGENERATIVA**

Orientador: Prof. Dr. Valter Aragão do Nascimento

Em atendimento ao processo de defesa
no Programa de Pós-Graduação em
Saúde e Desenvolvimento na Região
Centro-Oeste (Doutorado) da UFMS
para obtenção do título de Doutor.

Campo Grande - MS

2020

RESUMO

Frutos e subprodutos de frutos são fontes valiosas de nutrientes e de compostos bioativos, os quais são associados com redução do risco de desenvolver diversas doenças, como câncer, inflamação, doenças cardiovasculares e doença de Alzheimer. Frutos da canjiqueira (*Byrsonima cydoniifolia*) já são explorados como fonte alimentar, enquanto as sementes são frequentemente descartadas. Este estudo teve como objetivo demonstrar o potencial do fruto integral da canjiqueira, bem como testar os efeitos na saúde da suplementação do extrato de canjiqueira *in vivo*, em relação ao impacto no controle de glicose, colesterol e peso. A caracterização de minerais foi realizada em ICP OES, enquanto a estabilidade térmica determinada por termogravimetria. O perfil de ácidos graxos foi verificado por cromatografia gasosa e a identificação de compostos bioativos utilizando cromatografia líquida e espectrometria de massas. A semente demonstrou ser mais rica em Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Se e Zn, enquanto a polpa é Concentrada em Na e K. O ácido oleico e o ácido linoleico são os principais ácidos graxos tanto na polpa, quanto na semente. A estabilidade térmica do óleo da semente é superior do que o óleo da polpa, enquanto a concentração de piceatanol é superior na semente do que na polpa. Todas as partes da canjiqueira podem ser utilizadas como estratégias para minimizar problemas decorrentes da desnutrição e são ingredientes valiosos para possíveis produtos alimentares. No entanto, a suplementação com o extrato de canjiqueira não demonstrou melhorias na saúde dos animais tratados em relação aos parâmetros de glicose, colesterol e peso.

ABSTRACT

Fruits and by-products are valuable sources of nutrients and bioactive compounds, which are associated with reduced risk to develop several diseases, such as cancer, inflammation, cardiovascular diseases, and Alzheimer's. Fruits of canjiqueira (*Byrsonima cydoniifolia*) are already exploited as a food resource, while seeds are often discarded. This study aimed at showing the potential of the whole fruit of canjiqueira, as well as testing the supplementation of canjiqueira fruit extract *in vivo* regarding health effects such as glucose control, cholesterol and weight. Elemental characterization was performed on ICP OES, while thermal stability was assessed on thermogravimetry. The determination of the fatty acid profile was carried out on gas chromatography and bioactive compound identification using liquid chromatography and mass spectrometry. Results show that the seed is richer in Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Se and Zn.; while the pulp is more concentrated in Na and K. Oleic acid and linoleic acid are the main compounds in pulp and seed. The thermal stability of seed oil is superior to pulp oil, while piceatannol concentration is higher in seed than pulp. All parts of canjiqueira fruit may be used as a strategy to address nutrition issues and are valuable ingredients to prospective food products. However, the supplementation with canjiqueira extract showed no health improvement effects regarding glucose and cholesterol levels and weight on the animals treated with the extract.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de operação para digestão em sistema de micro-ondas	38
Tabela 2. Condições de operação do ICP-OES	39
Tabela 3. Parâmetros de calibração obtidos pela calibração externa, coeficiente de correlação (R ²), Limite de Detecção e Limite de Quantificação na utilização de ICP-OES	40
Tabela 4. Testes de adição e recuperação para verificar precisão de todos os analitos obtidos no ICP-OES (n=3)	41
Tabela 5. Formulação das dietas ofertadas aos animais em estudo experimental	47
Tabela 6. Composição centesimal da polpa da canjiqueira (g/100 g)	52
Tabela 7. Composição mineral da polpa e semente de frutos de canjiqueira (<i>B. cydoniifolia</i>) (mg/100 g) em relação às recomendações DRI	53
Tabela 8. Distribuição de ácidos graxos em polpa e semente de <i>B. cydoniifolia</i>	57
Tabela 9. Pesos iniciais e finais, ganho de peso, comprimento e Índice de Lee em camundongos da linhagem <i>Swiss</i>	65
Tabela 10. Peso de órgãos e sítios de gordura (g) em camundongos da linhagem <i>Swiss</i>	67
Tabela 11. Resultados de glicemia, colesterol total, colesterol HDL, colesterol não HDL (mg/dL) em camundongos da linhagem <i>Swiss</i>	68
Tabela 12. Lâminas histológicas de fígado de camundongos em diferentes tipos de dieta	74
Tabela 13. Modificações na sequência de aminoácidos nos peptídeos análogos da Citropina 1.1.	112
Tabela 14. Atividade antimicrobiana dos peptídeos análogos da Citropina 1.1 em cepas de <i>S. aureus</i> MRSA	112
Tabela 15. Modificações na sequência de aminoácidos nos peptídeos análogos da Citropina 1.1.	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese de estilbenos	31
Figura 2. Fruto da canjiqueira	34
Figura 3. Fluxograma de preparo de amostra para análises	37
Figura 4. Estabilidade térmica dos óleos da polpa e da semente da canjiqueira analisados por termogravimetria	60
Figura 5. Degradação térmica do óleo da polpa de canjiqueira avaliada por termogravimetria	61
Figura 6. Degradação térmica do óleo da semente de canjiqueira avaliada por termogravimetria	61
Figura 7. Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico do fruto integral de canjiqueira	63
Figura 8. Quantificação de <i>trans</i> -piceatanol no extrato hidroetanólico (70:30) da polpa e semente da canjiqueira	64
Figura 9. Resultados de valores de glicemia (mg/dL) em resposta ao teste de tolerância à glicose	69
Figura 10. Área sob a curva para valores de glicemia em resposta ao teste de tolerância à glicose	70
Figura 11. Resultados de valores de glicemia (mg/dL) em resposta ao desafio de insulina	71
Figura 12. Área sob a curva para valores de glicemia em resposta ao desafio de insulina	68
Figura 13. Lâminas histológicas do fígado dos animais	73
Figura 14. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos em relação à sua interação com a membrana bacteriana	99
Figura 15. Estrutura molecular da Citropina 1.1	102
Figura 16. Representação de zonas de tecido queimado	106
Figura 17. Estrutura molecular do peptídeo P12	106
Figura 18. Teste de citotoxicidade do peptídeo P12 e análogos em células HaCaT por 24 h	116

Figura 19. Teste de citotoxicidade do Peptídeo 6 em concentrações entre 8 - 512 µg/ml após 96 h em células HaCaT	116
Figura 20. Atividade proliferativa do peptídeo P12 e análogos em células FN -/- por 24 h, nas concentrações entre 0,125 µM e 0,500 µM, com ou sem adição de PDGF	117
Figura 21. Atividade proliferativa do peptídeo 1 (P12) em células FN -/- por 96 h	118
Figura 22. Teste de stress induzido por H ₂ O ₂ e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o peptídeo P12	119
Figura 23. Atividade proliferativa do peptídeo 2 em células FN -/- por 96 h	120
Figura 24. Teste de stress induzido por H ₂ O ₂ e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o Peptídeo 2	120
Figura 25. Atividade proliferativa do peptídeo 3 em células FN -/- por 96 h	121
Figura 26. Teste de stress induzido por H ₂ O ₂ e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o Peptídeo 3	122
Figura 27. Atividade proliferativa do peptídeo 4 em células FN -/- por 96 h	123
Figura 28. Teste de stress induzido por H ₂ O ₂ e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o Peptídeo 4	123
Figura 29. Atividade proliferativa do peptídeo 5 em células FN -/- por 96 h	124
Figura 30. Teste de stress induzido por H ₂ O ₂ e de stress e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o Peptídeo 5	125
Figura 31. Atividade proliferativa do peptídeo 6 em células FN -/- por 96 h	125
Figura 32. Teste de stress induzido por H ₂ O ₂ e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o Peptídeo 6	126
Figura 33. Atividade proliferativa do peptídeo 7 em células FN -/- por 96 h	127
Figura 34. Teste de stress induzido por H ₂ O ₂ e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o Peptídeo 7	127

LISTA DE ABREVIACÕES

4CL - Cumaril-CoA Ligase

AA – Ácido Araquidônico

AG – Ácidos Graxos

AGMI – Ácidos Graxos Monoinsaturados

AGPI - Ácidos Graxos Poli-insaturados

AGS – Ácidos Graxos Saturados

AHDF - *Adult Human Dermal Fibroblast*

AI – *Adequate Intake*

AL – Ácido Linoleico

Al - Alumínio

AMP – Peptídeos antimicrobianos

AUC – Área Sob a Curva

BHA – Butyl-4-hydroxyanisole

BHT – Hidroxitolueno Butilado

C4H - Cinamato-4-Hidroxilase

Ca - Cálcio

CAT – Catalase

CETP – Proteínas Transferidoras de Éster de Colesterol

CEUA – Comitê em Ética em Uso de Animais

CG – Cromatografia Gasosa

CHI - Chalcona Isomerase

Co - Cobalto

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

Cu - Cobre

DAD – Detector de Matriz de Diodos

DCM – Diclorometano

DCNT - Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DM2 – Diabetes Mellitus Tipo 2

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMF – Dimetilformamida
DMSO – Sulfóxido de Dimetila
DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DRI – *Dietary Reference Intakes*
EAG – Equivalentes de Ácido Gálico
EAT - Equivalentes de Ácido Tânico
EC₅₀ – *Efficiency Concentration*
ECM – Matriz Extracelular
FACFAN-UFMS - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e
Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
FAME - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
FAMED – Faculdade de Medicina
FBS - Soro Fetal Bovino
FDA – *Food and Drug Administration*
Fe - Ferro
FN – Fibronectina
GSH – Glutathione
HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL – Lipoproteína de Alta Densidade
HE – Hematoxilina/Eosina
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance
ICP OES - Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado
Indutivamente
IES – Ionização por Eletrospray
IL – Interleucina
IMC – Índice de Massa Corporal
IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*
K - Potássio
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade
LOD – Limite de Detecção
LOQ – Limite de Quantificação
LPL – Lipoproteína Lipase
LTA – Ácido Lipoteicoico

MALDI - Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser

Assistida por Matriz

MBC – Concentração Bactericida Mínima

Mg - Magnésio

MHB – Caldo Mueller Hinton

MIC – Concentração Inibitória Mínima

Mn - Manganês

Mo - Molibdênio

Na - Sódio

NAFLD - Infiltração de Gordura Não Alcoólica no Fígado

NHANES - Examinação Nacional de Saúde e Nutrição

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAL - Fenilalanina Amônia Liase

PDGF-BB – *Platelet Derived Growth Factor-BB*

RDA - *Recommended Dietary Allowance*

RI – Resistência Insulínica

ROMT - Resveratrol-*O*-Metiltransferase

Se - Selênio

SMH - Modelo Shai-Matsuzaki-Huang

SOD – Superóxido Dismutase

STS – Estilbeno Sintase

TBHQ - *Terc*-Butil-Hidroquinona

TFA – Ácido Trifluoroacético

TG – Termogravimetria

TGF- β – Fator de Transformação Beta

THP-1 – Células *Human Monocytic Leukaemia*

TLR – *Toll Like Receptor*

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

UFLC – Cromatografia Líquida Ultra Rápida

UL - *Tolerable Upper Intake Level*

UV – Ultravioleta

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Vigitel – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças por
Inquérito Telefônico

VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

Zn – Zinco

SUMÁRIO

CAPÍTULO UM – PERFIL MINERAL, POTENCIAL TECNOLÓGICO E TERAPÊUTICO DA CANJIQUEIRA (*Byrsonima cydoniifolia*)

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Obesidade e disfunções metabólicas	17
2.2. Macro e microelementos no excesso de peso e <i>status</i> de saúde	19
2.2.1 Alumínio	20
2.2.2 Cálcio	20
2.2.3 Cobalto	21
2.2.4 Cobre	21
2.2.5 Zinco	22
2.2.6 Ferro	22
2.2.7 Potássio	23
2.2.8 Magnésio	23
2.2.9 Manganês	23
2.2.10 Sódio	24
2.2.11 Selênio	24
2.3 Estabilidade térmica em óleos de origem vegetal	25
2.4 Antioxidantes	27
2.5 Compostos Bioativos	28
2.5.1 Compostos fenólicos	29
2.5.2 Taninos	30
2.5.3 Estilbenos	31
2.6 Bioma Cerrado	32
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivos específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Obtenção da matéria prima	36
4.2. Composição química dos frutos	37
4.2.1. Composição centesimal	37
4.2.2. Detecção de minerais	37
4.2.2.1. <u>Preparo do material para leitura das amostras</u>	37

4.2.2.2.	<u>Digestão por micro-ondas</u>	38
4.2.2.3.	<u>Análise elementar pela técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES)</u>	38
4.2.2.4.	<u>Curvas de calibração</u>	39
4.2.2.5.	<u>Critérios de julgamento</u>	41
4.3	Extração do óleo da polpa e da semente de canjiqueira	41
4.3.1.	<i>Determinação de lipídeos nos óleos da polpa e da semente de canjiqueira</i>	41
4.3.2.	<i>Determinação da estabilidade térmica de óleos da polpa e da semente de canjiqueira</i>	42
4.4	Preparação do extrato para quantificação de piceatanol em polpa e semente de canjiqueira	42
4.4.1.	<i>Identificação de piceatanol em extrato de polpa e semente de canjiqueira</i>	43
4.5	Preparação do extrato do fruto integral, utilizados nos testes animais, atividade antioxidante, fenóis e taninos	43
4.5.1.	<i>Identificação de piceatanol em extrato do fruto integral de canjiqueira</i>	44
4.5.2.	<i>Atividade antioxidante – método DPPH</i>	44
4.5.3.	<i>Quantificação de compostos fenólicos</i>	44
4.5.4.	<i>Quantificação de taninos</i>	45
4.6	Ensaio experimental	45
4.6.1.	<i>Teste de toxicidade aguda</i>	45
4.6.2.	<i>Ensaio biológico</i>	46
4.6.3.	<i>Parâmetros morfométricos</i>	48
4.6.4.	<i>Consumo alimentar</i>	48
4.6.5.	<i>Teste de tolerância à glicose</i>	48
4.6.6.	<i>Teste de desafio com insulina</i>	48
4.6.7.	<i>Eutanásia e coleta de sangue</i>	49
4.6.8.	<i>Coleta de órgãos</i>	49
4.6.9.	<i>Determinação de Colesterol Total</i>	49
4.6.10.	<i>Determinação de colesterol-HDL</i>	49
4.6.11.	<i>Determinação de colesterol-LDL e colesterol-VLDL</i>	50

4.6.12. <i>Determinação de Triglicerídeos</i>	50
4.6.13. <i>Determinação de Glicose (POD-GOD)</i>	50
4.10. Análise histológica	50
4.11. Análise estatística	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. Composição química	52
5.2. Análise de estabilidade térmica dos óleos da polpa e da semente de canjiqueira	59
5.3. Atividade antioxidante	62
5.3.1. <i>Análises DPPH, fenóis totais e taninos</i>	62
5.3.2. <i>Identificação de trans-piceatanol na polpa e na semente de canjiqueira</i>	64
5.3.3. <i>Quantificação de trans-piceatanol no extrato do fruto integral de canjiqueira</i>	65
5.4. Estudo experimental	65
5.4.1. <i>Análise histológica</i>	
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS	76

CAPÍTULO DOIS - AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E COM AÇÃO REGENERATIVA

PRÓLOGO	93
RESUMO	94
ABSTRACT	95
1. INTRODUÇÃO	96
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	97
2.1. Peptídeos antimicrobianos	97
2.1.1. <i>Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos</i>	98
2.1.2. <i>Potencial para desenvolvimento de resistência aos AMP</i>	100
2.1.3. <i>Desafios e limitações associados ao uso de AMP na prática clínica</i>	101
2.1.4. <i>Estratégias para formulações mais efetivas de AMP</i>	102
2.2. Peptídeos em medicina regenerativa	103

2.2.1. <i>Matriz extracelular</i>	103
2.2.2. <i>Materiais ideais em medicina regenerativa</i>	104
2.2.3. <i>Peptídeos como estruturas similares à matriz extracelular</i>	104
2.2.4. <i>Peptídeos que mimetizam estruturas da ECM no tratamento de queimaduras</i>	105
3. OBJETIVOS GERAIS	108
3.1. Objetivos específicos	108
4. MÉTODOS	109
4.1. Nomenclatura dos peptídeos	109
4.2. Síntese e purificação de peptídeos (AMP e de medicina regenerativa)	109
4.3. Ensaio bacterianos	109
4.3.1. <i>Screening</i>	109
4.3.2. <i>Testes de MIC e MBC</i>	110
4.3.3. <i>Ensaio celular</i>	110
4.3.3.1. <u>Teste de toxicidade (ensaio MTT)</u>	110
4.3.3.2. <u>Teste de proliferação celular (ensaio XTT)</u>	110
4.3.3.3. <u>Leitura dos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular em aparelho Incucyte</u>	111
4.3.3.4. <u>Teste de stress induzido por H₂O₂</u>	111
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
5.1. Peptídeos antimicrobianos	111
5.2. Peptídeos em medicina regenerativa	114
5.2.1. <i>Modificações na estrutura química</i>	114
5.2.2. <i>Teste de citotoxicidade</i>	115
5.2.3. <i>Teste de proliferação celular e teste de stress</i>	117
6. CONCLUSÕES	129
7. REFERÊNCIAS	130

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal em um nível que compromete a saúde dos indivíduos, acarretando prejuízos, tais como alterações metabólicas, dificuldades respiratórias e do aparelho locomotor de etiologia multifatorial (WANDERLEY; FERREIRA, 2010).

A prevalência desta doença aumentou drasticamente em todo o mundo, nas últimas décadas, alcançando proporções epidêmicas. A prevalência global quase dobrou entre os anos de 1980 e 2008 (BASTIEN et al., 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2016, 39% dos adultos acima dos 18 anos apresentavam sobrepeso, sendo 13% considerados obesos (OMS, 2018).

As causas que levam a obesidade parecem ser complexas e que a hipótese mais considerada propõe que a obesidade seja influenciada por fatores ambientais, genéticos, neurais e endócrinos (ANGELAKIS et al., 2012), sendo a principal causa o desequilíbrio entre calorias consumidas e gasto energético (OMS, 2013).

O custo econômico e de saúde desta condição e suas comorbidades como infiltração de gordura não alcoólica no fígado (NAFLD), resistência insulínica (RI) ou diabetes mellitus tipo II (DM2) e eventos cardiovasculares é considerável, uma vez que alcançou proporções epidêmicas (VILLANUEVA-MILLÁN; PÉREZ-MATUTE; OTEO, 2015). Uma questão-chave, que pode ser considerada um ponto de ligação entre a obesidade abdominal e as disfunções metabólicas pode ser o estado de baixo grau de inflamação em múltiplos órgãos (LUMENG; SALTIEL, 2011).

Portanto, o uso de substâncias capazes de amenizar tal grau de inflamação, como extratos de frutos naturais, ricos em substâncias antioxidantes, demonstraram efeitos benéficos em parâmetros de saúde como a redução de níveis de glicemia, melhora no perfil lipídico sérico, redução de citocinas inflamatórias (HOSSEINI et al., 2016; LEE et al., 2017; SHI et al., 2017).

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em baixas concentrações retardam ou previnem a oxidação de um substrato orgânico. São responsáveis pela inibição e redução de lesões causadas pelos radicais livres nas células (ABRAHÃO et al., 2012). Entre os alimentos que contém antioxidantes naturais, as frutas e os vegetais são os que mais contribuem para o suprimento dietético destes compostos associados aos efeitos benéficos à saúde (SUCUPIRA et al., 2015).

Plantas nativas do Cerrado brasileiro são conhecidas como fonte de compostos bioativos com aplicação na indústria farmacêutica, e na de alimentos (CARAMORI; LIMA; FERNANDES, 2004). Estas características podem incentivar o desenvolvimento de novos produtos, promovendo o desenvolvimento sustentável das regiões do Cerrado (DE ALMEIDA SIQUEIRA et al., 2013).

A canjiqueira (*Byrsonima cydoniifolia*), fruta nativa do Cerrado demonstrou possuir elevado potencial antioxidante *in vitro* (MARCELINO et al., 2019; PRATES et al., 2015), o que leva a crer que o fruto possui elevado potencial para atenuação do ganho de peso e inflamação causados pelo estresse oxidativo.

Até a presente data, não existem pesquisas abordando o potencial tecnológico e terapêutico sobre a obesidade e parâmetros bioquímicos da canjiqueira, justificando este estudo, que busca evidenciar o potencial de uso destes frutos nativos na atenuação da obesidade, redução da inflamação e melhora do estado nutricional, além do incentivo a preservação e ao desenvolvimento de produção sustentável local, com a possibilidade de produção de novos produtos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Obesidade e disfunções metabólicas

Sobrepeso e obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura, causando prejuízos à saúde. Na caracterização pelo Índice de Massa Corporal (IMC) classifica-se como sobrepeso aquele que possui IMC igual ou maior do que 25 kg/m² e obeso aquele que possui este parâmetro igual ou acima de 30 kg/m² (OMS, 2016).

Segundo dados da pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças por Inquérito Telefônico (Vigitel), 19,8% da população brasileira está obesa (BRASIL, 2018). O foco principal da etiologia da obesidade permanece sendo o desequilíbrio entre o consumo alimentar e a energia gasta (DESPRÉS, 2012). A obesidade é uma doença endócrina complexa, causada pela perturbação de diversos sistemas hormonais, ligando o trato gastrointestinal, pâncreas, musculatura, tecido adiposo, fígado e cérebro, e envolve a interação entre fatores genéticos e ambientais. Além disso, as funções do eixo hipotálamo-pituitária e/ou do eixo hipotálamo gonadal afetam o equilíbrio de energia e de função metabólica (HEINDEL et al., 2015)

O aumento da população com sobrepeso ou obesidade tem sido acompanhada por um aumento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) como hipertensão arterial sistêmica (HAS), DM2, patologias cardiovasculares e doença hepática gordurosa não alcoólica. Em 2004, o crescimento deste quadro levou a designar a obesidade como um desafio de condição de saúde pública de maior importância contemporânea (BÄCKHED et al., 2004). Mais de uma década após esta concepção, a dificuldade para o tratamento à obesidade, continua ineficaz, de modo que o crescimento deste mal é previsível e persiste em castigar os sistemas de saúde ao redor do mundo (WOLFENDEN et al., 2019).

Dentre as patologias associadas ao sobrepeso, o DM2 é um dos mais prevalentes, causando outros tipos de morbidades associadas. No ano de 2015, a estimativa global para pessoas entre 20-79 anos acometidas por diabetes foi em torno de 415 milhões de indivíduos, com a expectativa de aumento para próximo de 642 milhões em 2040 (OGURTSOVA et al., 2017).

O DM2 surge da falência do organismo em responder normalmente à insulina, fenômeno este chamado de “resistência à insulina”, juntamente com a inabilidade de

produzir insulina suficiente para superar este estado de resistência. Este tipo de diabetes está frequentemente associado com a obesidade, e a epidemia atual destas duas condições parecem estar intimamente associadas (CASPARD et al., 2018; MOKDAD et al., 2003).

Devido à importância das consequências da resistência insulínica, seja isolada, ou associada com outras anormalidades, são consideradas parâmetros para determinantes de obesidade, síndrome metabólica e do risco cardiovascular. A inclusão de outros parâmetros para avaliação de risco para morbidades importantes, como as cardiovasculares também podem ser utilizadas como fatores preditivos, sendo possível correlacionar a severidade do grau de dislipidemia com a rigidez da parede arterial e, por consequência, o risco de desenvolver distúrbios cardiovasculares, de uma forma dose-dependente (AROOR; WHALEY-CONNELL; SOWERS, 2019).

A dislipidemia na obesidade caracteriza-se pela elevada quantidade de triglicerídeos circulantes em jejum e pós-prandial, em combinação com a preponderância de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de baixa concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL). A hipertrigliceridemia pode ser a maior causa de outras anormalidades lipídicas, uma vez que levará ao atraso do *clearance* de lipoproteínas ricas em triglicerídeos e a formação de pequenas placas de LDL (CAPELL et al., 1996).

A lipólise de lipoproteínas ricas em triglicerídeos é prejudicada na obesidade devido a redução da expressão do mRNA de LDL no tecido adiposo, redução da atividade da lipoproteína lipase (LPL) na musculatura esquelética e da competição pela lipólise entre as lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e quilomícrons (CLEMENTE-POSTIGO et al., 2011).

Níveis elevados de lipemia pós prandial leva ao aumento da concentração de ácidos graxos livres circulantes, resultando na separação da LPL da superfície endotelial (KARPE et al., 1992). A LPL pode permanecer ligada ao VLDL e a lipoproteína de intermediária densidade (IDL) contribuindo para depleção do triglicerídeo. A troca do triglicerídeo a partir destes remanescentes para ésteres de colesterol de HDL por proteínas transferidoras de éster de colesterol (CETP), leva à formação de pequenas placas de LDL (CAPELL et al., 1996).

O desenvolvimento de pequenas placas de LDL na obesidade é, portanto, principalmente causada pela elevação das concentrações de triglicerídeos e não depende exclusivamente do conteúdo de massa gorda. As placas de LDL são relativamente metabolizadas de forma vagarosa, o que pode aumentar sua aterogenicidade (PACKARD, 2003).

2.2. Macro e microelementos no excesso de peso e *status* de saúde

Muitos estudos têm investigado as associações entre o *status* dos micronutrientes e marcadores de adiposidade, encontrando baixas concentrações de micronutrientes em populações com sobrepeso ou obesidade para um ou mais elementos (GARCÍA; LONG; ROSADO, 2009).

As causas da deficiência de micronutrientes na obesidade não é clara. O baixo consumo pode ser uma das razões, mas a obesidade também afeta o metabolismo e a excreção de nutrientes (ASTRUP; BÜGEL, 2010), de tal forma que indivíduos obesos são mais propensos a possuir um baixo nível ou baixa biodisponibilidade de vitaminas e minerais (KAIDAR-PERSON et al., 2008). Mudanças relacionadas à obesidade têm sido sugeridas, tais como: absorção, armazenamento, oxidação e requerimentos de nutrientes (KIMMONS et al., 2006).

Frutas e vegetais são boas fontes de micronutrientes - vitaminas e minerais, além de seus compostos fitoquímicos (MORALES et al., 2014). Muitos estudos investigaram a associação entre o *status* reduzido de micronutrientes em populações com sobrepeso ou obesidade (GARCÍA; LONG; ROSADO, 2009); enquanto a suplementação de vitaminas e minerais em indivíduos obesos foi associada com perda de peso, redução da massa de gordura, LDL colesterol e triglicerídeos e aumento da taxa metabólica basal e do HDL colesterol, sem a necessidade de realizar restrições alimentares (LI et al., 2010).

Ainda que a reposição de micronutrientes seja eficiente em minimizar efeitos decorrentes de distúrbios metabólicos envolvidos com a obesidade, a quantidade de consumo de minerais deve ser observada com cautela. O excesso de minerais pode ser deletério ao organismo, gerando outros riscos para a saúde, como diarreia, aumento do risco de certos tipos de câncer e toxicidade aguda (ROSBORG; KOZISEK, 2019).

Portanto, alcançar as recomendações de ingestão de nutrientes, sem causar riscos é o objetivo de qualquer dieta usual. Esta necessidade de consumo de minerais pode ser avaliada utilizando as *Dietary Reference Intakes* (DRI) – Referências de Ingestão

Dietética – sendo uma fonte confiável como fonte de comparação, amplamente utilizadas para avaliar se as dietas são capazes de contemplar a quantidade necessária de nutrientes, sem o risco de ser excessiva (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2000). Desta forma, é possível destacar três DRI como fonte de comparação e determinação de quantitativo de nutrientes em um alimento específico:

- *Recommended Dietary Allowance* (RDA): consumo médio diário de certo nutriente que supre as necessidades de cerca de 97 a 98 % da população saudável.
- *Adequate Intake* (AI): é o nível de consumo de um determinado nutriente esperado a garantir a adequação nutricional, quando não há dados suficientes para se determinar a RDA.
- *Tolerable Upper Intake Level* (UL): a máxima quantidade diária possível de ser consumida sem a probabilidade de causar efeitos adversos de saúde.

Alguns elementos foram analisados de forma isolada ou conjuntamente em relação aos seu *status* em indivíduos com excesso de peso, podendo interferir tanto de forma positiva ou negativa:

2.2.1. Alumínio

A associação do consumo e níveis séricos de alumínio ainda não possui evidências contundentes. No entanto, a carga corporal de alumínio foi positivamente relacionada com a presença de peso corporal elevado, sendo esta carga corporal não relacionada com exposição ocupacional (TINKOV et al., 2019). Da mesma forma, maior grau de obesidade, elevada pressão arterial e níveis de LDL- colesterol e de triglicerídeos demonstraram correlação positiva com níveis séricos de alumínio em estudantes de graduação na Coreia do Sul (JUNG et al., 2016).

2.2.2. Cálcio

O papel do cálcio na regulação do peso corporal tem gerado muito interesse, ao se demonstrar que o consumo de elevadas quantidades de cálcio aumenta a perda de gordura corporal e favorece a distribuição da gordura fora da região abdominal (ZEMEL et al., 2000).

O cálcio pode prejudicar a absorção de gordura no intestino pela formação de sabões de ácidos insolúveis ou pela ligação de ácidos biliares. Este mecanismo foi

demonstrado em humanos e animais, indicando que a suplementação de cálcio e de produtos lácteos aumenta a excreção fecal de gordura (DE WIT et al., 2011). Além disso, dietas ricas em cálcio parecem aumentar a termogênese gerada pela alimentação e o aumento da taxa de oxidação de gordura (CUMMINGS; JAMES; SOARES, 2006).

Embora ainda haja resultados controversos, alguns autores sugerem que o consumo elevado de cálcio poderia aumentar a lipólise e reduzir a lipogênese, pela maior disponibilidade de ácidos graxos circulantes e redução da captação destes pelos adipócitos (MAUS et al., 2017; ZEMEL et al., 2005).

2.2.3. Cobalto

O cobalto pode influenciar o peso corporal por diversas vias. Além de ser um metal essencial, fazendo parte da vitamina B12, ele afeta o metabolismo de lipídios, podendo elevar o colesterol HDL e reduzir os níveis de colesterol LDL, ácidos graxos livres e triglicerídeos em camundongos (KAWAKAMI et al., 2012). Além disso, o tratamento com cobalto demonstrou reduzir a glicose plasmática e regular a tolerância à glicose (VASUDEVAN; MCNEILL, 2007). Outra via de possível regulação de peso, é pela regulação dos depósitos de glicogênio, ao suprimir a sinalização do glucagon (TASCILAR et al., 2011).

Em uma pesquisa de examinação nacional de saúde e nutrição (NHANES) nos Estados Unidos, contendo 6602 crianças, os níveis de cobalto foram inversamente relacionados com índice de obesidade (SHAO et al., 2017).

2.2.4. Cobre

A deficiência de cobre está associada com variadas mudanças metabólicas, incluindo hipercolesterolemia, elevação da pressão arterial e intolerância da glicose (FIELDS; LEWIS; LURE, 1996).

Mais recentemente, baixas concentrações de cobre foram observadas em pacientes com NAFLD e correlacionadas com o metabolismo do ferro (ANTONUCCI et al., 2017; FIELDS; LEWIS, 1997). A esteatose hepática também pode ocorrer em animais com baixo consumo de cobre, mas o status de cobre ainda precisa ser mais detalhadamente observado em pacientes com NAFLD e esteatose hepática (BURKHEAD; LUTSENKO, 2013). Pacientes e animais com NAFLD e esteatose hepática não desenvolvem sinais típicos de deficiência de cobre, que incluem baixo cobre sérico, baixa excreção urinária de cobre, baixa concentração e atividade de

ceruloplasmina, anemia, neutropenia e baixa atividade de superóxido dismutase eritrocitária (TURNLUND et al., 1997).

OLUSI et al., (2003) investigaram a associação entre leptina sérica, zinco, cobre e relação zinco/cobre, encontrando que a leptina era positivamente associada com o cobre sérico e a relação zinco/cobre. Além disso, novas evidências têm demonstrado que perturbações no delicado equilíbrio de elementos traço, como cobre e zinco, podem perturbar o equilíbrio de oxirredução no meio fisiológico, levando ao estresse oxidativo e, eventualmente ao surgimento do diabetes ou de complicações do diabetes (ZHENG et al., 2008).

2.2.5. Zinco

O zinco participa de diversos processos metabólicos e bioquímicos no organismo humano, como mecanismos de energia e metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (ZHAO et al., 2019). Além disso, o zinco é um componente de enzimas envolvidas na patofisiologia do diabetes (FUKUNAKA; FUJITANI, 2018).

Estudos recentes reportaram a relação do zinco com diabetes e obesidade, especialmente na alteração do perfil lipídico e insulínico, estresse oxidativo, processos inflamatórios, resistência insulínica, adiposidade e níveis de leptina (OLECHNOWICZ et al., 2018; PRASAD, 2017). Ainda, valores séricos de zinco demonstraram correlação inversa com sobrepeso e obesidade em humanos (RIOS-LUGO et al., 2020).

2.2.6. Ferro

A deficiência de ferro é comumente encontrada em indivíduos obesos. Essa relação inversa foi identificada primeiramente em 1962 (WENZEL; STULTS; MAYER, 1962), tendo sido corroborada diversas vezes depois, em vários estudos NHANES (YANOFF et al., 2007).

Os mecanismos relacionados com este baixo *status* de ferro ainda não foram completamente elucidados, podendo estar relacionados com uma maior necessidade de ferro devido aos grandes volumes de sangue necessários em indivíduos obesos (PINHAS-HAMIEL et al., 2003), ou com o estado de inflamação gerado pela condição de obesidade na absorção dietética do ferro, e não comente pela quantidade de ferro consumido pelo indivíduo obeso (CEPEDA-LOPEZ et al., 2011).

2.2.7. Potássio

A relação da ingestão e excreção de potássio com a obesidade apresenta muitos resultados controversos. No entanto, alguns estudos demonstram que um maior consumo de potássio está inversamente associado com o risco de desenvolver obesidade (MURAKAMI et al., 2015; SHIN et al., 2013).

Para aqueles que consideram que o potássio pode influenciar no quadro de obesidade, os mecanismos de ação propostos incluem a regulação da homeostase de glicose (MARIOSIA et al., 2008), participando de processos de secreção de insulina e metabolismo de carboidratos (ASHCROFT, 2005). Por outro lado, os benefícios associados ao consumo de potássio podem ser devido ao consumo de frutas e vegetais, que são as maiores fontes alimentares deste elemento (MURAKAMI; SASAKI; UENISHI, 2012).

2.2.8. Magnésio

A concentração de magnésio no tecido sanguíneo e a sua ingestão têm apresentado resultados divergentes em relação ao seu papel no ganho de peso e obesidade. O baixo consumo de magnésio já foi relacionado com maiores índices de adiposidade (LU et al., 2020); discrepando dos resultados de Guerrero-Romero et al., (2016) que não conseguiram detectar a diferença entre os níveis séricos elevados de magnésio e níveis de obesidade. Ainda, a hipomagnesemia foi apontada como um fator protetor quanto à indução de obesidade em roedores alimentados com dieta com alto padrão de gordura (KURSTJENS et al., 2018).

Ainda que não haja consenso em relação ao consumo e níveis séricos de magnésio e a obesidade, o consumo adequado pode favorecer a uma minimização de quantidade de gordura por mecanismos secundários. Diversos estudos correlacionam a suplementação de magnésio com redução da resistência à insulina e consequente redução de estado hiperglicêmico (GUERRERO-ROMERO et al., 2016; HEIDARY et al., 2018; LIU et al., 2020; RODRÍGUEZ-MORÁN et al., 2018).

2.2.9. Manganês

Assim como em outros elementos, a relação de consumo e de níveis séricos de manganês com a obesidade e síndrome metabólica ainda não foram esclarecidos. Em estudo com ratos Zucker, maiores concentrações de manganês no plasma do grupo

diabético, foi relacionado com obesidade e aumento do estresse oxidativo (NAVARRO-ALARCON et al., 2018).

Em humanos, tanto níveis elevados, quanto níveis abaixo do ideal foram correlacionados com *status* positivos e negativos de adiposidade e marcadores de síndrome metabólica, respectivamente. A presença de síndrome metabólica em homens foi negativamente associada com o consumo de manganês. Da mesma forma, a obesidade abdominal e hipertrigliceridemia em homens foi inversamente proporcional ao consumo de manganês. Contraditoriamente, maiores níveis de consumo de manganês estavam associados ao risco de síndrome metabólica em mulheres (ZHOU et al., 2016).

2.2.10. Sódio

As contribuições do sódio em relação ao ganho de peso foram investigadas e, foram positivamente associadas ao sobrepeso e obesidade em comunidades hispânicas nos Estados Unidos (ELFASSY et al., 2018). Um estudo NHANES realizado nos Estados Unidos; detectou que o sódio pode contribuir tanto para a obesidade e obesidade central, independentemente de outros fatores. O aumento do consumo em 1 g/dia de sódio foi capaz de elevar em 15 % o risco de obesidade e em 24 % o risco de obesidade central (ZHANG et al., 2018).

2.2.11. Selênio

A relação de selênio com obesidade ainda é obscura. Grande parte dos estudos que envolvem o consumo de selênio e obesidade, focam na relação com outras patologias, como diabetes e câncer. Em uma revisão sistemática, Retondario et al., (2019); concluíram que não é possível determinar associação entre a ingestão de selênio e síndrome metabólica.

De outra maneira, um estudo envolvendo 3214 indivíduos, detectou que homens e mulheres obesos apresentam menor consumo de selênio do que indivíduos eutróficos, quando a quantidade é ajustada para o peso. Ainda, há correlação inversa e dose-dependente do consumo de selênio e IMC, circunferência de cintura e percentual de gordura corporal e abdominal. Os autores atribuíram ao selênio individualmente variações entre 9 -27 % no quantitativo do percentual de gordura (WANG et al., 2016).

2.3. Estabilidade térmica em óleos de origem vegetal

Óleos vegetais são utilizados frequentemente na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e química (DUGO et al., 2004). O uso de óleos vegetais pode ser benéfico à saúde humana quando em substituição de porções saturadas de gordura animal, cujo consumo é associado com maior risco cardiovascular e resistência à insulina; enquanto o consumo de ácidos graxos monoinsaturados e de ácido graxo poli-insaturado ômega-3 parece reverter estes efeitos (ROS; MATAIX, 2006).

Na indústria alimentícia, estes óleos são usados em processos tais quais frituras, cozimento em forno e aquecimento em micro-ondas, sendo o principal uso em frituras de imersão, atingindo temperaturas entre 150-190 °C (MAJCHRZAK et al., 2017).

Dentro dos métodos utilizados na avaliação da qualidade nutricional de óleos comestíveis é incluída a análise por termo gravimetria (TG) (ATABANI et al., 2019). As leituras realizadas por TG dão resultados de massa em resposta à função tempo x temperatura, demonstrando o comportamento térmico da massa da amostra durante a combustão, gaseificação e pirólise (MÜSELLIM et al., 2018).

O aquecimento influencia diretamente o processo de oxidação, uma vez que a presença de oxigênio em conjunto com a ação da luz e elevadas temperaturas promove diversas reações químicas nos óleos vegetais, como hidrólise, formação de produtos de peroxidação, oxidação de ácidos graxos poli-insaturados e isomerização das formas *cis/trans*, e polimerização de lipídios oxidados (GONÇALVES; MARÇO; VALDERRAMA, 2014; KONGBONGA et al., 2015; TENA; GARCÍA-GONZÁLEZ; APARICIO, 2009). A formação destes produtos afeta a qualidade dos óleos vegetais, uma vez que causam mudanças em sabor, cheiro e qualidade nutricional (VALDERRAMA et al., 2011), sendo os óleos com maior presença de insaturações mais susceptíveis à degradação térmica (MAJCHRZAK et al., 2017).

Desta forma, o consumo de óleos de origem vegetal, predominantemente insaturados para cocção poderia de alguma forma afetar a qualidade do produto e consequentemente a saúde. De fato, o uso de óleos aquecidos e reaquecidos pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares, ao afetar os lipídios séricos, pressão sanguínea, e promover aterosclerose (JAARIN; MASBAH; KAMISAH, 2018). Por outro lado, o uso de gorduras com alto teor de ácidos graxos saturados na cocção pode ser vantajoso em relação aos ácidos graxos poli-insaturados, pois ácidos graxos saturados são menos susceptíveis à oxidação térmica (GROOTVELD; PERCIVAL; GROOTVELD, 2018).

Uma das estratégias utilizadas para aumentar a estabilidade térmica de óleos vegetais é a inclusão de antioxidantes sintéticos, tais quais o butyl-4-hydroxyanisole (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT), tendo ambos sido largamente utilizados pela indústria alimentícia (SANHUEZA; NIETO; VALENZUELA, 2000).

No entanto, embora tanto o BHT, quanto o BHA sejam bastante eficientes em prevenir a degradação térmica (BERA; LAHIRI; NAG, 2006), seu uso apresenta potenciais riscos de saúde, dentre eles efeito carcinogênicos e citotoxicidade (AKLAKUR, 2018). Este paradigma, de preservação do óleo e da necessidade de se manter a saúde do consumidor trouxe a necessidade da utilização de outros substratos para prevenir a degradação de óleos vegetais. A inclusão de antioxidantes naturais em óleos de origem vegetal, especialmente os com alto teores de ácidos graxos poli-insaturados, é uma estratégia benéfica à saúde (TAGHVAEI; JAFARI, 2015).

Além disso, óleos vegetais extraídos de frutos nativos podem carrear antioxidantes naturalmente presentes nos frutos ou podem ser suplementados com estes antioxidantes e portanto conferir estabilidade térmica sem afetar sua qualidade nutricional (KONSOULA; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2010; PACHECO-PALENCIA; MERTENS-TALCOTT; TALCOTT, 2008).

A inclusão de antioxidantes naturais advindos de ervas, frutos ou partes de descarte de frutos e vegetais tem ocorrido com sucesso na prevenção da degradação de óleos para uso culinário. O extrato de alecrim demonstrou promover maior estabilidade oxidativa quando em comparação com antioxidantes artificiais (YANG et al., 2016). Igualmente, o extrato do descarte de caule de *Stevia* foi efetivo em inibir a oxidação de óleo de peixe, além de possuir potencial antioxidante elevado (YU et al., 2017). Ainda, a extração fenólica de águas residuais de moinho de oliva obteve efeito promissor como agente estabilizador na fritura, preservando antioxidantes presentes tanto no óleo, quanto na comida, além de reduzir a formação de compostos indesejáveis, como acroleína e hexanal (SORDINI et al., 2019).

É importante salientar que o uso de antioxidantes naturais são uma opção na estabilização de óleos vegetais, no entanto, sua ação pode ser comprometida por fatores externos, como exposição à luz, que degrada antioxidantes conhecidos, como o resveratrol (XU et al., 2017).

2.4. Antioxidantes

Da mesma forma que os antioxidantes protegem produtos lipídicos da oxidação, eles também são responsáveis por manter o equilíbrio celular e evitar danos no organismo. Antioxidante pode ser definido como uma substância auxilia na redução da severidade do estresse oxidativo ao formar um radical menos reativo ou pela mitigação dos danos causados pela reação em cadeia em substratos (proteínas, lipídeos, carboidratos ou DNA) por radicais livres (FINAUD; LAC; FILAIRE, 2006). Estes são responsáveis pela inibição e redução de lesões causadas pelos radicais livres nas células (ABRAHÃO et al., 2012), inibindo o início da lipoperoxidação, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos (RODRIGUES et al., 2003).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação através de dois mecanismos: primário e secundário. Os primários representados pelos compostos fenólicos podem atuar de duas formas: pela transferência de hidrogênio ou pela transferência de elétrons. Os secundários retardam as reações de auto-oxidação por meio da complexação de metais, pela redução de metais como Ferro e Cobre (MIRA et al., 2002), remoção de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos com formação de compostos mais estáveis e regeneração dos antioxidantes primários (DA SILVA; JORGE, 2015).

Em 2011, Halliwell, valorizou o efeito dos antioxidantes endógenos em detrimento dos antioxidantes dietéticos, ao relatar que a capacidade antioxidante total de células e tecidos se beneficia muito mais de antioxidantes como a glutatona (GSH) ou da superóxido dismutase (SOD), enquanto os antioxidantes dietéticos teriam uma função bem menor.

O sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não enzimático, sendo o enzimático representado principalmente pela SOD, a qual catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet}$) a peróxido de hidrogênio H_2O_2 , e O_2 , a catalase (CAT) atuando na decomposição de H_2O_2 a H_2O e O_2 e a glutatona peroxidase, que atua sobre peróxidos em geral, com utilização da GSH como cofator. O sistema não enzimático engloba a GSH, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico, β -caroteno, proteínas de transporte de metais de transição (VASCONCELOS et al., 2007).

Outra classificação que pode ser dada aos antioxidantes é sobre sua disponibilidade na natureza, podendo ser naturais ou sintéticos. Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados estão o BHA, o BHT, o galato de propila, a *terc*-butil-

hidroquinona (TBHQ) e os sorbatos (TREVISAN et al., 2009), enquanto a classe de maior representatividade para os antioxidantes naturais são os compostos fenólicos (BOLELLI BROINIZI et al., 2007).

O uso abusivo de antioxidantes sintéticos é questionado devido ao seu potencial risco, associado a efeitos deletérios e/ou tóxicos no organismo e possivelmente à carcinogênese, além de reduzir a qualidade nutricional dos produtos. O uso do BHA mostrou induzir hiperplasia gastrointestinal em roedores, enquanto, em humanos esta associação não está clara. O uso de TBHQ foi atribuído a redução dos níveis de hemoglobina e de hiperplasia de células basais. A aplicação destes antioxidantes foi banida ou limitada em diversos países, como o Japão e o Canadá (ANDRÉ et al., 2010; DELFANIAN; KENARI; SAHARI, 2015; DING; ZOU, 2012; FREITAS; FATIBELLO-FILHO, 2010; RAMALHO; JORGE, 2006).

Por outro lado, evidências epidemiológicas demonstraram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e consumo de substâncias fenólicas. Este efeito protetor tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes. Além disso, o consumo regular de alimentos ricos em antioxidantes naturais, como frutas e vegetais está associado à redução da mortalidade e morbidade por algumas doenças crônicas não transmissíveis e câncer (BOLELLI BROINIZI et al., 2007; DE ALMEIDA MELO et al., 2008; ROCHA et al., 2013).

Desta forma, a substituição de antioxidantes sintéticos pelos naturais pode apresentar benefícios, tanto devido às suas implicações na saúde, quanto na funcionalidade. Os antioxidantes naturais apresentam maior solubilidade em compostos aquosos e lipídicos, além de poderem ser aproveitados em nível preservacionista, ao se utilizar resíduos descartados pela indústria alimentícia (TREVISAN et al., 2009).

2.5. Compostos bioativos

Compostos bioativos são substâncias capazes de trazer efeitos benéficos à saúde humana, pois auxiliam o sistema metabólico a reduzir o estresse oxidativo e a incidência de doenças cardiovasculares e câncer (DIAS; LUZIA; JORGE, 2013; XU; CHEN, 2011). Muitos destes antioxidantes naturais exibem uma gama de efeitos biológicos, incluindo atividade antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica, antitrombótica e ações vasodilatadoras (BABBAR et al., 2011). Embora o uso de compostos naturais ocorra em larga escala, com baixa ou nenhum tipo de regularização,

não significa o consumo de tais compostos sejam livres de riscos. A monitorização da ingestão deve ocorrer, especialmente no uso crônico, uma vez que a toxicidade destes compostos ainda não está claramente elucidada (SKOTTI et al., 2014).

A maior parte das substâncias biologicamente ativas, como vitaminas e metabólitos secundários (polifenóis, carotenoides, esteroides, glucosinolatos e saponinas) está presente em ervas, frutas e vegetais (DEMBITSKY et al., 2011).

Em relação à modulação dos antioxidantes na perda de peso, Wang et al., (2014) encontraram supressão de ganho de peso em animais tratados com antioxidantes e dieta hiperlipídica, em relação ao grupo controle, demonstrando que a atenuação do estresse oxidativo pode estar implicada na perda de peso. Já a aplicação de extrato de oxicoco foi capaz de modificar a microbiota intestinal de camundongos, reduzido o ganho de peso induzido por dieta hiperlipídica, reduzido o acúmulo de triglicerídeos e melhorado a sensibilidade à insulina, tendo este efeito sido associado ao seu potencial antioxidante e redução da inflamação (ANHÊ et al., 2015).

2.5.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos em frutas e vegetais são os agentes bioativos mais conhecidos pelos benefícios à saúde. Estes são amplamente distribuídos na natureza, com mais de 8000 compostos já identificados (LORDÊLO CARDOSO SILVA et al., 2010). Os fenóis encontrados nas plantas estão localizados tanto em partes comestíveis como partes usualmente descartadas de plantas, e têm sido documentados diversos efeitos biológicos, inclusive atividade antioxidante (BABBAR et al., 2011).

Fenóis são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo grupos outros funcionais (ROCHA et al., 2011). Estes atuam como substâncias redutoras, pois interrompem a cadeia da reação de oxidação através da doação de elétrons ou de hidrogênio aos radicais livres, eliminando-os ou convertendo-os em produtos estáveis, na redução do oxigênio singlete, na quelação de metais, componentes iniciadores da oxidação lipídica (DE ALMEIDA MELO et al., 2008).

Estes compostos são formados a partir do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para seu crescimento e reprodução. Também se originam em condições de estresse como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta, entre outros (JACQUES; ZAMBIAZI, 2011).

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias como: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, ligninas e lignanas (SOUSA et al., 2007). Estes compostos são os antioxidantes mais abundantes na alimentação, e sua ingestão média chega a ser dez vezes maior em relação a vitamina C, e 100 vezes maior quando comparados a vitamina E e aos carotenoides, outros antioxidantes naturais (DA SILVA OLIVEIRA et al., 2011).

Como os produtos elaborados e *in natura* possuem mais de um tipo de composto fenólico em sua composição, é possível que estes interajam entre si, podendo agir de maneira sinérgica ou antagônica, aumentando ou reduzindo o potencial antioxidante do alimento. Estes compostos também podem interagir com outros bioativos, sendo impossível prever a atividade antioxidante de um alimento estudando apenas um composto específico, como um flavonoide ou uma determinada vitamina (HIDALGO; SÁNCHEZ-MORENO; DE PASCUAL-TERESA, 2010).

2.5.2. Taninos

Taninos são componentes polifenólicos, de peso molecular relativamente alto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares, sendo capazes de complexar proteínas e outros polímeros (AGOSTINI-COSTA et al., 1999; PANSERA et al., 2003).

Taninos hidrolisáveis são metabólitos secundários encontrados na natureza, de peso molecular variando entre 500 - 5000 Dalton, solúveis em água. Taninos hidrolisáveis são estes múltiplos ésteres de ácido gálico e glicose ou produtos de suas reações oxidativas (ARAPITSAS, 2012).

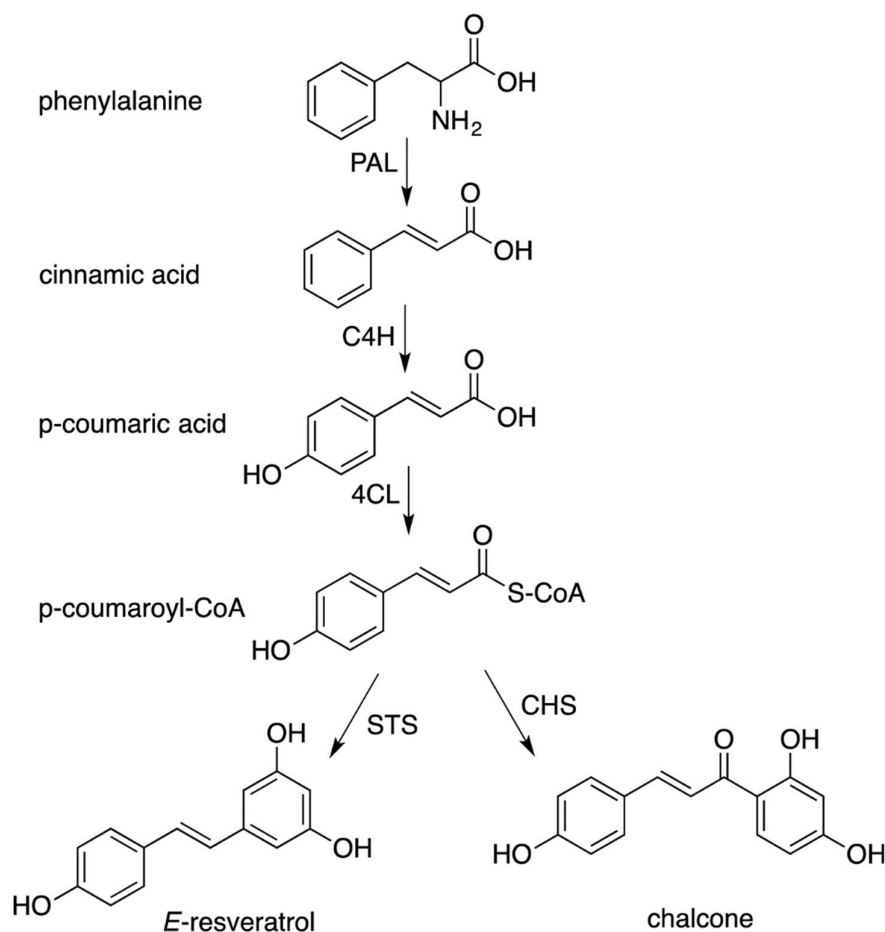
Os taninos afetam a qualidade dos alimentos de diversas formas, sendo que a adstringência é a propriedade mais conhecida e estudada. Proteínas salivares ricas em prolina formam complexos com taninos dos alimentos e precipitam, resultando em uma sensação adstringente, percebida como uma sensação difusa de secura e aspereza, não confinada em local específico da língua e boca (GLABASNIA; HOFMANN, 2006).

Diferentes taninos hidrolisáveis de partes comestíveis ou não, de plantas, demonstraram importante atividade biológica, com propriedades antitumoral, antimutagênica, antidiabética, antiproliferativa, antibacteriana e antimicótica (ARAPITSAS, 2012; BUZZINI et al., 2008).

2.5.3. Estilbenos

Estilbenos são moléculas que ocorrem em um grupo limitado de famílias de plantas, que possuem o gene que codifica a enzima estilbeno sintase (STS, EC 2.3.1.95). a síntese ocorre pela via da Fenilalanina, onde as enzimas Fenilalanina Amônia Liase (PAL), Cinamato-4-Hidroxilase (C4H) e Cumaril-CoA Ligase (4CL) e a STS participam de forma fundamental. Enquanto o fator de transcrição Myb14 regula a expressão de STS (HÖLL et al., 2013, p. 3). A Chalcona Isomerase (CHI) é responsável pela conversão das chalconas à flavononas, já o Resveratrol-*O*-Metiltransferase (ROMT) está envolvido na metilação do resveratrol (BŁASZCZYK; SADY; SIELICKA, 2019), de acordo com a Figura 1.

Figura 1. Síntese de estilbenos



Os estilbenos são sintetizados e acumulados em vesículas lipídicas no citoplasma de plantas. Seu conteúdo depende de diversos fatores, como cultivar, estágio

de maturação, condições de armazenamento e manejo pós-coleta (CASTREJÓN et al., 2008; DIXON; PAIVA, 1995).

O resveratrol é o estilbeno mais estudado, pela sua anticâncer. O piceatanol é um análogo do resveratrol, com um grupo fenol adicional na posição 3', sendo um antioxidante poderoso, exibindo ações anticâncer e quimioprotetoras (PIOTROWSKA; KUCINSKA; MURIAS, 2012).

Além disso, o tratamento de pré-adipócitos com piceatanol, demonstrou inibir a adipogênese pela inibição da expansão clonal mitótica e da atividade receptora de insulina na fase inicial da adipogênese (KWON et al., 2012). Em estudo em humanos, a suplementação com 20 mg/dia de piceatanol em homens com sobrepeso apresentou melhoras no metabolismo da glicose, incluindo aumento da sensibilidade à insulina, queda da pressão arterial e redução dos batimentos cardíacos (KITADA et al., 2017).

2.6. Bioma Cerrado

O bioma Cerrado ocupa 25% do território brasileiro, sendo o segundo maior bioma da América do Sul, perdendo em tamanho apenas para a Floresta Amazônica (ROESLER et al., 2007). Apresenta aproximadamente 204 milhões de hectares, englobando 12 estados, sendo que a distribuição de seus microbiomas é determinada pelas formas de relevo, altitude, limitações de fertilidade química do solo e pela sazonalidade pluviométrica (BRASIL, 2002). É um ponto de acesso de biodiversidade, devido suas características que poderiam ser descritas como um mosaico de habitats, incluindo savanas de variadas estruturas (vegetação dominante), pradarias e florestas (PACHECO; VASCONCELOS, 2012).

O Cerrado é um dos maiores e mais importantes biomas do Brasil e América do Sul, presente em diversos Estados brasileiros, como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, entre outros, exibindo grande biodiversidade (EMBRAPA, 2010). O território do Pantanal, que compreende 140.000 km² de planície sedimentar, com ambientes característicos, que combina a vegetação em mosaico como as cordilheiras com vegetação arbórea mais densa (SILVA et al., 2000), é coberto predominantemente pelo ecossistema Cerrado, abrangendo 50% de sua extensão territorial (POTT et al., 2011).

Frutos nativos ocupam lugar de destaque neste ecossistema, pois muitos são comercializados e consumidos *in natura* ou beneficiados por indústrias caseiras

(EMBRAPA, 2010). A flora do Cerrado brasileiro possui diversas espécies frutíferas com grande potencial agrícola, consumidos pela população. Frutos nativos são consumidos geralmente *in natura* ou sob forma de sucos, licores, sorvetes, geleias e doces diversos. Pesquisas dos frutos da região têm evidenciando seu potencial antioxidante, através da descrição de bioativos presentes, corroborando com achados populares, tais como jambolão, araticum, lobeira, cagaita e pequi (FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011; ROCHA et al., 2011; ROESLER et al., 2007).

Atualmente, os frutos do Cerrado possuem relevância econômica uma vez que são explorados por pequenos agricultores e pela atividade extrativista. Estes frutos apresentam excelentes propriedades sensoriais, porém há poucos estudos em relação às suas propriedades nutricionais e sua disponibilidade comercial é baixa. Apesar deste fato, estes frutos tem chamado a atenção dos consumidores, dada a importância que os alimentos nutraceuticos e funcionais tem conquistado no mercado (FINCO; SILVA; OLIVEIRA, 2012).

A canjiqueira (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.) (Figura 1), com sinonímia *Byrsonima orbignyana* é uma *Malpighiaceae* muito comum na região do Pantanal, englobada no Bioma parque do Cerrado, normalmente com a predominância de uma única espécie de árvore ou arbustos sobre um estrato de grama (POTT et al., 2011), ocorrendo em terrenos secos e alagados (SANTOS et al., 2008a), em solos arenosos ou argilosos, sendo uma formação arbustiva homogênea, com altura entre 1 e 5 metros de altura, formando grandes cachos de canjiqueiras (POTT et al., 2011, DAMASCENO JÚNIOR; SOUZA, 2008).

Figura 2. Fruto da canjiqueira



Fonte: Paulo Robson de Souza (2016)

PRATES et al., (2015) encontraram elevado potencial antioxidante em frutos frescos maduros (EC_{50} 12,83 mg.mL^{-1}) e verdes (IC_{50} 4,63 mg.mL^{-1}) da canjiqueira, elevados teores de taninos, maduros e verdes, respectivamente ($100,46 \pm 4,58 \text{ mg EAT}100\text{g}^{-1}$); ($195,94 \pm 3,14 \text{ mgEAT } 100\text{g}^{-1}$) e fenóis no fruto maduro ($312,71 \pm 7,67 \text{ mg EAG } 100\text{g}^{-1}$) e no fruto verde ($501,18 \pm 7,61 \text{ mg EAG } 100\text{g}^{-1}$), onde o fruto verde apresentou resultados significativamente melhores do que o maduro em todos os parâmetros testados.

Além disso, Marcelino et al., (2019) demonstraram alta atividade antioxidante no extrato de canjiqueira, enquanto que o potencial anti-inflamatório e seu uso como nutracêutico foi explorado com a detecção de diversos compostos de interesse, como *trans*-resveratrol e *trans*-picetanol (SANTOS et al., 2017).

Uma vez que a canjiqueira é uma planta de característica invasiva, causando prejuízos na tentativa de seu controle sobre a invasão de pastagens (BERSELI et al., 2019), a exploração deste fruto poderia minimizar as perdas sofridas pelo agricultor ou até mudar o foco de seus investimentos.

Diante do exposto, estudos visando aumentar o conhecimento e utilização da canjiqueira podem ser de grande interesse econômico e industrial. A aplicação tecnológica do fruto, com a formulação de produtos, pode beneficiar não somente a economia, mas também possuir aplicação como estratégias de manutenção e tratamento de saúde. Desta forma, o conhecimento das características químicas da canjiqueira e sua aplicação em estudo *in vivo* justifica este estudo.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química, potencial tecnológico e o efeito da suplementação do extrato de canjiqueira na obesidade induzida em camundongos.

3.1. Objetivos específicos

Determinar composição centesimal da polpa da canjiqueira;

Determinar o perfil mineral na polpa e sementes de canjiqueira;

Avaliar a estabilidade térmica de óleos da polpa e semente de canjiqueira;

Quantificar piceatanol no extrato da semente e da polpa de canjiqueira;

Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato do fruto integral de canjiqueira através do método DPPH, e determinação de fenóis e taninos;

Avaliar o efeito da suplementação do extrato do fruto integral de canjiqueira em diferentes concentrações no metabolismo de animais obesos;

Comparar o ganho de massa nos grupos controle e tratados com extratos;

Realizar análise de colesterol total e frações, triglicerídeos e glicemia nos animais

Realizar análise histológica no fígado dos animais.

.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção da matéria-prima

Os frutos de canjiqueira foram coletados nos arredores da cidade de Corumbá (-19°36'14.36", -57°02'48.90"), durante os meses de janeiro e fevereiro de 2016, no período de safra e cadastrados em plataforma SisGen número A7716EC. O fruto foi depositado em herbário da UFMS sob número de tombo 59035.

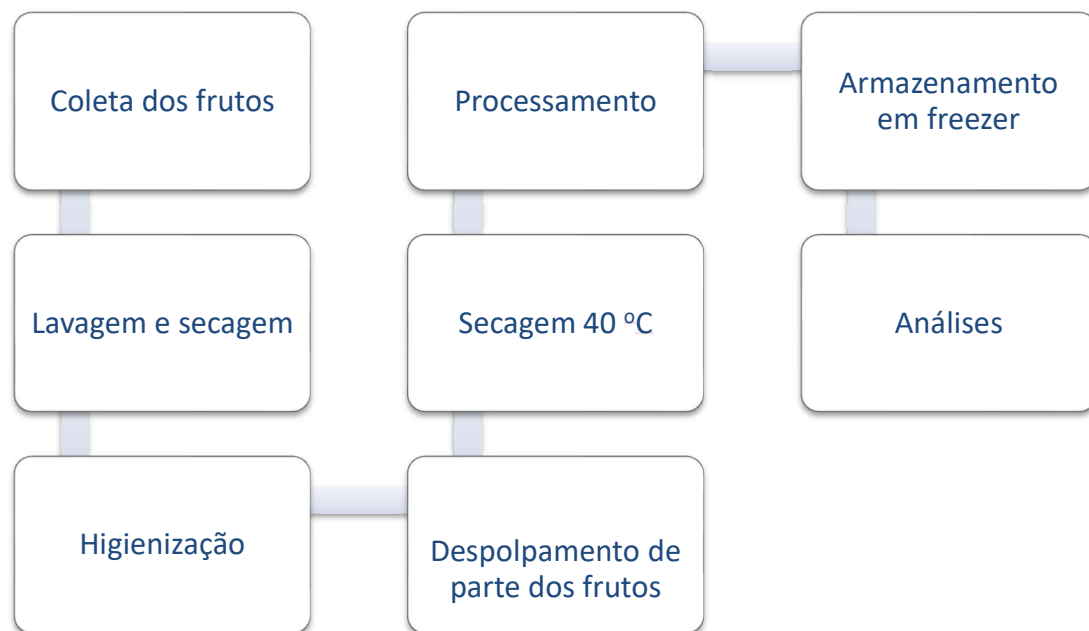
Nos laboratórios de Metabolismo Mineral da Faculdade de Medicina (FAMED) e da Unidade de Tecnologia de Alimentos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FACFAN-UFMS) os 4820 g de frutos foram lavados com água encanada, higienizados com água sanitária (150 ppm), secados ao natural, pesados e despulpados em ambiente escuro, para que não houvesse interferência da luz no conteúdo antioxidante dos frutos.

Um total de 2410 g de frutos foram utilizados integralmente e armazenados em ambiente escuro sob -8 °C, até o momento de serem utilizados para as análises. Outros 2410 g de frutos foram separados em polpa e semente, e mantidos separadamente nas condições que os frutos integrais. Ambos os tipos de amostra foram desidratados em estufa de circulação (40 °C), homogeneizados e armazenados em freezer (-8 °C).

Nos frutos despulpados foi realizada a composição centesimal (apenas na polpa), extração e análise térmica nos óleos da polpa e semente e quantificação de piceatanol em polpa e semente. Os frutos integrais foram utilizados para preparar o extrato utilizado no estudo animal, determinação de atividade antioxidante por método DPPH, determinação de fenóis e taninos e quantificação de piceatanol.

Os procedimentos de recebimento até análises dos frutos estão apresentados pelo fluxograma na Figura 3.

Figura 3. Fluxograma de preparo de amostra para análises



4.2.Composição química dos frutos

4.2.1. Composição centesimal

A composição de macronutrientes da polpa foi realizada pelos métodos padronizados pelo Instituto Adolfo Lutz quanto à determinação de umidade, por dessecação em estufa a 105°C, de cinzas ou resíduo mineral fixo por incineração em mufla, de lipídeos através de extração direta com éter de petróleo em aparelho de Soxhlet, e proteínas por método de micro-Kjeldhal clássico (usando o fator de conversão de nitrogênio em proteína de 5,75, utilizado para fontes vegetais) (BRASIL, 2005). Considerando que a soma das partes da composição centesimal deve resultar em 100 %, a determinação de glicídios foi determinada pela diferença da soma do total de nutrientes e umidade pelo todo equivalente a 100. Fibras totais, solúveis e insolúveis foram determinadas por método enzimático, de acordo com as recomendações da AOAC (LEE; PROSKY; VRIES, 1992).

4.2.2. Detecção de minerais

4.2.2.1. Preparo do material para leitura das amostras

Todas as vidrarias e materiais de polietileno foram mantidos submersos em solução de HNO₃ a 10% por 24 horas.

4.2.2.2. Digestão por micro-ondas

A polpa e a sementes desidratadas foram pesadas em balança analítica e processadas nas seguintes condições: pesado em torno de 0,25 g de amostra de polpa e de semente, adicionados de 2 mL de ácido nítrico (HNO_3 a 65%, Merck) e 2 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 35%, Merck Millipore) em sistema de digestão de micro-ondas (Speedwave[®], Berghof, Germany). As condições de operação do micro-ondas estão representadas na Tabela 1, onde cada estágio ocorre sequencialmente. Após a digestão, as amostras foram diluídas para 10 mL com água ultrapura (ELGA, Veolia Water Solutions & Technologies, USA), uma vez que a concentração final de ácidos era elevada.

Tabela 1. Condições de operação para digestão em sistema de micro-ondas

	Estágios			
	1	2	3	4
Temperatura (°C)	145	170	190	50
Tempo de Rampa (min)	2	5	2	1
Tempo de Reação (min)	5	10	15	10
Potência (%)	90	90	90	0
Pressão (bar)	40	40	40	0

*100 % de potência correspondem a 1450 W

4.2.2.3. Análise elementar pela técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES)

O conteúdo de macro e microelementos (Al, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mo, Mn, Na, Se e Zn) na polpa e na semente foram medidos em aparelho ICP-OES (ThermoScientific

– iCAP 6000 Series). As concentrações de diferentes elementos foram determinadas utilizando as respectivas curvas de calibração padrão. As condições de operação do ICP-OES foram otimizadas de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Condições de operação do ICP-OES

RF Power (W)	1250
Taxa de fluxo da amostra L/min	0.5
Fluxo de plasma L/min	12
Tempo de integração (s)	5
Tempo de estabilização (s)	20
Fluxo de nebulização (psi)	30
Modo de visão	Axial
Analitos / λ (nm)	Al 396.152; Ca 393.366; Co 288.616; Cu 324.754; Fe 259.940; K 766.490; Mg 279.553; Mo 202.030; Mn 257.610; Na 589.592; Se 196.090; Zn 213.856

4.2.2.4. Curvas de calibração

Soluções padrão multielementares contendo 100 mg/L (SpecSol, Quimlab, Brazil) dos elementos Al, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mo, Mn, Na, Se e Zn foram utilizadas para preparar uma diluição de solução padrão. Para todos os elementos estudados foi determinada uma curva de calibração externa (Equação Linear), utilizando as seguintes concentrações de elementos: 0,001, 0,0026, 0,005, 0,01, 0,25, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 mg/mL, além de uma amostra em branco. Para cada elemento analisado (Tabela 3) foram estabelecidos Limite de Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção (LOD) e coeficiente de correlação (R^2), com base na leitura de 10 brancos, de acordo com as recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (LONG; WINEFORDNER, 1983).

Tabela 3. Parâmetros de calibração obtidos pela calibração externa, coeficiente de correlação (R^2), Limite de Detecção e Limite de Quantificação na utilização de ICP-OES

Analito	R^2	Equação linear	LOD mg/L	LOQ mg/L
Al	0,9996	$y = 457,76x + 8,7836$	0,056	0,187
Ca	0,9993	$y = 70225x + 1953,4$	0,003	0,011
Co	0,9998	$y = 4161,7x + 5,8914$	0,003	0,008
Cu	0,9997	$y = 13021x + 107,6$	0,003	0,010
Fe	0,9996	$y = 3451,9x + 31,784$	0,007	0,022
K	0,9969	$y = 290,72x + 18,667$	0,345	1,149
Mg	0,9997	$y = 284979x + 3438,5$	0,001	0,002
Mo	0,9998	$y = 2201,2x + 4,468$	0,001	0,005
Mn	0,9999	$y = 37724x + 281,01$	0,0004	0,001
Na	0,9995	$y = 1167,7x + 7,7392$	0,086	0,287
Se	0,9999	$y = 365,94x + 1,7592$	0,011	0,037
Zn	0,9999	$y = 8849,5x + 74,424$	0,0005	0,002

Para definição de acurácia, uma quantidade conhecida de cada analito foi adicionada (1 mg/L) e a quantidade detectada foi medida (Tabela 4). Valores de recuperação considerados aceitáveis pela IUPAC variam entre 80 – 120%.

Tabela 4. Testes de adição e recuperação dos analitos obtidos no ICP-OES (n=3)

Analito	Valor obtido mg/L	% Recuperação	%RSD
Al	1,09 ± 0,003	109,17	0,27
Ca	0,89 ± 0,139	88,98	15,61
Co	0,95 ± 0,000	94,75	0,00
Cu	1,08 ± 0,003	108,28	0,27
Fe	1,11 ± 0,001	110,98	0,09
K	1,18 ± 0,390	118,50	33,05
Mg	0,90 ± 0,069	90,13	7,66
Mo	1,01 ± 0,001	101,29	0,10
Mn	0,94 ± 0,016	94,04	1,70
Na	1,09 ± 0,036	109,54	3,30
Se	0,90 ± 0,002	89,79	0,22
Zn	0,93 ± 0,001	92,94	0,10

Resultados expressos em média ± desvio padrão

4.2.2.4. Critérios de julgamento

Como critério de comparação, a polpa ou semente de canjiqueira foram considerados fonte em determinado nutriente/micronutriente, quando atenderam em uma única porção a quantidade entre 10 e 19,9% das recomendações das DRI (RDA ou AI) em uma única porção (equivalente a 100 g). Da mesma forma, foram considerados ricos em um determinado nutriente, quando em uma única porção foram capazes de suprir 20 % ou mais das recomendações de DRI (NUTRITION, 2020).

4.7. Extração do óleo da polpa e da semente de canjiqueira

Após despolpamento e secagem da canjiqueira, 100 g de polpa e semente foram intumescidos em 300 mL de hexano por 14 dias, em frasco fechado a temperatura ambiente. O solvente foi concentrado em rotaevaporador e secado em fluxo de nitrogênio.

4.7.2. Determinação de lipídeos nos óleos da polpa e da semente de canjiqueira

Os óleos foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), de acordo com metodologia descrita por Figueiredo et al., (2017). Primeiro, 100 mg de cada óleo foi adicionado a 2 mL de solução metanólica de fluoreto de boro e a 1 mL de tolueno. Essa mistura

foi aquecida a 100 °C em estufa e resfriado até alcançar temperatura ambiente, então foram adicionados 5 mL de água, 3 mL de hexano e 300 mg de sulfato de sódio. Esta preparação foi agitada e posteriormente deixada em repouso e, então 1 µL do sobrenadante foi coletado e injetado em aparelho de cromatografia gasosa (CG) (model 6890 N; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) para obtenção de picos individuais de FAME. A CG foi equipada com detector de ionização de chama e uma coluna capilar polar (HP88, diâmetro interno 0,25 mm, comprimento 100 mm, espessura de filme 0,25 mm). A temperatura do injetor foi de 225 °C e do detector de 285 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 160 °C, mantida por 3 minutos, e então aquecida a 190 °C a um ritmo de 5 °C por minuto, por 6 minutos, quando a temperatura foi elevada a 230 °C a um ritmo de 6 °C/min por 12 minutos. Picos individuais de FAME foram identificados ao se comparar seus tempos de retenção com padrões de FAME (C8-C22, pureza 99%, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Para controle adicional, um *spike* foi feito nas amostras com undecanoato de metila, como padrão interno. As leituras foram realizadas utilizando ChemStation A09.01 (Agilent Technologies Inc).

4.7.3. *Determinação da estabilidade térmica de óleos da polpa e da semente de canjiqueira*

Os óleos da polpa e da semente de canjiqueira foram analisados quanto sua estabilidade térmica em instrumento de termogravimetria (TG), modelo Q50 (TA Instruments, USA). Aproximadamente 5 mg de amostra foi utilizada para cada análise, utilizando cadinhos de platina para suporte. A rampa de aquecimento foi ajustada para 10 °C/min. A temperatura inicial foi de 25 °C e a final de 900 °C, em atmosfera de ar, com fluxo de purgação de 60 mL/min.

4.4. Preparação do extrato para quantificação de piceatanol em polpa e semente de canjiqueira

O fruto de canjiqueira fresco (815 g) foi despolpado e 429,6 g de polpa e 153 g de semente foram homogeneizadas e secadas individualmente. Para cada porção (polpa ou semente), foi adicionado etanol:água na proporção 70:30 na razão solvente: fruto 4:1 e posteriormente os béqueres foram colocados em banho ultrassônico por 20 minutos para extração de compostos. Esta fração foi separada e uma segunda porção de metanol foi adicionada e o fruto foi recolocado em banho ultrassônico por mais 20 minutos. O extrato foi concentrado em reotaevaporador e posteriormente liofilizados industrial Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ, Osterode am Harz, Germany) para evitar que incorporassem umidade. O rendimento do extrato da polpa foi de 3,28 % e da semente de 2,53 %.

4.4.1. Identificação de piceatanol em extrato de polpa e semente de canjiqueira

Para a determinação de piceatanol em sementes e da polpa do fruto de *B. cydoniifolia*, 2 µL (1 mg/mL) do extrato de cada amostra foram analisados em aparelho de cromatografia líquida ultra rápida (UFLC) LC-20AD (Shimadzu) acoplado em um detector de matriz de diodos (DAD), sendo acoplado ao espectrômetro de massas MicroTOF-Q (Bruker Daltonics) com ionização por eletrospray (IES). Para as análises foi utilizada coluna C-18 (Kinetex, 2,6 µ, 150x2.2 mm) protegida por uma pré-coluna de mesmo material. Todas as amostras foram previamente filtradas em filtros de PTFE 0,22 µm antes de serem injetadas no sistema cromatográfico. A fase móvel utilizada foi composta de água ultrapura (solvente A) e acetonitrila (solvente B) e o perfil de eluição de gradiente foi o seguinte: 0-2 min -3% de B; 2-25 min- 3-25% de B; 25-40 min- 25-80% de B seguido de lavagem e condicionamento da coluna (8 minutos). As análises foram realizadas monitorando o comprimento de onda de 240-800 nm e espectrômetro de massa operou em modo negativo e positivo (m/z 120-1200) e o fluxo foi de 0,3 mL/min.

A identificação de piceatanol das sementes e do fruto de *B. cydoniifolia* foi realizada por meio do tempo de retenção, espectro de ultravioleta (UV), padrão de fragmentação por espectrometria de massas por IES comparação com padrões autênticos.

4.5. Preparação do extrato do fruto integral, utilizados nos testes animais, atividade antioxidante, fenóis e taninos

O extrato dos frutos de *B. cydoniifolia* foram obtidos usando a metodologia de percolação descrita na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (FROTA; NAZÁRIO; SAURBRONN, 1959). Foram utilizados 4.820 kg de frutos de *B. cydoniifolia* para a realização da percolação, com rendimento de 2.24 %. A amostra foi intumescida com etanol por 12 horas e, posteriormente, foi montada a coluna para a percolação com sílica e etanol 70% como solvente extrator. Após montar o sistema, o controle foi acertado para 20 gotas por minuto durante 48 horas. Os extratos assim obtidos foram concentrados em rotaevaporador (Buchi, New Castle, Estado Unidos) e posteriormente liofilizados industrial Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ, Osterode am Harz, Germany). para evitar que incorporassem umidade.

4.5.1. Identificação de piceatanol em extrato do fruto integral de canjiqueira

A quantificação do *trans*-piceatannol no extrato do fruto de *B. cydoniifolia* foi realizada seguindo a metodologia proposta por Santos et al. (2017) a partir da curva de calibração do padrão do *trans*-piceatannol, que utilizou as seguintes concentrações: 0.39; 0.78; 1.56; 3.12; 6.25; 12.5; 25; 50; 100; 200 µg/mL. A quantificação foi realizada em HPLC-DAD em coluna de fase reversa C-18 monolítica Onyx/Phenomenex, dimensões 100x3mm contendo pré-coluna com o mesmo material utilizando como fase móvel água deionizada (Fase A) e acetonitrila (Fase B) e o gradiente isocrático do perfil de eluição de 0-16 min 30% de B. O fluxo foi ajustado para 1.2 mL/min.

4.5.2. Atividade antioxidante - método DPPH

Para análise de atividade antioxidante foi utilizado o método de sequestro do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Foram feitas modificações em relação ao método original de Brand-Williams; Cuvelier e Berset, (1995). Solução de DPPH foi preparada em metanol 80 %, em vez de 100 %. A utilização de metanol 80 % tem a vantagem de reação a uma velocidade mais rápida para alguns compostos, como o BHA e o BHT e menores perdas por evaporação. As leituras foram realizadas utilizando o equipamento Varioskan Lux (Thermo Scientific, Massachusetts, US) após 30 minutos de incubação utilizando filtro de 520 nm. Foram adicionados 22 µL de amostra e 200 µL de solução de DPPH a um poço da placa de microtitulação de 96 poços de fundo chato. As amostras foram preparadas em triplicata para cada concentração utilizada (0,23 mg/ml – 15 mg/ml), e foram utilizadas pelo menos sete concentrações diferentes. A placa foi coberta e deixada no escuro em temperatura ambiente em temperatura controlada de 22 °C. A atividade antirradical foi definida pelo valor inicial do *slope* em unidades de mg de amostra/mg de DPPH, isto é, a quantidade necessária em mg de amostra necessária para inibir 1 mg da oxidação do radical DPPH. A concentração de DPPH foi inicialmente determinada a partir da equação da curva de calibração dada por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995).

4.5.3. Quantificação de compostos fenólicos

A quantificação de compostos fenólicos foi determinada por Folin-Ciocalteu, que envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos da amostra com formação de um complexo azul, detectada 760 nm. O extrato hidroetanólico foi dissolvido em metanol 80%, a fim de se obter concentração de 0,25 mg/ml e posteriormente analisado utilizando-se o reagente Folin-Ciocalteu. A quantidade final de extrato foi quantificada

por meio de curva padrão preparada com ácido gálico e expressas com equivalentes de ácido gálico (EAG)/g do fruto. Para a reação colorimétrica foi adicionada uma alíquota de extrato (concentração 0,25 mg/ml) e adicionada 2,5 ml de solução aquosa do reativo de Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 ml de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada a 55°C em banho-maria por 5 minutos, as análises foram realizadas em triplicata e a leitura foi realizada em cubeta de quartzo em espectrofotômetro (Biochrom, Cambridge, United Kingdom). (ROESLER et al., 2007).

4.5.4. *Quantificação de taninos*

A quantificação de taninos foi realizada por meio da metodologia de Folin-Denis. O extrato hidroetanólico foi dissolvido em metanol 80%, obtendo a concentração de 0,25 mg/ml e posteriormente analisados utilizando-se o reagente de Folin-Denis. A quantidade final de cada extrato foi quantificada por meio de curva padrão preparada com ácido tânico e expressas com equivalentes de ácido tânico (EAT)/g do fruto. Para a reação colorimétrica, foram utilizados 0,5 ml de extrato das amostras, adicionados de 8,0 ml de água destilada, 0,5 ml do reativo de Folin-Denis e 1,0 ml de solução de carbonato de sódio saturado a 35%. As análises foram realizadas em triplicata e as leituras foram realizadas após 30 minutos com faixa de absorvância de 765 nm em cubeta de quartzo em espectrofotômetro (Biochrom, Cambridge, United Kingdom). Uma mistura de água destilada (8,0 ml), Folin-Denis (0,5 mL) e carbonato de sódio saturado (1,0 ml) foi utilizada como branco para referência. (BRASIL, 2005).

4.6. Ensaio experimental

O presente projeto foi submetido e aprovado sob número de parecer 807/2016 pela avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) PROPP/UFMS, a qual se fundamenta em: Princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei 6638 sobre Normas para Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais, Princípios Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (CIOMS), Genebra, 1985; Declaração Universal dos Direitos Animais (UNESCO), Bruxelas, Bélgica.

4.6.1. *Teste de toxicidade aguda*

Para o teste de toxicidade aguda do extrato hidroetanólico de frutos integrais de canjequeira, foram utilizados ratos adultos (28 dias) da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, do sexo feminino, distribuídos em dois grupos (n=5). Os animais

foram mantidos em jejum de 4 h antes do experimento. O grupo controle recebeu salina, enquanto o grupo tratado recebeu extrato de canjiqueira na concentração de 2000 mg/kg, conforme protocolo descrito (BUSCHMANN, 2013). A oferta de salina e de extrato de canjiqueira ocorreu via gavagem. Após a administração dos tratamentos os animais foram mantidos em dieta comercial e oferta hídrica *ad libitum*. Os animais tiveram seu comportamento observado aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos e seus parâmetros avaliados de acordo com o *screening* hipocrático (BUSCHMANN, 2013).

4.6.2. Ensaio biológico

Foram utilizados camundongos adultos (21 dias) (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss*, do sexo masculino, fornecidos pelo Biotério Central da UFMS. Os animais foram alojados em gaiolas, agrupados em pares ou trios, e mantidos sob condições de ciclo de luz controlado claro-escuro (12/12h) e temperatura de 24 ± 1 °C. O consumo de água e dieta foi sob sistema de livre acesso, *ad libitum*. Foram utilizados 58 animais, separados em 4 grupos, descritos a seguir:

Controle *sham*: Animais eutróficos que receberam dieta AIN 93M isocalórica elaborada segundo protocolo de Reevis, Nielsen e Fahey (1993) (n=14);

High fat: Animais que receberam dieta *high fat* para indução de obesidade e síndrome metabólica, elaborada segundo protocolo de Rosini, Silva e Moraes (2012) (n=14).

CAN 150: Animais que receberão dieta *high fat* para indução de obesidade e síndrome metabólica, elaborada segundo protocolo de Rosini, Silva e Moraes (2012) (n=15) com suplementação do extrato de fruto integral de canjiqueira (150 mg/kg).

CAN 300: Animais que receberam dieta *high fat* para indução de obesidade e síndrome metabólica, elaborada segundo protocolo de Rosini, Silva e Moraes (2012) (n=15) com suplementação do extrato de fruto integral de canjiqueira (300 mg/kg).

Todas as dietas foram elaboradas pela empresa PragSoluções, com as seguintes formulações na dieta AIN 93 e dieta High Fat (Tabela 5):

Tabela 5. Formulação das dietas ofertadas aos animais em estudo experimental

	Controle <i>sham</i>	<i>High fat</i>
Ingrediente	Quantidade aproximada (g/1000 g)	
Amido de milho	465,69	116,00
Sacarose	100,00	100,00
Maltodextrina/amido dextrinizado	155,00	132,00
Celulose	50,00	50,00
Caseína comercial	140,00	200,00
Óleo de soja	40,00	-
Banha	-	312,00
Mix mineral AIN – M	35,00	35,00
Mix vitamínico	10,00	10,00
L-cistina	1,80	3,00
Bitartarato de colina	2,50	2,50
Tertbutilhidroquinona	0,008	0,008
Total	999,998	1000,25

As dietas apresentam importante diferença em suas formulações e, respeito aos macronutrientes. Enquanto a dieta AIN 93 possui 72% de carboidratos, 14,73% de proteínas, 9,47% de lipídeos e 5% de fibras, a dieta *High fat* foi formulada contendo 34,80% de carboidratos, 20% de proteínas, 35,20% de lipídios e 5% de fibras.

Os animais foram mantidos com as respectivas dietas por 2 meses, período para indução da obesidade e síndrome metabólica em roedores (Grupos Controle, *High fat*, CAN 150 e CAN 300), e em seguida tratados por 30 dias com água (grupos 1 e 2) e com extrato (grupos 3 e 4) via gavagem.

4.6.3. Parâmetros morfométricos

A avaliação do peso corporal dos animais foi verificada semanalmente em balança semi-analítica (Marca Marte-Modelo AS 5.500). O grau de obesidade foi avaliado, visto que o peso corporal está relacionado ao tamanho do animal. Para cálculo foi utilizado índice de Lee [(peso corporal^{1/3} (g)/ comprimento naso anal (cm))x1000] (BERNARDIS & PATTERSON, 1968).

4.6.4. Consumo alimentar

A avaliação do consumo alimentar dos animais foi realizada por diferença da quantidade ofertada de ração e a sobra de ração no dia seguinte. Foi mensurada a quantidade restante de alimento em cada gaiola, podendo-se avaliar o consumo pela diferença de peso da ração oferecida no dia anterior por animal (DE LUCA, ALEXANDRE & MARQUES, 1996).

4.6.5. Teste de tolerância à glicose

Uma semana antes da eutanásia os animais foram mantidos em jejum de 6 h, e uma aferição de glicemia foi realizada no tempo zero. Uma dose de 2 g/kg de solução de glicose foi administrada via gavagem e as glicemias foram aferidas utilizando glicosímetro portátil (G-Tech Free, Infopia Co, Ltda, Coreia do Sul) nos tempos 15 minutos, 30 minutos, 1h e 2h após a administração da glicose. Para verificação da tolerância à glicose, esses valores foram usados para construção de uma curva (tempo zero a 2h) e a área sob a curva foi realizada (SANTOS et al., 2008b).

4.6.6. Teste de desafio com insulina

Cinco dias após o teste de tolerância à glicose os animais foram mantidos em jejum de 6 h, e uma aferição de glicemia foi realizada no tempo zero utilizando glicosímetro portátil (G-Tech Free, Infopia Co, Ltda, Coreia do Sul). Uma dose de 0,75 UI/kg de insulina (NovoRapid 100 UI/mL, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) foi administrada via intraperitonal e as glicemias foram aferidas nos tempos 15 minutos, 30 minutos e 1h após a administração da insulina. Para verificação da tolerância à insulina, esses valores foram usados para construção de uma curva (tempo zero a 1h) e a área sob a curva foi realizada (SANTOS et al., 2008b).

4.6.7. Eutanásia e coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada ao final do experimento, no momento da eutanásia. Os animais foram sedados com anestésico inalatório Isoflurano. A veia cava foi puncionada e foi coletada a maior parte de sangue possível (~1 mL) sob efeito anestésico e depositadas em microtubo âmbar com gel separador. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos e então o soro foi transferido para criotubos, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas sob refrigeração em biofreezer (-80 °C) até o momento das análises de parâmetros bioquímicos (colesterol total e frações, triglicerídeos e glicose), e histologia do fígado, avaliados com finalidade de verificar descompensação metabólica.

Após indução anestésica e coleta de sangue a eutanásia foi confirmada em câmara de CO₂. Os animais foram descartados em locais adequados sob orientação de técnicos especializados do Biotério Central da UFMS.

4.6.8. Determinação de Colesterol Total

A coleta do fígado foi realizada imediatamente após a eutanásia e os órgãos foram preservados em solução de formol 10%.

4.6.9. Determinação de Colesterol Total

Os ésteres de colesterol são hidrolisados pelo colesterol esterase (CHE-Lipase de origem fúngica) formando colesterol livre, que após oxidação pelo colesterol oxidase formam peróxido de hidrogênio. Desta forma, o substrato reage em presença da peroxidase, e origina um cromóforo de coloração cereja. A absorbância máxima é de 505 nm, diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra (FLEG, 1973).

4.6.10. Determinação do Colesterol-HDL

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) se separa precipitando seletivamente as lipoproteínas de baixa densidade e muito baixa densidade (LDL e VLDL) mediante acréscimo de Sulfato de Dextran de PM 500.000 em presença de Mg⁺⁺ (cloreto de magnésio), ou utilizando ácido fosfotungstico e cloreto de magnésio. No sobrenadante separado por centrifugação, ficam as HDL e foi realizada a determinação do colesterol ligado, empregando-se o sistema enzimático Colesterol/ Oxidase/ Peroxidase com colorimetria Trinder (fenol/4-amino-fenazona) (FLEG, 1973).

4.6.11. Determinação do Colesterol-LDL e Colesterol-VLDL

As concentrações dos colesterolos VLDL e LDL foram calculadas utilizando a equação de Friedwald que é exata para amostras cuja concentração de triglicerídios não ultrapasse 400 mg/dL (FLEG, 1973). O cálculo para determinação das frações foi feito da seguinte forma:

$$1- \text{Colesterol-LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

$$2- \text{Colesterol VLDL} = \text{Triglicerídeos}/5$$

4.6.12. Determinação de Triglicerídeos

Os triglicerídeos são desdobrados em glicerol e ácidos graxos mediante ação da enzima lipase. O glicerol produzido foi determinado de forma enzimática por meio de uma sequência de reações que inclui a fosforilação a glicerol-1-fosfato em presença da enzima glicerol-quinase e oxidação por ação da enzima glicerolfosfato oxidase, com produção de água oxigenada (peróxido de hidrogênio). A absorbância máxima é em 505 nm, diretamente proporcional à concentração de triglicérides na amostra (HAGEN & HAGEN, 1962).

4.6.13. Determinação de Glicose (POD-GOD)

A glicose é oxidada enzimaticamente sob ação da glicose oxidase (GOD), formando ácido glucônico e água oxigenada. A água oxigenada formada reage sob ação catalizadora da peroxidase, que reage como doador de hidrogênio com 4-aminofenazona e fenol. Dessa reação oxidativa forma-se como produto antipirilquinonimina de coloração cereja com absorbância máxima em 505 nm, cuja intensidade de cor é proporcional a concentração de glicose (CAREY, FELBRUEGGE & WESTGARD, 1974).

A determinação dos parâmetros bioquímicos foi realizada utilizando kits para determinação Labtest®.

4.10. Análise histológica

Para a avaliação histológica, o fígado, após 12 horas de fixação em solução de Bouin foram submetidos ao processamento histológico até a obtenção de cortes de 5 µm de espessura que foram corados em Hematoxilina/Eosina (HE) e Tricômio de Masson e analisados em microscópio de luz. A análise foi baseada nas alterações morfológicas quanto à diversos parâmetros, como vasodilatação, hiperemia, infiltrado leucocitário,

fibrose e necrose. Para cada parâmetro foram atribuídos escores: 2 – ausência de lesão, morfologia padrão; 4 – grau leve: esteatose microvesicular e macrovesicular difusa em alguns lóbulos hepáticos (zonas 2 e 3), com muitos hepatócitos apresentando morfologia padrão (principalmente na zona 1); 6 – grau moderado: esteatose micro e macrovesicular difuso na maioria dos lóbulos hepáticos (zonas 2 e 3), com poucos hepatócitos apresentando morfologia padrão (principalmente na zona 1); 8 – grau intenso: esteatose microvesicular e macrovesicular difusa pelos lóbulos hepáticos (zonas 1, 2 e 3), determinando a intensidade para cada lesão encontrada. Para leitura foi utilizado microscópio Leica DM 500, com lente objetiva com aumento de 20x e 40 x, metodologia adaptada de Heritage et al., (2017).

Além disso, para determinação do infiltrado leucocitário, as células inflamatórias presentes no tecido foram quantificadas e qualificadas de acordo com os aspectos morfológicos nucleares e classificadas em mononucleares ou polimorfonucleares. Foram contadas 100 células e o resultado expresso em % de cada tipo celular. Os cortes histológicos foram analisados utilizando um microscópio e câmera fotográfica para captura das imagens.

4.11. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Foi realizado teste para verificação de distribuição normal, e sendo constatada essa distribuição, foi realizada a análise de variância com aplicação de ANOVA de uma via; e com resultado significativo, aplicado teste de normalidade com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias. Em caso de constatação de distribuição não normal foi aplicado posteriormente teste de Kruskal-Wallis com aplicação de pós-teste de Dunn.

Para a análise histológica, os resultados foram analisados de acordo com valores de mediana; utilizando teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição química

Os resultados de composição centesimal da polpa da canjiqueira (parte comestível) estão representados na Tabela 6.

Tabela 6. Composição centesimal da polpa da canjiqueira (g/100 g)

Composição centesimal	g/100 g
Proteínas	1,07 ± 0,04
Carboidratos	5,97 ± 0,17
Lipídios	3,77 ± 0,00
Fibras totais	12,29 ± 0,02
Fibras solúveis	11,61 ± 0,02
Fibras insolúveis	0,68 ± 0,01
Cinzas	0,72 ± 0,06
Umidade	79,45 ± 0,49
Calorias (kcal/100 g)	62,09

Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP).

Os valores de proteínas, lipídios, cinzas e umidade estão de acordo com os descritos por Prates et al., (2015), com $1,33 \pm 0,08$ para proteínas, $3,45 \pm 0,01$ para lipídios, $0,99 \pm 0,02$ para cinzas e $75,38 \pm 0,25$ para umidade. Os autores não determinaram carboidratos ou fibras.

Pequenas diferenças de composição podem estar relacionadas a diferentes fatores externos como clima, solo, altitude, exposição solar, como já demonstrado em outros vegetais e produtos derivados de vegetais, como o vinho (DE OLIVEIRA et al., 2019; ROSENFELD; BAARDSETH; SKREDE, 1997).

De acordo com as recomendações em relação à classificação dos alimentos quanto aos seus nutrientes, de acordo com a FDA, uma porção de fruta para a recomendação diária de carboidratos e proteínas não é significativa em relação à RDA

(*Recommended Daily Allowence*), para um adulto de 70 kg. Não há RDA ou AI (*Adequate Intake*) específica para o total de gorduras consumidas (YON; JOHNSON, 2005), o quantitativo de fibras derivados do consumo de frutas é extremamente importante. As recomendações de consumo de fibras variam entre 21 -38 g/dia, dependendo do sexo e idade do indivíduo (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2000). Desta forma, o consumo de uma porção de canjiqueira, inclui cerca de 50 % deste aporte de fibras esperado.

O conteúdo de minerais foi comparado com as DRI (RDA, AI e UL) em relação à sua quantidade. As DRI são fontes de comparação confiáveis, usada para avaliar se as dietas provêm a quantidade necessária de nutrientes, sem ser excessiva (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2000).

Os minerais detectados na semente e polpa da canjiqueira pela técnica de espectroscopia de emissão óptica (ICP OES) estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7. Composição mineral da polpa e semente de frutos de canjiqueira (*B. cydoniifolia*) (mg/100 g) em relação às recomendações DRI

Elemento	Polpa	% em relação à DRI	Semente	% em relação à DRIs	DRI (RDA/AI*)
Al	<LOD	NA	<LOD	NA	NA
Ca	295,56 ±	24,63 –	381,36 ±	31,78 –	1000 - 1200
	3,92	29,56	3,92	38,14	
Co	<LOD	NA	<LOD	NA	NA
Cu	0,30 ± 0,02	33,33	0,78 ± 0,05	86,66	0,9
Fe	1,89 ± 0,09	10,50 –	4,24 ± 0,79	23,56 – 53	8 - 18
		23,63			
K*	1507,15 ±	44,33 –	891,16 ±	26,21 –	2600 -
	100,70	57,97	128,67	34,28	3400*
Mg	143,24 ±	34,10 –	151,90 ±	36,17 – 49	310 - 420
	0,40	46,21	32,44		
Mo	<LOD	NA	<LOD	NA	NA
Mn	0,63 ± 0,04	27,39 –	0,90 ± 0,09	39,13 – 50	1,8 – 2.3
		35,00			

Na*	1,08 ± 0,13	0,07	0,74 ± 0,19	0,05	1500*
Se	0,16 ± 0,03	NA	0,18 ± 0,01	NA	NA
Zn	0,48 ± 0,04	4,36 – 6	1,28 ± 0,31	11,64 – 16	8 – 11

DRI – Valores de Referência de Ingestão. AI* – Ingestão adequada. NA – não se aplica. LOD – limite de detecção.

Tanto as sementes quanto a polpa são ricas em cálcio (Ca) em relação às referências da RDA, não sendo tóxicas para nenhum gênero ou grupo de idades, com a semente sendo mais abundante neste elemento. Kumssa et al., (2015), avaliaram a deficiência de Ca em parâmetros globais e, em 2011 detectaram que havia 3,5 bilhões de pessoas com algum nível de deficiência neste mineral. O consumo de Ca foi de 644 ± 3 mg/dia em níveis globais, sendo a África o continente com menores níveis de ingestão. Desta forma, o consumo de alimentos ricos em Ca poderia reduzir os níveis de deficiência de Ca.

A concentração de cobre (Cu) variou de 0,3 mg/100g na polpa a 0,78 mg/100 g na semente, ambos sendo consideradas excelentes fontes deste elemento, sendo que nenhuma parte possui concentração suficiente para causar toxicidade aguda, de acordo com as DRI. O Cu é um elemento essencial necessário em diversas funções como cofator de catalisações ou como componente estrutural de proteínas, com papéis chave em funções biológicas, tais quais, atividade enzimática, transporte de oxigênio e sinalização celular (DENOYER et al., 2015).

O Ferro (Fe) foi encontrado em excelentes concentrações (4,24 mg/100 g na semente e 1,89 mg/100 g na polpa), dentro das referências da RDA, mas não altas o suficiente para causar toxicidade, uma vez que estas concentrações não ultrapassam a UL. A deficiência de Fe é a deficiência nutricional mais comum. Globalmente, uma grande proporção das anemias é causada pela deficiência de Fe, chegando a 64 % na Ásia central, 54% no sul da Ásia e 62% na América Latina Andina (KUMSSA et al., 2015; LOPEZ et al., 2016). Tanto a polpa, quanto a semente apresentam elevadas concentrações de Fe, o que poderia ser estratégico ao enfrentar a anemia.

A polpa é uma excelente fonte de potássio (K) (1507,15 mg/100 g), com a concentração de K na polpa alcançando mais do que 50% do AI, enquanto a semente apresentou concentração mais baixa (891,16 mg/100 g). O excesso da ingestão de K acima da AI é prontamente excretada pela urina em indivíduos saudáveis e não há evidência que o consumo elevado de K provenientes da alimentação possa causar efeitos

adversos nesta população (WHO, 1996), desta forma, a concentração de K na canjiqueira não deve ser uma preocupação de saúde em geral.

Tanto a polpa (143,24 mg/100 g) e semente (151,90 mg/100 g) são excelentes fontes de magnésio (Mg) em relação à RDA. O Mg participa de processos na saúde, participando de funções na fisiologia do cérebro, coração e músculos (DE BAAIJ; HOENDEROP; BINDELS, 2015). Além disso, a suplementação de Mg foi recentemente relacionada a efeitos anti-hipertensivos (ZHANG et al., 2016).

A concentração de manganês (Mn) foi maior na semente (0,90 mg/100 g) do que na polpa (0,63 mg/100 g), ambos sendo excelentes fontes e nenhum deles com concentração suficiente para causar riscos de toxicidade, em relação aos valores da UL. O Mn é essencial à vida humana, requerido nas atividades de diferentes enzimas (como a arginase e glutamina sintase) (HORNING et al., 2015).

Nem a polpa, nem a semente são consideradas boas fontes de sódio (Na) em relação à AI, sendo estas baixas concentrações de sódio comuns em plantas (MILLER-IHLI, 1996).

Tanto a deficiência, quanto o excesso de selênio está relacionado com problemas de saúde. Enquanto baixas concentrações de consumo de selênio são correlacionadas com a virulência viral, câncer de próstata, elevado índice de mortalidade e disfunções autoimunes da tireóide, o excesso deste mineral se relaciona com o risco de DM2, risco do câncer de próstata, alopecia, dermatite e risco de mortalidade (RAYMAN, 2017, 2020). A deficiência de selênio ocorre com maior frequência do que a deficiência, no entanto, a exposição prolongada de altas doses de consumo de selênio, ou seja, superior a 200 µg/ dia, é relacionado com os sintomas supracitados de excesso de selênio (RAYMAN, 2020). Geralmente este consumo elevado decorre da suplementação de selênio. De qualquer forma, tanto polpa, quanto semente de canjiqueira possuem altas quantidades de selênio (160 and 180 µg/100 g, respectivamente), e portanto, o uso prolongado de ambas as partes da fruta deve ser monitorado.

Apenas a semente pode ser considerada uma boa fonte de zinco, enquanto a polpa não é rica neste elemento. Nenhuma das partes pode provocar um risco de toxicidade aguda. O zinco é um elemento crucial na integridade celular, participando de processos de divisão celular, crescimento e desenvolvimento (WESSELS; MAYWALD; RINK, 2017). Os efeitos adversos mais proeminentes da deficiência de

zinco são a imunidade mediada por células diminuída, deficiência das funções cognitivas, estresse oxidativo aumentado e regulação para cima da produção de citocinas inflamatórias (PRASAD, 2017).

As concentrações de alumínio, cobalto e molibdênio estão abaixo dos limites de detecção.

A composição de ácidos graxos (AG) da polpa e da semente está demonstrada na Tabela 8. Doze AG foram identificados, entre eles, a concentração de ácidos graxos saturados (AGS) foi de 37,1 % na polpa e 24,6 % na semente.

Tabela 8. Distribuição de ácidos graxos em polpa e semente de *B. cydoniifolia*

Ácido graxo (%)	Polpa	Semente
Ácidos graxos saturados		
C10:0 –Ácido caprílico	0,2 ± 0,02	0,1 ± 0,01
C12:0 –Ácido láurico	0,4 ± 0,03	0,3 ± 0,02
C14:0 –Ácido mirístico	0,6 ± 0,02	0,4 ± 0,02
C16:0 –Ácido palmítico	30,8 ± 0,31	18,2 ± 0,34
C18:0 –Ácido esteárico	4,2 ± 0,04	4,9 ± 0,10
C20:0 –Ácido araquidônico	0,8 ± 0,03	0,5 ± 0,04
C22:0 –Ácido beénico	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,02
Total	37,1	24,5
Ácidos graxos monoinsaturados		
C16:1 –Ácido palmitoléico	1,4 ± 0,06	0,65 ± 0,02
C18:1 –Ácido oleico	47,6 ± 0,35	39,3 ± 0,30
C20:1 - Cis-11-ácido eicosanóico	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,01
Total	49,2	40,3
Ácidos graxos poli-insaturados		
C18:2 –Ácido linoleico	8,5 ± 0,00	31,7 ± 0,11
C18:3n3 –Ácido linolênico	0,5 ± 0,01	0,2 ± 0,01
Total	9,0	31,9

Resultados expressos em média ± desvio padrão

O consumo de AGS está relacionado ao aumento da concentração de LDL no sangue, um típico exemplo de dislipidemia (HAMMAD; PU; JONES, 2016; ZELMAN, 2011), estabelecido como fator de risco para doenças coronarianas isquêmicas (CROMWELL et al., 2007). No entanto, os AGS parecem agir em diferentes intensidades neste contexto lipidêmico. O ácido mirístico (C14:0) é mais potente em elevar os níveis de LDL, seguido pelo ácido láurico (C12:0) e ácido palmítico (C16:0) (SACKS; KATAN, 2002).

O principal AGS e ambas as partes foi o ácido palmítico, contando por 30,7 % na polpa e 18,2 % na semente, do total dos AG. O óleo da polpa da canjiqueira possui maior quantidade dos AGS palmítico, mirístico e láurico do que o óleo da semente da canjiqueira. O quantitativo de AG palmítico é quase o dobro na polpa do que na semente. Estes dados demonstram que o óleo da semente da canjiqueira pode ser mais benéfico do que o óleo da polpa da canjiqueira.

O óleo da polpa apresenta elevada concentração de ácido oleico, o principal ácido graxo monoinsaturado (AGMI). O conteúdo de AGMI é bastante similar em ambas as partes da fruta, 40,3 % na semente e 49,2% na polpa. Enquanto o óleo da polpa da canjiqueira apresenta menor concentração de ácido oleico que a polpa de abacate, conhecido por seu alto teor de ácido oleico com 64,43 %, o óleo da semente da canjiqueira é mais rico em ácido oleico do que a semente do abacate com 17,41 % (BORA et al., 2001).

O papel dos AGMI na saúde está associado ao ácido oleico, o que inclui redução da pressão arterial (CALDER, 2015) e pode melhorar a sensibilidade à insulina e o controle de glicemia (SILVA FIGUEIREDO et al., 2017); além de efeitos cardioprotetores, como a redução de LDL e do nível total de triglicerídeos, e do aumento lipoproteínas de alta densidade (HDL) (KRIS-ETHERTON et al., 1999, 2008). No entanto, tais efeitos do ácido oleico foram observados na substituição de AGS, que está relacionado a dislipidemias em diversos estudos. Portanto, os resultados ainda não são claros (CALDER, 2015).

A polpa e a semente apresentaram diferentes concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), representando 9 % no total de AG na polpa e 31,9 % na semente. O AGPI de maior concentração foi o ácido linoleico (AL) (C18:2 n-6) na polpa e na semente. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Berto et al (2015) em frutas amazônicas, com o AL sendo o de maior predominância. O AL é o principal representante da família conhecida como AGPI n-6, que podem ser alongadas e dessaturadas a outros compostos da série AGPI n-6, como o ácido γ -linolênico (C18: 3 n-6) e o ácido araquidônico (C20: 4 n-6) (WHELAN; FRITSCH, 2013). Subsequentemente, o ácido araquidônico (AA) pode ser convertido em diversos compostos bioativos chamados de eicosanoides, como prostaglandinas e leucotrienos, essenciais na manutenção do metabolismo das membranas celulares e tecidos, quando

consumidos em quantidades adequadas (LAI et al., 2015; WHELAN; FRITSCH, 2013).

Embora esta via metabólica possa ocorrer, o consumo elevado de AGPI e de óleos ricos em AGPI foram relacionados com níveis plasmáticos de ácido α -linolênico e não de AA. Por outro lado, a ingestão de carnes esteve favoreceu níveis plasmáticos de AA, o que indica que a ingestão de AA pré-formado é mais determinante para elevados níveis de AA plasmáticos do que a ingestão de LA (SEAH et al., 2017).

Considerando a aplicação tecnológica do óleo de canjiqueira, um perfil insaturado do óleo pode ser benéfico a saúde no consumo do óleo cru. No entanto, ao utilizar os óleos como método de cocção, alguns fatores devem ser observados, uma vez que a elevação da temperatura dos óleos, especialmente em processos de fritura e no processo de refogar geram produtos como peróxidos e aldeídos reativos (LEUNG et al., 2018). Portanto, óleos com perfil insaturado (tanto mono, quanto poli) e com elevada estabilidade térmica são de alto interesse industrial e de saúde.

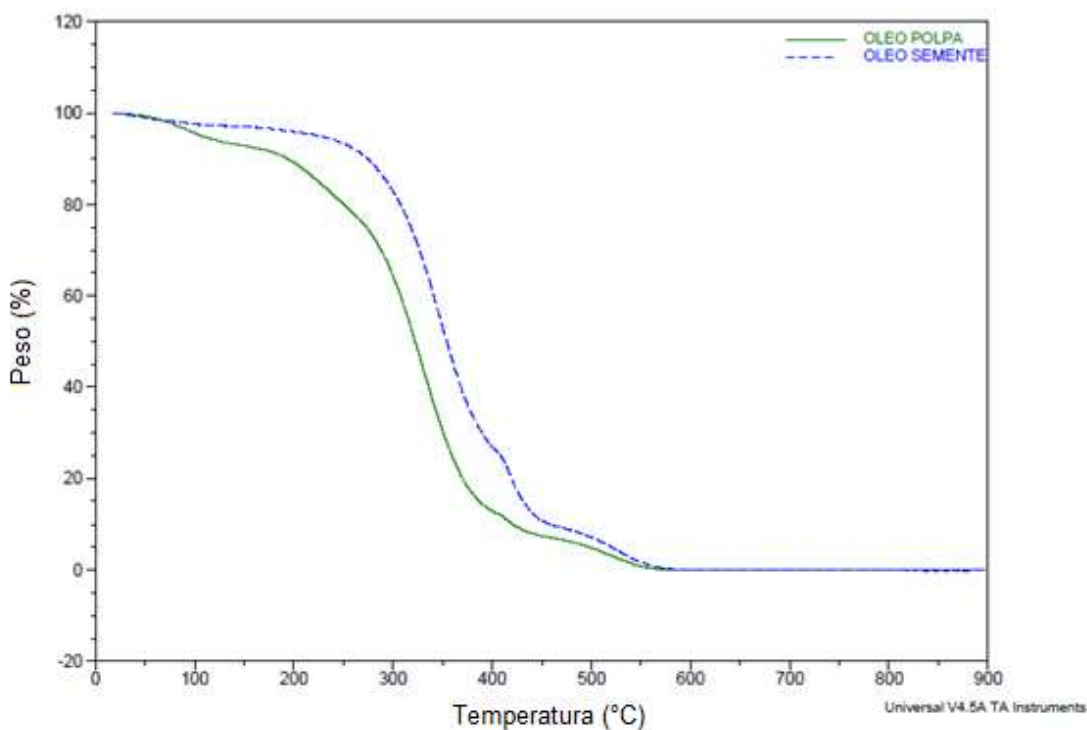
5.2. Análise de estabilidade térmica dos óleos da polpa e da semente de canjiqueira

A termogravimetria (TG) foi selecionada para avaliar a estabilidade dos óleos da canjiqueira, uma vez que é utilizado como instrumento de pesquisa para avaliar a resistência de óleos e gorduras à oxidação e então, predizer o início da oxidação em um menor período de tempo em comparação com a técnica tradicional de envelhecimento em forno, que poderia levar meses (ENDO; HOSHIZAKI; FUJIMOTO, 1997).

Do ponto de vista analítico e tecnológico, a alta presença de ácidos graxos saturados é relacionada com maior estabilidade à oxidação lipídica, enquanto a presença de insaturações, especialmente de AGPI é mais suscetível aos processos oxidativos (LI et al., 2013). O processo de oxidação é relacionado com o surgimento de sabores de rancificação, devido a deterioração de compostos voláteis (MORALES; RIOS; APARICIO, 1997).

No entanto, mesmo com a maior concentração de ácidos graxos saturados no óleo da polpa do que no óleo da semente, e conseqüentemente, menor concentração de ácidos graxos insaturados, o óleo da semente apresentou-se mais estável do que o óleo da polpa (Figura 4), uma vez que, quanto mais tardia a perda de peso na análise termogravimétrica, maior estabilidade o óleo demonstra.

Figura 4. Estabilidade térmica dos óleos da polpa e da semente da canjiqueira analisados por termogravimetria



As características de óleos comestíveis são afetadas pela presença e concentração de metais traço, que são utilizados para avaliar sua qualidade. Metais polivalentes como Cu, Fe, Mn e Ni são capazes de aumentar a oxidação de lipídios (CHOE; MIN, 2007). Embora a semente seja mais concentrada em Fe e Cu, o óleo da semente é mais resistente à oxidação, independente da presença de metais de transição e da presença de insaturações em sua composição.

O óleo da polpa apresentou quatro principais picos de degradação na análise térmica (Figura 5), enquanto o óleo da semente apresentou três principais picos de degradação (Figura 6). Os dois primeiros picos no óleo da polpa e o primeiro pico no óleo da semente, com temperatura inicial de degradação entre 100 – 200 °C estão relacionados com a perda de umidade e da volatilização de aldeídos, cetonas e ácidos graxos de cadeia curta (GARCIA et al., 2007). Outros picos, com temperatura de degradação superior a 200 °C estão relacionados com a composição química do óleo e seu perfil de saturação (DEL RÍO et al., 2016).

Figura 5. Degradação térmica do óleo da polpa de canjeira avaliada por termogravimetria

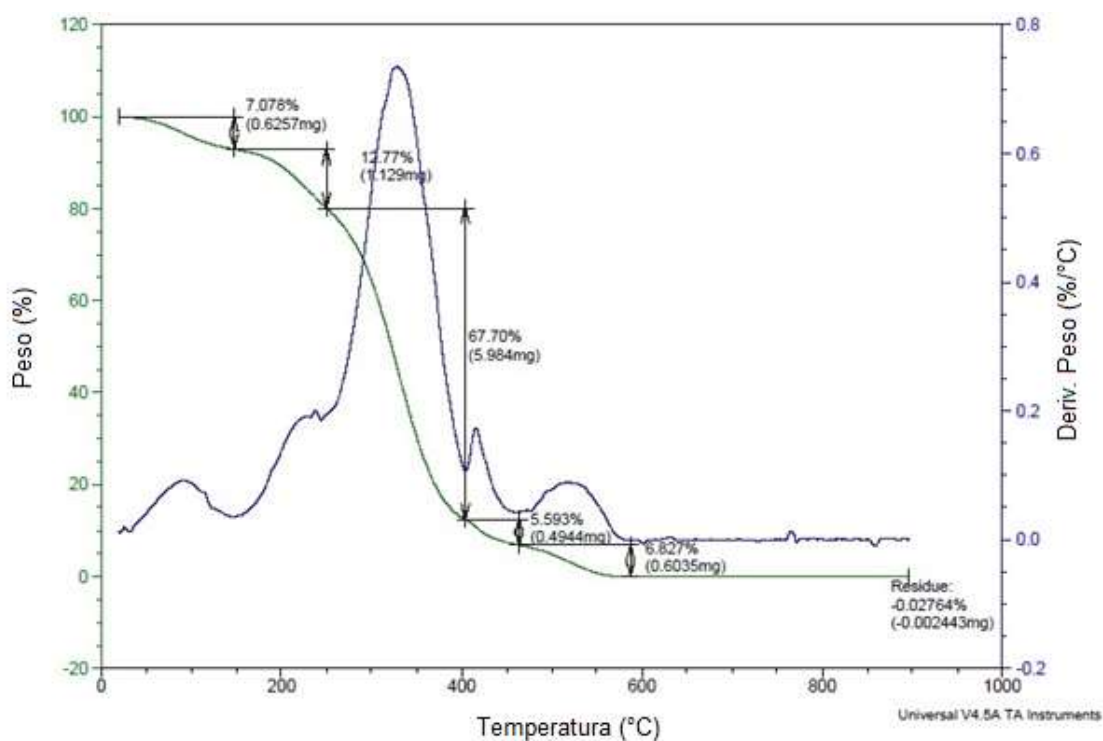
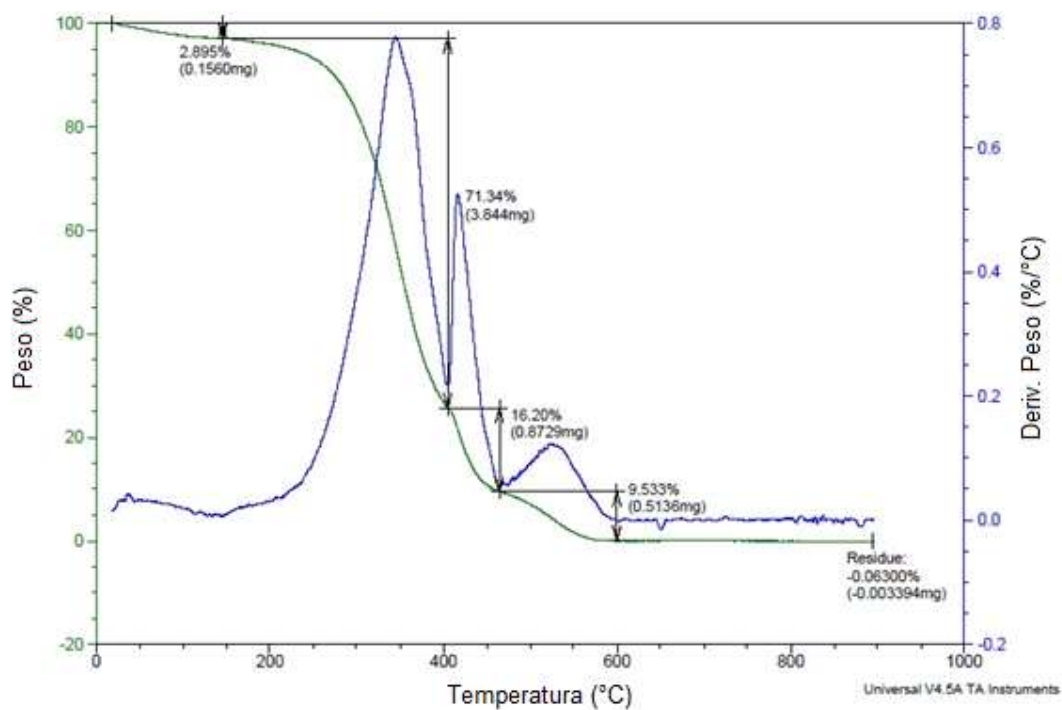


Figura 6. Degradação térmica do óleo da semente de canjeira avaliada por termogravimetria



Umas das possíveis explicações para estabilidade térmica superior do óleo da polpa da canjiqueira reside no fato de, embora o óleo da polpa possuir um perfil mais saturado, é bastante rico em ácidos graxos saturados de cadeia média, o que torna o óleo mais susceptível à degradação térmica (MELO et al., 2019).

No entanto, também é possível argumentar que o uso de antioxidantes em óleos comestíveis possui a habilidade de proteger ácidos graxos insaturados, aumentando sua estabilidade à degradação térmica que comumente ocorre em temperaturas entre 150 – 220 °C (REDA, 2011).

Sendo assim, a estabilidade térmica do óleo da semente de canjiqueira pode ser atribuída a outros fatores, como a presença de antioxidantes naturais. O mesmo fenômeno ocorreu em óleo de milho analisado por (SANTOS et al., 2002), que atribuíram a estabilidade do óleo de milho à presença de tocoferol e ácido ferúlico, além de antioxidantes artificiais. A avaliação de atividade antioxidante, bem como a identificação do principal composto bioativo da canjiqueira estão descritos na seção 5.3. (atividade antioxidante).

Considerando os efeitos do consumo de AGS na saúde, e que a redução de seu consumo, com substituição por gorduras insaturadas pode reduzir o número de eventos cardiovasculares (HOOPER et al., 2015); a alta estabilidade térmica do óleo da semente da canjiqueira comparada com o óleo da polpa da canjiqueira pode favorecer o uso culinário de gorduras insaturadas, em vez do consumo de gordura saturada, sem produzir outros riscos de saúde ou o surgimento de sabor de rancidez.

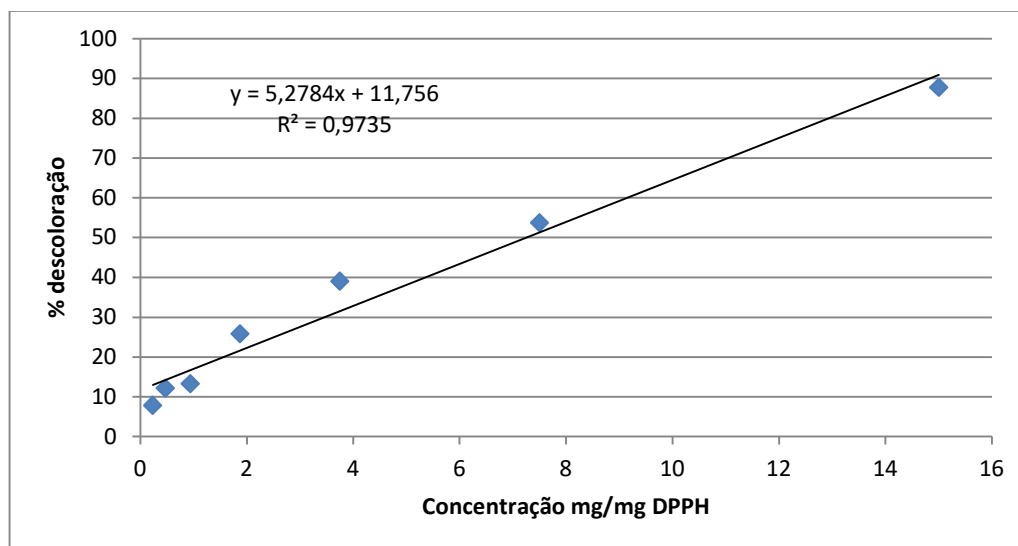
5.3. Atividade antioxidante

5.3.1. Análises DPPH, fenóis totais e taninos

A atividade antioxidante do fruto integral maduro foi testada utilizando o método de sequestro do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), com a capacidade de reduzi-lo (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Um método comum para avaliar a eficiência da capacidade antioxidante de um substrato pelo método DPPH é pela determinação do EC₅₀ (*Efficiency Concentration* – “Concentração de eficiência”) (CHEN; BERTIN; FROLDI, 2013), ou seja, a quantidade necessária deste composto para reduzir a concentração de DPPH em 50 %. Quanto menor a quantidade do composto, maior sua atividade antioxidante será. Os resultados da atividade

antioxidante do extrato hidroetanólico do fruto integral da canjiqueira estão relatados na Figura 7.

Figura 7. Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico do fruto integral de canjiqueira



O EC_{50} do extrato hidroetanólico (30:70 v/v) foi de 7,24 mg/mg DPPH. Estes valores são inferiores aos resultados de Prates et al., (2015), ao encontrarem EC_{50} de 12,83 no extrato hidroetanólico (40:60 v/v) de frutos despulpados e maduros, e muito inferiores aos reportados por Marcelino et al., (2018) com alta capacidade antioxidante em frutos integrais de *B. cydoniifolia*, avaliada pela técnica DPPH (EC_{50} 0,11 mg.L⁻¹) e método ORAC (78,6 μ mol TE.kg⁻¹) em extração metanólica. A composição química dos frutos é afetada por diversos fatores como espécie, variedade, cultivo, região, clima, estágio de maturação, tempo de coleta e condições de armazenamento (DE SOUZA et al., 2014; FANIADIS; DROGOUDI; VASILAKAKIS, 2010). Além disso, o método de extração, bem como a concentração e tipo de solvente afeta a quantidade de bioativos presente no extrato (DENT et al., 2013; SABLANIA; BOSCO; BASHIR, 2019).

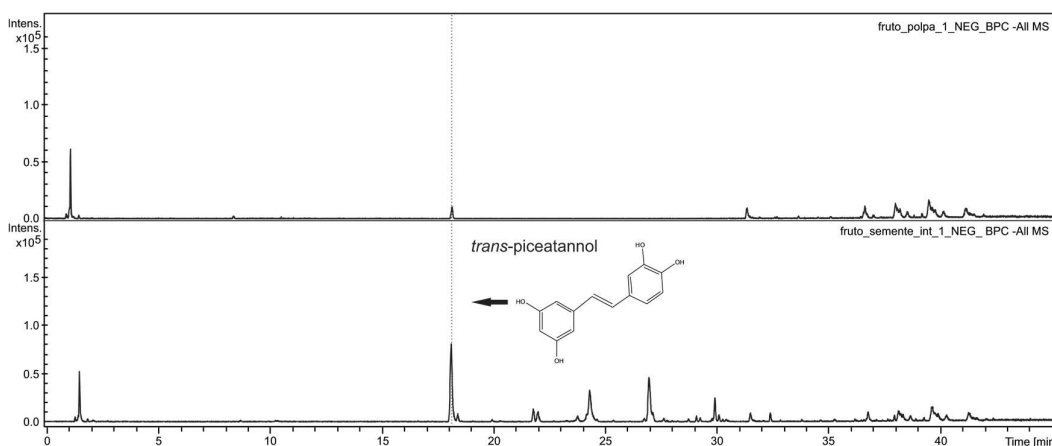
Na determinação de fenóis totais foram encontrados 245,61 mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100g de extrato, enquanto a quantificação de taninos foi de 20 mg de equivalentes de ácido tânico (EAT) por 100 g de extrato. Estes valores diferem dos encontrados por Prates et al. (2015), com achados de 152,57 mgEAG/100g e de 54,81 mgEAT/100g para a polpa de canjiqueira. Por outro lado, Marcelino et al. (2019) detectaram 354 mgEAG/100g de fenóis no fruto integral e 98 mgEAT/100g de taninos.

As diferenças encontradas podem se justificar tanto pela diferença de composição dos frutos (DE SOUZA et al., 2014), como também pelo tempo de armazenagem dos frutos antes da análise. Após estocar grãos e farinha de sorgo por 180 dias em diferentes temperaturas, Oliveira et al., (2017) encontraram variação do total de compostos fenólicos de 86,7-100 % e de taninos entre 56,6 e 85,3%. Os autores determinaram que a temperatura não influenciou neste processo. Além disso, o método de extração e solvente pode influenciar na atividade antioxidante (SPIGNO; TRAMELLI; DE FAVERI, 2007).

5.3.2. Identificação de *trans*-piceatanol na polpa e na semente de canjiqueira

A quantificação de piceatanol na polpa e na semente da canjiqueira está representada na Figura 8.

Figura 8. Quantificação de *trans*-piceatanol no extrato hidroetanólico (70:30) da polpa e semente da canjiqueira



O piceatanol foi identificado como principal composto bioativo na polpa da canjiqueira por Santos et al., (2017), que caracterizaram e confirmaram a presença de compostos antioxidantes como catequinas, procianidinas, quercetina e resveratrol.

A quantificação de *trans*-piceatanol na polpa (2,085 µg/mg) e na semente (127,315 µg/mg) (Figura 8) demonstrou que a semente apresenta quantidade muito superior ao encontrado na polpa, sendo uma fonte de bioativos frequentemente desperdiçada (AJILA; BHAT; PRASADA RAO, 2007). Da mesma forma, o acúmulo de piceatanol ocorre em maior quantidade nas cascas de uva (TAKASAWA et al., 2017) e nas sementes de maracujá (MATSUI et al., 2010), sendo partes habitualmente

descartadas, demonstrando o potencial para uso destas partes para alimentação e suplementação nutricional.

5.3.3. Quantificação de *trans*-piceatanol no extrato do fruto integral de canjiqueira

Uma vez que maior determinação de *trans*-piceatanol foi encontrado na semente da canjiqueira, mas que a parte predominante do fruto é a polpa, realizou-se extrato do fruto integral, buscando aproveitar a quantidade máxima de bioativos na planta. Neste extrato, foi quantificado o piceatanol, encontrando média de 25,996 µg/mg de acordo com anexos 1, 2, e 3; contendo a triplicata das concentrações identificadas no cromatograma. Este extrato foi utilizado para determinação de atividade antioxidante e no ensaio biológico.

5.4. Estudo experimental

Os valores para cada grupo de pesos iniciais, finais, ganho de peso, comprimento e índice de Lee estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9. Pesos iniciais e finais, ganho de peso, comprimento e Índice de Lee em camundongos da linhagem *Swiss*

	Controle <i>Sham</i>	High Fat	CAN 150 mg/kg	CAN 300 mg/kg	<i>p</i>
Peso inicial (g)	35,93 ± 3,23	36,93 ± 2,51	38,87 ± 2,11	37,93 ± 3,01	> 0,05
Peso final (g)	45,36 ^a ± 4,93	51,69 ^b ± 3,41	53,93 ^b ± 4,06	52,07 ^b ± 5,26	< 0,05
Ganho de peso (g)	9,43 ^a ± 2,63	14,46 ^{b,c} ± 1,50	15,07 ^{b,c} ± 2,47	14,13 ^b ± 2,81	< 0,001
Comprimento (cm)	10,15 ± 0,29	10,32 ± 0,17	10,47 ± 0,23	10,29 ± 0,28	> 0,05
Índice de Lee	346,36 ^a ± 11,84	356,20 ^b ± 6,34	355,79 ^b ± 6,24	356,59 ^b ± 7,52	< 0,05

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Resultados foram considerados significativos quando ($p < 0,05$). Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente, enquanto letra diferentes apresentam diferença estatística, após análise de variância com ANOVA de uma via e pós-teste de Dunn. Controle *sham* – em uso de dieta AIN 93. Grupos *High Fat*, CAN 150 e CAN 300 – em uso de dieta *High fat*. CAN 150 – suplementação com extrato de canjiqueira a 150 mg/kg. CAN 300 – suplementação com extrato de canjiqueira a 300 mg/kg.

Os pesos iniciais dos animais não diferiram entre si no início do tratamento ($p > 0,05$). Ao final do estudo, apenas o grupo controle *sham* apresentou menor ganho de

peso em relação aos outros grupos ($p < 0,001$), enquanto os outros não diferiram. O grupo com maior ganho de peso, também foi o grupo que apresentou maior comprimento. Desta forma, com exceção do grupo controle sham, o grupo CAN 150 mg/kg é o que apresenta menor índice de Lee, seguido do grupo HF e CAN 300 mg/kg. Com exceção do grupo Controle, nenhum outro apresentou diferença estatística entre si ($p > 0,05$).

O resultado do índice de Lee corrobora com o quantitativo de gordura epididimal em cada grupo (Tabela 10), com apenas o grupo Controle diferindo significativamente ($p < 0,0001$), elevando-se na seguinte ordem: controle sham $<$ CAN 150 mg/kg $<$ HF $<$ CAN 300 mg/kg e divergem do percentual de gordura em relação ao peso corporal total. O índice de Lee apresenta elevada correlação com a quantidade de gordura do animal. Porém, a quantidade de gordura epididimal apresenta uma correlação ainda mais elevada (ROGERS; WEBB, 1980). Em relação à somatória dos pesos dos sítios de gordura, os valores de todos os grupos diferiram estatisticamente ($p < 0,001$), aumentando da seguinte forma: controle sham $<$ CAN 300 $<$ HF $<$ CAN 150.

Tabela 10. Peso de órgãos e sítios de gordura (g) em camundongos da linhagem *Swiss*

Órgãos	Controle <i>Sham</i>	High Fat	CAN 150 mg/kg	CAN 300 mg/kg	P
Fígado (g)	1,93 ^a ± 0,23	2,39 ^a ± 0,47	2,84 ^{b,c} ± 0,56	2,69 ^b ± 0,58	< 0,05
Pâncreas (g)	0,18 ^a ± 0,04	0,22 ^{a,b} ± 0,07	0,26 ^b ± 0,06	0,18 ^a ± 0,05	< 0,05
Sítios de gordura					
Epididimal (g)	1,64 ^a ± 0,37	2,77 ^{b,c} ± 0,56	2,37 ^b ± 0,55	2,41 ^b ± 0,71	< 0,0001
Mesentérica (g)	1,06 ± 0,35	1,42 ± 0,40	1,83 ± 0,37	1,67 ± 0,57	
Perirrenal (g)	0,32 ± 0,11	0,53 ± 0,16	0,57 ± 0,13	0,49 ± 0,16	
Retroperitonal (g)	0,68 ± 0,20	1,01 ± 0,26	0,96 ± 0,14	0,85 ± 0,26	
Omental (g)	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,10 ± 0,08	0,06 ± 0,04	
Soma dos sítios (g)	3,72 ^a ± 0,88	5,76 ^c ± 1,01	5,80 ^d ± 0,77	5,48 ^b ± 1,16	< 0,001
Gordura em relação ao peso (%)	10,35 ^a	15,59 ^c	14,92 ^{b,c}	14,44 ^b	< 0,01

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Resultados foram considerados significativos quando ($p < 0,05$). Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente, enquanto letra diferentes apresentam diferença estatística, após análise de variância com ANOVA de uma via e pós-teste de Dunn. Controle *sham* – em uso de dieta AIN 93. Grupos *High Fat*, CAN 150 e CAN 300 – em uso de dieta *High fat*. CAN 150 – suplementação com extrato de canjiqueira a 150 mg/kg. CAN 300 – suplementação com extrato de canjiqueira a 300 mg/kg.

Em relação aos pesos dos órgãos, as diferenças de peso encontradas no pâncreas dos animais (Tabela 10) do grupo controle *sham* e do grupo CAN 300 mg/kg ($p < 0,01$) em relação aos demais grupos podem ser explicados por diferentes motivos.

O grupo controle *sham* possui menor peso corporal e menor quantidade de gordura em relação aos demais grupos. Da mesma forma, é esperado que o peso do pâncreas destes animais seja menor, por possuir menor infiltração de gordura, encontrado em pessoas obesas (OGILVIE, 1933) e camundongos obesos (MATHUR et

al., 2007). A infiltração de gordura no pâncreas está relacionada com idade, presença obesidade e de DM2 (OLSEN, 1978; WALTERS, 1966).

Por outro lado, o grupo CAN 300 mg/kg possui pesos similares para os pâncreas dos animais do grupo controle *sham* e divergente dos outros animais alimentados com dieta com alto teor de gordura. Estes mesmos animais apresentam a maior concentração de glicose sérica (Tabela 11) e maior área sob a curva no teste de tolerância à glicose (Figura 9), indicando menor tolerância à glicose do que os animais dos outros grupos. Estes fatos podem indicar que este grupo possa estar apresentando disfuncionalidade no pâncreas, com consequente perda de massa de células β (SAKURABA et al., 2002).

Já o grupo HF, não diferiu nem do grupo controle e nem do grupo CAN 150, demonstrando um valor intermediário entre os tratamentos.

Tabela 11. Resultados de glicemia, colesterol total, colesterol HDL, colesterol não HDL (mg/dL) em camundongos da linhagem *Swiss*

mg/dL	Controle <i>Sham</i>	<i>High Fat</i>	CAN 150 mg/kg	CAN 300 mg/kg	<i>P</i>
Glicemia	329,96 ± 31,71	296,68 ± 96,34	329,00 ± 52,33	352,70 ± 49,26	> 0,05
Colesterol total	144,82 ^a ± 13,51	212,45 ^b ± 40,39	215,56 ^b ± 38,31	198,39 ^b ± 24,98	< 0,001
Colesterol HDL	85,04 ^a ± 17,03	93,25 ^b ± 20,00	115,29 ^c ± 22,33	109,40 ^b ± 13,14	< 0,01
Colesterol não HDL	60,12 ^a ± 11,31	112,22 ^c ± 44,71	100,27 ^c ± 28,43	88,99 ^b ± 19,47	< 0,01
Triglicerídeos	174,45 ^a ± 34,19	132,31 ^b ± 15,07	138,31 ^a ± 25,53	149,44 ^a ± 19,67	< 0,05

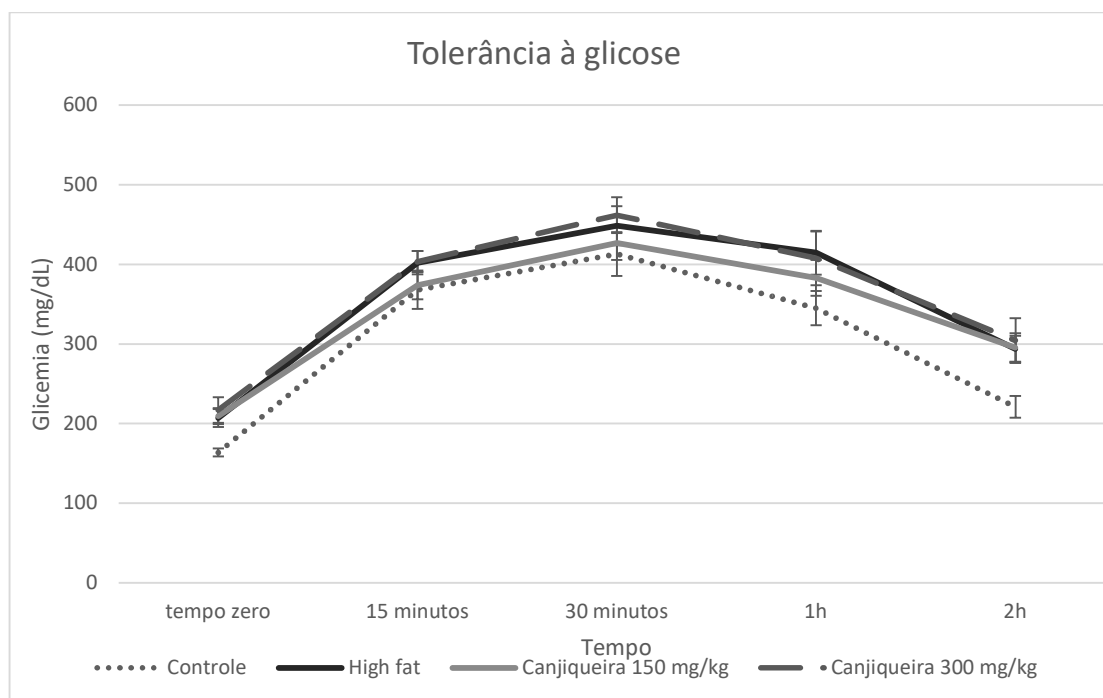
Resultados expressos em média ± desvio padrão. Resultados foram considerados significativos quando ($p < 0,05$). Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente, enquanto letra diferentes apresentam diferença estatística, após análise de variância com ANOVA de uma via e pós-teste de Dunn. Controle *sham* – em uso de dieta AIN 93. Grupos *High Fat*, CAN 150 e CAN 300 – em uso de dieta *High fat*. CAN 150 – suplementação com extrato de canjiqueira a 150 mg/kg. CAN 300 – suplementação com extrato de canjiqueira a 300 mg/kg.

Embora o valor de glicemia do grupo HF seja menor do que os outros, os resultados de glicemia em jejum não diferiram entre os grupos ($p > 0,05$). Esta tendência

à glicemia do grupo HF ser menor do que os outros grupos, pode ser explicada pela própria formulação da dieta, que inclui menor teor de carboidrato, portanto, tal restrição poderia reduzir a glicemia destes animais (FEINMAN et al., 2015). Para os grupos suplementados com extrato hidroetanólico de canjiqueira, a quantidade suplementar de carboidrato pode ter sido advinda do próprio extrato, uma vez que foi realizada extração por percolação, é possível que tenha havido extração de açúcares, com a extração aumentando conforme aumentando o tempo de extração (COELHO GERALDO et al., 2018).

Os resultados de glicemia, definindo a área sob a curva, estão presentes nas Figuras 9 e 10.

Figura 9. Resultados de valores de glicemia (mg/dL) em resposta ao teste de tolerância à glicose

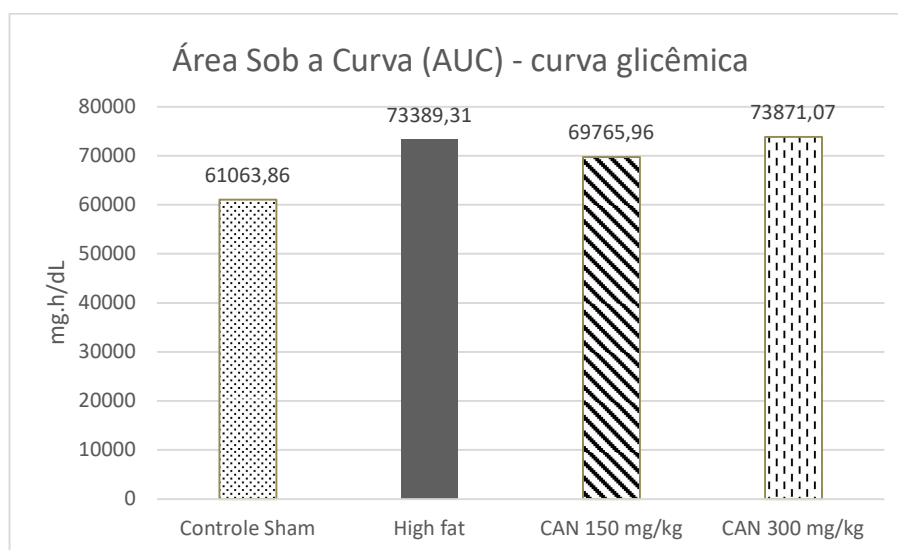


Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Controle sham – em uso de dieta AIN 93. Grupos *High Fat*, CAN 150 e CAN 300 – em uso de dieta *High fat*. CAN 150 – suplementação com extrato de canjiqueira a 150 mg/kg. CAN 300 – suplementação com extrato de canjiqueira a 300 mg/kg.

O teste de tolerância à glicose foi realizado (Figura 8). O tempo zero ocorreu com todos os animais em jejum de 6h. Os menores valores foram encontrados no grupo controle sham, conforme esperado. O grupo HF apresentou menores concentrações no tempo zero do que os grupos CAN 150 mg/kg e CAN 300 mg/kg. O tempo de 30 minutos representa o pico de maior concentração de glicose esperado, enquanto o tempo

de 2h, se refere à recuperação do metabolismo após ao desafio de glicose (ZHAO et al., 2009). Conforme esperado, o tempo 30 minutos foi o de maior concentração de glicose para todos os grupos.

Figura 10. Área sob a curva para valores de glicemia em resposta ao teste de tolerância à glicose

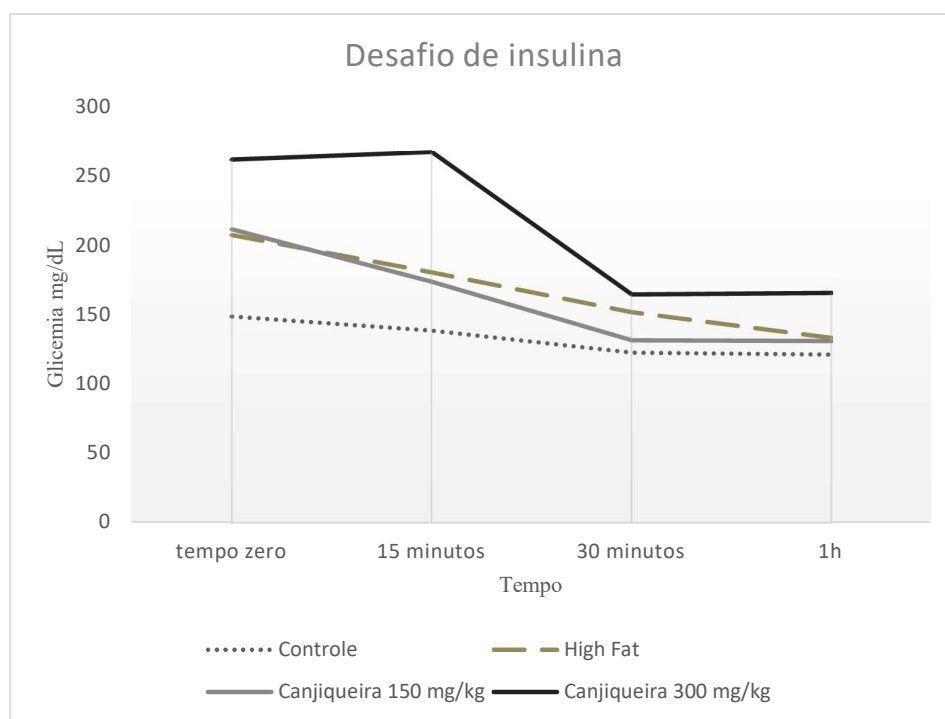


Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Controle *sham* – em uso de dieta AIN 93. Grupos *High Fat*, CAN 150 e CAN 300 – em uso de dieta *High fat*. CAN 150 – suplementação com extrato de canjiqueira a 150 mg/kg. CAN 300 – suplementação com extrato de canjiqueira a 300 mg/kg.

A área sob a curva (AUC) para os valores de glicose no intervalo de tempo zero a 2 h foi calculado para todos os grupos. Conforme esperado, o grupo controle sham obteve menores concentrações de glicemia de todos os grupos. Nos outros grupos, as concentrações de glicemia decresceram a partir do grupo CAN 300 mg/kg > HF > CAN 150 mg/kg. Apesar de os grupos CAN 300 mg/kg e CAN 150 mg/kg receberem extrato de canjiqueira, podendo ter aumentado a concentração de açúcares totais ingeridos ao longo do período do estudo, os valores da AUC são bastante próximos do grupo HF. Ainda, o grupo CAN 150 mg/kg apresentou AUC menor que o grupo HF, apesar da dose extra de açúcares advindas da suplementação, é possível que nesta quantidade, a ação antioxidante do extrato tenha sido suficiente para reduzir a intolerância à insulina, enquanto para o grupo CAN 300 mg/kg a sobrecarga de glicose extra pode ter interferido, aumentando a concentração de glicemia e portanto, a AUC. Diversas outras plantas já foram associadas a efeitos hipoglicemiantes ou capazes de elevar a sensibilidade à insulina (BOTES; VAN DER WESTHUIZEN; LOOTS, 2008; MENG; LI; CAO, 2013; TIWARI et al., 2013).

Os resultados do teste de tolerância à glicose corroboram com os testes de desafio de insulina (Figura 11). Nenhum animal realizou hipoglicemia durante o teste, ou seja, glicemia menor do que 70 mg/dL. Os animais do grupo controle sham possuíram menores valores de glicemia inicial e final, apresentando discreta queda na concentração de glicemia com o passar do tempo. Apesar do grupo CAN 150 mg/kg ter obtido glicemia inicial superior ao grupo HF, este grupo aparentou ser mais sensível à insulina, uma vez que apresentou queda abrupta na glicemia e após chegar em concentrações adequadas de glicemia, estabilizou. O grupo HF apresentou queda constante de glicemia até o último momento de aferição. O grupo CAN 300 mg/kg iniciou com os maiores valores de glicemia de todos os grupos, inicialmente apresentou ligeiro aumento de glicemia, seguida de queda vertiginosa nos valores e por fim, estabilização em níveis mais elevados que o controle no estágio inicial.

Figura 11. Resultados de valores de glicemia (mg/dL) em resposta ao desafio de insulina

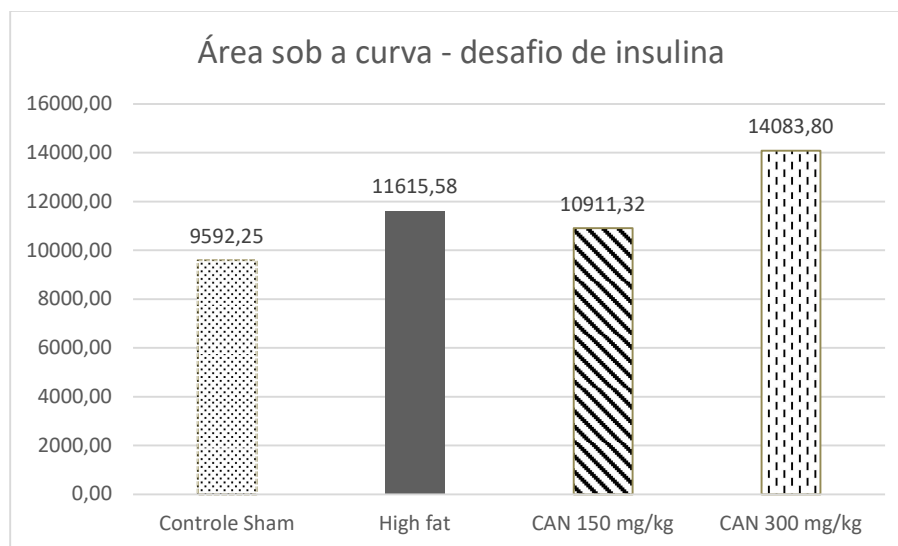


Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Controle *sham* – em uso de dieta AIN 93. Grupos *High Fat*, CAN 150 e CAN 300 – em uso de dieta *High fat*. CAN 150 – suplementação com extrato de canjiqueira a 150 mg/kg. CAN 300 – suplementação com extrato de canjiqueira a 300 mg/kg.

Os resultados de área sob a curva para o desafio de insulina (Figura 12) corroboram com os resultados do teste de tolerância à glicose, mantendo a mesma

característica de menores valores no grupo Controle Sham < Can 150 < High Fat < Can 300, sendo a justificativa para este resultado, pertinente.

Figura 12. Área sob a curva para valores de glicemia em resposta ao desafio de insulina



Para os resultados de colesterol, houve diferença apenas no grupo controle sham ($p=0,0002$). A menor concentração de colesterol neste grupo era esperada, uma vez que não foi alimentado com ração com alto teor de lipídios. De acordo com o clássico “Estudo de 7 países”, que compara o risco de desenvolver doenças coronarianas em habitantes de 7 países com dietas bastante diferentes em composição de quantitativo de gorduras, foi possível observar que uma dieta pobre em gorduras era capaz de minimizar a quantidade de colesterol e de infartos sofridos, enquanto a mudança deste hábito alimentar para um consumo elevado de gorduras, aumenta a quantidade de colesterol e as chances do indivíduo de sofrer problemas coronarianos (KEYS et al., 1958). O colesterol dos outros grupos aumentou na seguinte ordem: CAN 300 < HF < HF + CAN 150, não diferindo entre si.

Entre todos os grupos, o que apresentou maior quantitativo de colesterol não-HDL foi o HF, não divergindo do grupo CAN 150. Entretanto, o colesterol não-HDL apresentou-se em menor concentração no grupo controle e no grupo CAN 300 ($p < 0,01$), quando comparados com os grupos HF e CAN 150. O colesterol não-HDL representa a soma das massas de colesterol e ésteres de colesterol em todas as lipoproteínas aterogênicas (ROSENSEN, 2009). Da mesma forma, em relação aos valores de colesterol total, o grupo HF foi proporcionalmente o que apresentou menor

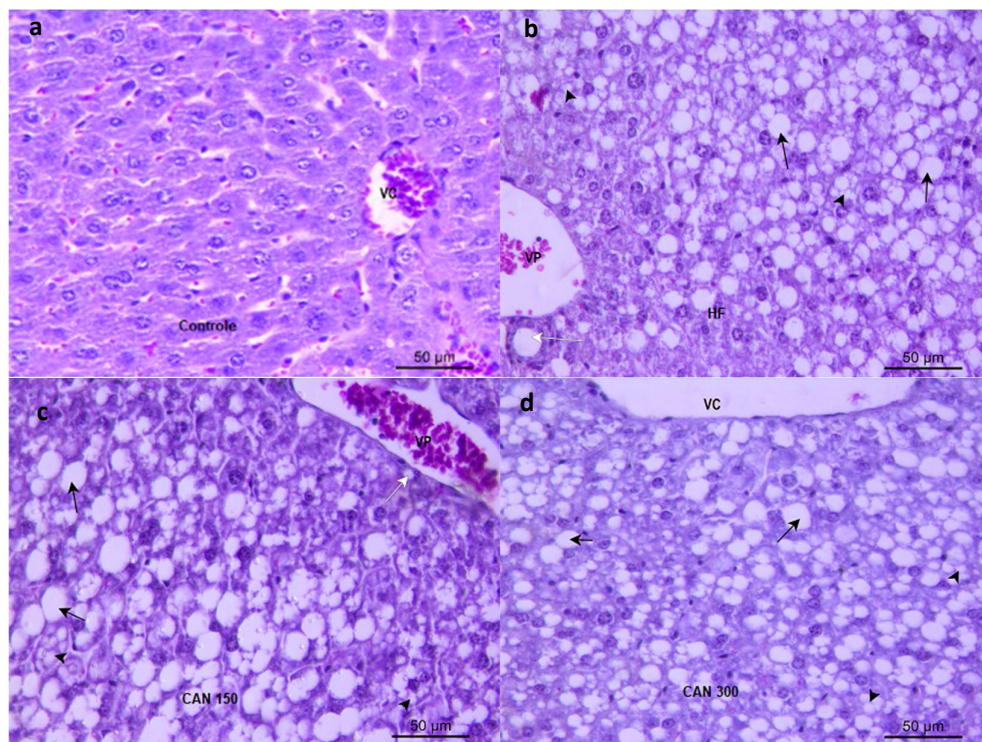
concentração de HDL-c. As concentrações de HDL-c são inversamente proporcionais ao risco do surgimento de doenças cardiovasculares (DI ANGELANTONIO et al., 2009).

Os níveis de triglicerídeos aumentaram na seguinte ordem: HF < CAN 150 < CAN 300 < controle *sham*, com apenas o grupo HF diferenciando significativamente em relação aos outros grupos ($p < 0,05$). Dentre os grupos alimentados com dieta com alto teor de gordura, é possível justificar o aumento dos níveis de triglicerídeos pela presença da frutose presente no extrato. Bocarsly et al., (2010) observaram maiores níveis de triglicerídeos em animais alimentados com dieta padrão e bebida rica em frutose, quando comparados com animais alimentados apenas com dieta padrão. O grupo controle *sham* apresentou o maior quantitativo de triglicerídeos de todos os grupos, podendo ser este pela formulação da dieta, mais rica em açúcar do que a dieta hiperlipídica.

5.4.2. Análise histológica

A partir das lâminas dos animais é possível detectar que o grupo controle é o único sem infiltração de gordura e preservação dos hepatócitos (Figura 13).

Figura 13. Lâminas histológicas do fígado dos animais



a) Grupo controle; b) grupo HF; c) grupo CAN 150; d) grupo CAN 300

A análise das lâminas (Tabela 12) demonstrou que a suplementação com o extrato de canjiqueira não foi efetivo em prevenir ou minimizar a esteatose hepática em camundongos. Os grupos HF, CAN 150 e CAN 300 apresentaram esteatose microvesicular e macrovesicular difusa e intensa (score 8) distribuída pelas zonas 1, 2 e 3 dos lóbulos hepáticos. O grupo Controle apresentou padrão morfológicos padrão, sem nenhuma alteração (score 2), evidenciando que a dieta hiperlipídica com ou sem tratamento com o extrato de canjiqueira provocou a infiltração gordurosa.

Tabela 12. Lâminas histológicas de fígado de camundongos em diferentes tipos de dieta

Grupo	Esteatose	<i>p</i>
Controle	2 ^a	<0,05
HF	8 ^b	
CAN 150	8 ^b	
CAN 300	8 ^b	

Ausência da lesão - 2 pontos; lesão leve - 4 pontos, lesão moderada - 6 pontos e lesão intensa – 8 pontos. Resultados foram considerados significativos quando ($p < 0,05$). Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente, enquanto letra diferentes apresentam diferença estatística, após análise de variância com ANOVA de uma via e pós-teste de Dunn. Controle *sham* – em uso de dieta AIN 93. Grupos *High Fat*, CAN 150 e CAN 300 – em uso de dieta *High fat*. CAN 150 – suplementação com extrato de canjiqueira a 150 mg/kg. CAN 300 – suplementação com extrato de canjiqueira a 300 mg/kg.

O uso de dieta com *High fat* está associado com o desenvolvimento de esteatose hepática e marcadores inflamatórios (SOTO-ALARCÓN et al., 2019). No entanto, diversos estudos que utilizaram dieta obesogênica e suplementação de extrato de frutas, minimizaram a glicemia de jejum, hiperlipidemia, hiperinsulinemia, e infiltração gordurosa no fígado (ANHÊ et al., 2018; CHO et al., 2013; HUANG et al., 2010; SEYMOUR et al., 2008), entrando em contradição com os resultados do presente estudo. Desta forma, constata-se que o efeito antioxidante do extrato não foi capaz de reverter os malefícios causados pela dieta *high fat*.

6. CONCLUSÕES

O conteúdo mineral de ambas polpa e semente, são ricos em diferentes elementos. Enquanto a polpa é mais abundante em Na e K, a semente é mais concentrada em Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Se e Zn. Tanto a polpa, quanto a semente possuem predominância de ácido graxos insaturados, sendo o ácido oleico o maior MUFA, com maior predominância desse ácido graxo na polpa; e o ácido linoleico o maior PUFA, com maior predominância na semente. Polpa e semente de canjiqueira são importantes fontes de ácidos graxos essenciais, no caso ácido linoleico, revelando potencial nutricional em relação a benefícios de saúde.

A estabilidade térmica do óleo da semente foi superior ao óleo da polpa, independentemente da presença de mais insaturações no perfil de ácidos graxos e da presença de metais polivalentes. A estabilidade térmica do óleo da semente foi atribuída a presença de antioxidantes naturais, demonstrada com maior concentração de piceatanol na semente do que na polpa.

Enquanto a polpa é utilizada como fontes de nutrientes, ou no preparo de outros produtos, as sementes da canjiqueira são comumente descartadas. Este estudo demonstrou que ambas as partes da canjiqueira podem ser utilizadas como estratégias para enfrentar problemas nutricionais e são ingredientes valiosos na prospecção de produtos alimentícios, com valioso potencial tecnológico e industrial.

A suplementação do extrato de canjiqueira em camundongos com obesidade não demonstrou diferenças nos resultados de colesterol total, glicemia e triglicerídeos, tendo demonstrado efeito positivo em relação ao grupo controle *sham* no quantitativo de colesterol HDL. O uso de extrato de canjiqueira em diferentes concentrações não minimizou ou preveniu a esteatose hepática causada pela dieta hiperlipídica. Mais estudos são necessários para identificar o potencial anti-inflamatório e antioxidante da suplementação do extrato de canjiqueira em animais.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A. et al. Atividade antioxidante in vitro e in vivo de café bebida mole. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 127–133, 2012.
- AGOSTINI-COSTA, T. et al. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 17, n. 2, p. 167–176, 1999.
- AJILA, C. M.; BHAT, S. G.; PRASADA RAO, U. J. S. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1006–1011, 1 jan. 2007.
- AKLAKUR, M. Natural antioxidants from sea: a potential industrial perspective in aquafeed formulation. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 385–399, 1 jun. 2018.
- ANDRÉ, C. et al. Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 5, p. 229–246, 2010.
- ANGELAKIS, E. et al. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. **Future microbiology**, v. 7, n. 1, p. 91–109, 2012.
- ANHÊ, F. F. et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice. **Gut**, v. 64, n. 6, p. 872–883, 2015.
- ANHÊ, F. F. et al. Arctic berry extracts target the gut–liver axis to alleviate metabolic endotoxaemia, insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. **Diabetologia**, v. 61, n. 4, p. 919–931, 1 abr. 2018.
- ANTONUCCI, L. et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Nutritional Implications: Special Focus on Copper. **Nutrients**, 2017.
- ARAPITSAS, P. Hydrolyzable tannin analysis in food. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1708–1717, 2012.
- AROOR, A. R.; WHALEY-CONNELL, A.; SOWERS, J. R. Utility of obesity and metabolic dyslipidemia (a non-insulin based determinate of the metabolic syndrome and insulin resistance) in predicting arterial stiffness. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 21, n. 8, p. 1071–1074, 2019.
- ASHCROFT, F. M. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 8, p. 2047–2058, 1 ago. 2005.
- ASTRUP, A.; BÜGEL, S. Micronutrient deficiency in the aetiology of obesity. 2010.
- ATABANI, A. E. et al. Integrated valorization of waste cooking oil and spent coffee grounds for biodiesel production: Blending with higher alcohols, FT–IR, TGA, DSC and NMR characterizations. **Fuel**, v. 244, p. 419–430, 15 maio 2019.
- BABBAR, N. et al. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 391–396, 2011.

BÄCKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 101, n. 44, p. 15718–15723, 2004.

BASTIEN, M. et al. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 56, n. 4, p. 369–381, 2014.

BERA, D.; LAHIRI, D.; NAG, A. Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 4, p. 542–545, 1 jun. 2006.

BERSELI, C. et al. Nível de Dano Econômico de Canjiqueira em Pastagens Nativas no Pantanal da Nhecolândia. **Planta Daninha**, v. 37, 2019.

BERTO, A. et al. Proximate compositions, mineral contents and fatty acid compositions of native Amazonian fruits. **Food Research International**, v. 77, p. 441–449, 1 nov. 2015.

BŁASZCZYK, A.; SADY, S.; SIELICKA, M. The stilbene profile in edible berries. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 1, p. 37–67, 1 fev. 2019.

BOCARSLY, M. E. et al. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, The psychopharmacology of feeding, obesity and body weight regulation. v. 97, n. 1, p. 101–106, 1 nov. 2010.

BOLELLI BROINIZI, P. R. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, 2007.

BORA, P. S. et al. Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (cultivar: Fuerte) fruits. **Grasas y Aceites**, v. 52, n. 3–4, p. 171–174, 30 ago. 2001.

BOTES, L.; VAN DER WESTHUIZEN, F. H.; LOOTS, D. T. Phytochemical contents and antioxidant capacities of two *Aloe greatheadii* var. *davyana* extracts. **Molecules**, v. 13, n. 9, p. 2169–2180, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1 jan. 1995.

BURKHEAD, J. L.; LUTSENKO, S. The role of copper as a modifier of lipid metabolism. In: **Lipid metabolism**. [s.l.] InTech, 2013.

BUSCHMANN, J. The OECD Guidelines for the Testing of Chemicals and Pesticides. In: BARROW, P. C. (Ed.). **Teratogenicity Testing: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 37–56.

BUZZINI, P. et al. Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1179–1187, 2008.

CALDER, P. C. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. **JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition**, v. 39, n. 1 Suppl, p. 18S–32S, set. 2015.

CAPELL, W. H. et al. Compositional differences of LDL particles in normal subjects with LDL subclass phenotype A and LDL subclass phenotype B. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 16, n. 8, p. 1040–1046, 1996.

CARAMORI, S. S.; LIMA, C. S.; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 253–259, 2004.

CASPARD, H. et al. Recent trends in the prevalence of type 2 diabetes and the association with abdominal obesity lead to growing health disparities in the USA: An analysis of the NHANES surveys from 1999 to 2014. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 667–671, 1 mar. 2018.

CASTREJÓN, A. D. R. et al. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. **Food Chemistry**, v. 109, n. 3, p. 564–572, 1 ago. 2008.

CEPEDA-LOPEZ, A. C. et al. Sharply higher rates of iron deficiency in obese Mexican women and children are predicted by obesity-related inflammation rather than by differences in dietary iron intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 5, p. 975–983, 1 maio 2011.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 414–420, 1 maio 2013.

CHO, S.-J. et al. **Combined Ethanol Extract of Grape Pomace and Omija Fruit Ameliorates Adipogenesis, Hepatic Steatosis, and Inflammation in Diet-Induced Obese Mice**. Research Article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/212139/>>. Acesso em: 13 mar. 2020.

CHOE, E.; MIN, D. B. Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 5, p. R77–R86, 2007.

CLEMENTE-POSTIGO, M. et al. Adipose tissue gene expression of factors related to lipid processing in obesity. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24783, 2011.

COELHO GERALDO, V. et al. Sugar Extraction via Moving-Bed Diffusers in Ethanol Production Industry: Phenomenological Modeling and Finite-Volumes Simulation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 57, n. 41, p. 13769–13782, 17 out. 2018.

CROMWELL, W. C. et al. LDL particle number and risk of future cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study—implications for LDL management. **Journal of clinical lipidology**, v. 1, n. 6, p. 583–592, 2007.

CUMMINGS, N. K.; JAMES, A. P.; SOARES, M. J. The acute effects of different sources of dietary calcium on postprandial energy metabolism. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 1, p. 138–144, 2006.

DA SILVA, A. C.; JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **Journal of Health Sciences**, 2015.

DA SILVA OLIVEIRA, D. et al. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 33, n. 1, 2011.

DE ALMEIDA MELO, E. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 193–201, 2008.

DE ALMEIDA SIQUEIRA, E. M. et al. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e72826, 2013.

DE BAAIJ, J. H. F.; HOENDEROP, J. G. J.; BINDELS, R. J. M. Magnesium in man: implications for health and disease. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 1, p. 1–46, jan. 2015.

DE OLIVEIRA, J. B. et al. Climate effects on physicochemical composition of Syrah grapes at low and high altitude sites from tropical grown regions of Brazil. **Food Research International**, 9 jan. 2019.

DE SOUZA, V. R. et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p. 362–368, 1 ago. 2014.

DE WIT, N. J. et al. Supplementary dietary calcium stimulates faecal fat and bile acid excretion, but does not protect against obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. **British journal of nutrition**, v. 105, n. 7, p. 1005–1011, 2011.

DEL RÍO, J. C. et al. Chemical composition and thermal behavior of the pulp and kernel oils from macauba palm (*Acrocomia aculeata*) fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 294–304, 1 jun. 2016.

DELFANIAN, M.; KENARI, R. E.; SAHARI, M. A. Antioxidant Activity of Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Fruit Peel and Pulp Extracts in Stabilization of Soybean Oil During Storage Conditions. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. 12, p. 2813–2824, 2 dez. 2015.

DEMBITSKY, V. M. et al. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food research international**, v. 44, n. 7, p. 1671–1701, 2011.

DENOYER, D. et al. Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer”. **Metallomics: Integrated Biometal Science**, v. 7, n. 11, p. 1459–1476, nov. 2015.

DENT, M. et al. The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 84–91, 29 mar. 2013.

DESPRÉS, J.-P. Abdominal obesity and cardiovascular disease: is inflammation the missing link? **Canadian Journal of Cardiology**, v. 28, n. 6, p. 642–652, 2012.

DI ANGELANTONIO, E. et al. **Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. JAMA: the journal of the American Medical Association. 2009; 302 (18): 1993–**

2000. [s.l.] Epub 2009/11/12. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1619> PMID: 19903920, [s.d.].

DIAS, L. S.; LUZIA, D. M.; JORGE, N. Physicochemical and bioactive properties of *Hymenaea courbaril* L. pulp and seed lipid fraction. **Industrial crops and products**, v. 49, p. 610–618, 2013.

DING, M.; ZOU, J. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils. **Food chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1051–1055, 2012.

DIXON, R.; PAIVA, N. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1085–1097, jul. 1995.

DUGO, G. et al. Determination of Cd(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) content in commercial vegetable oils using derivative potentiometric stripping analysis. **Food Chemistry**, v. 87, n. 4, p. 639–645, 1 out. 2004.

ELFASSY, T. et al. Associations of Sodium and Potassium with Obesity Measures Among Diverse US Hispanic/Latino Adults: Results from the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. **Obesity**, v. 26, n. 2, p. 442–450, 1 fev. 2018.

ENDO, Y.; HOSHIZAKI, S.; FUJIMOTO, K. Oxidation of synthetic triacylglycerols containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids: effect of oxidation system and triacylglycerol structure. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 9, p. 1041, 1997.

FANIADIS, D.; DROGOUDI, P. D.; VASILAKAKIS, M. Effects of cultivar, orchard elevation, and storage on fruit quality characters of sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 301–304, 28 jun. 2010.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1571–1578, 15 jun. 2011.

FEINMAN, R. D. et al. Dietary carbohydrate restriction as the first approach in diabetes management: Critical review and evidence base. **Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2015.

FIELDS, M.; LEWIS, C. G. Hepatic iron overload may contribute to hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia in copper-deficient rats. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 46, n. 4, p. 377–381, 1997.

FIELDS, M.; LEWIS, C. G.; LURE, M. D. Responses of insulin to oral glucose and fructose loads in marginally copper-deficient rats fed starch or fructose. **Nutrition**, v. 12, n. 7, p. 524–528, 1996.

FIGUEIREDO, P. S. et al. Oxidative stability of sesame and flaxseed oils and their effects on morphometric and biochemical parameters in an animal model. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 97, n. 10, p. 3359–3364, 2017.

FINAUD, J.; LAC, G.; FILAIRE, E. Oxidative stress. **Sports medicine**, v. 36, n. 4, p. 327–358, 2006.

FINCO, F.; SILVA, I. G.; OLIVEIRA, R. DE. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of three native fruits from Brazilian Savannah (Cerrado). **Alimentos e Nutrição, Araraquara**, v. 23, n. 2, p. 179–185, 2012.

FOOD AND NUTRITION BOARD, I. OF M. Dietary reference intakes: applications in dietary assessment. **WashingtonDC: NationalAcademyPress**, 2000.

FREITAS, K. H. G.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ immobilized in polyester resin. **Talanta**, v. 81, n. 3, p. 1102–1108, 2010.

FROTA, F.; NAZÁRIO, G.; SAURBRONN, J. Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. In: **Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. [s.l: s.n.].

FUKUNAKA, A.; FUJITANI, Y. Role of zinc homeostasis in the pathogenesis of diabetes and obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 476, 2018.

GARCIA, C. et al. Thermal stability studies of some cerrado plant oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 645–648, 2007.

GARCÍA, O. P.; LONG, K. Z.; ROSADO, J. L. Impact of micronutrient deficiencies on obesity. **Nutrition reviews**, v. 67, n. 10, p. 559–572, 2009.

GLABASNIA, A.; HOFMANN, T. Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European oak wood (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 3380–3390, 2006.

GONÇALVES, R. P.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Thermal edible oil evaluation by UV–Vis spectroscopy and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 163, p. 83–86, 15 nov. 2014.

GROOTVELD, M.; PERCIVAL, B. C.; GROOTVELD, K. L. Chronic non-communicable disease risks presented by lipid oxidation products in fried foods. **Hepatobiliary Surgery and Nutrition**, v. 7, n. 4, p. 305–312, ago. 2018.

GUERRERO-ROMERO, F. et al. Obesity and hypomagnesemia. **European Journal of Internal Medicine**, v. 34, p. 29–33, 1 out. 2016.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants—quo vadis? **Trends in pharmacological sciences**, v. 32, n. 3, p. 125–130, 2011.

HAMMAD, S.; PU, S.; JONES, P. J. Current Evidence Supporting the Link Between Dietary Fatty Acids and Cardiovascular Disease. **Lipids**, v. 51, n. 5, p. 507–517, 2016.

HEIDARY, Z. et al. Effect of Magnesium Loading Dose on Insulin Resistance in Patients With Stress-Induced Hyperglycemia: A Randomized Clinical Trial. **Journal of Intensive Care Medicine**, p. 0885066618777431, 22 maio 2018.

HEINDEL, J. J. et al. Parma consensus statement on metabolic disruptors. **Environmental Health**, v. 14, n. 1, p. 54, 2015.

HERITAGE, M. et al. Combination curcumin and vitamin E treatment attenuates diet-induced steatosis in Hfe^{-/-} mice. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 8, n. 2, p. 67–76, 15 maio 2017.

HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; DE PASCUAL-TERESA, S. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food chemistry**, v. 121, n. 3, p. 691–696, 2010.

HÖLL, J. et al. The R2R3-MYB Transcription Factors MYB14 and MYB15 Regulate Stilbene Biosynthesis in *Vitis vinifera*. **The Plant Cell**, v. 25, n. 10, p. 4135–4149, 1 out. 2013.

HOOPER, L. et al. Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 6, 2015.

HORNING, K. J. et al. Manganese is essential for neuronal health. **Annual review of nutrition**, v. 35, p. 71–108, 2015.

HOSSEINI, B. et al. Effects of pomegranate extract supplementation on inflammation in overweight and obese individuals: A randomized controlled clinical trial. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 22, p. 44–50, 1 fev. 2016.

HUANG, Z. et al. Biological synthesis of tooth enamel instructed by an artificial matrix. **Biomaterials**, v. 31, n. 35, p. 9202–11, dez. 2010.

JAARIN, K.; MASBAH, N.; KAMISAH, Y. Chapter 10 - Heated Oil and Its Effect on Health. In: HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M. (Eds.). . **Food Quality: Balancing Health and Disease**. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 315–337.

JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, 2011.

JUNG, E. et al. A study on blood lipid profiles, aluminum and mercury levels in college students. **Nutrition Research and Practice**, v. 10, n. 4, p. 442–447, 1 ago. 2016.

KAIDAR-PERSON, O. et al. Nutritional Deficiencies in Morbidly Obese Patients: A New Form of Malnutrition? **Obesity Surgery**, v. 18, n. 7, p. 870–876, 1 jul. 2008.

KARPE, F. et al. Lipoprotein lipase in plasma after an oral fat load: relation to free fatty acids. **Journal of lipid research**, v. 33, n. 7, p. 975–984, 1992.

KAWAKAMI, T. et al. Differential effects of cobalt and mercury on lipid metabolism in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obesity mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 1, p. 32–42, 1 jan. 2012.

KEYS, A. et al. Lessons from serum cholesterol studies in Japan, Hawaii and Los Angeles. **Annals of internal medicine**, v. 48, n. 1, p. 83–94, 1958.

KIMMONS, J. E. et al. Associations between body mass index and the prevalence of low micronutrient levels among US adults. **Medscape General Medicine**, v. 8, n. 4, p. 59, 2006.

KITADA, M. et al. The Effect of Piceatannol from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds on Metabolic Health in Humans. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1142, out. 2017.

KONGBONGA, Y. M. et al. Investigation of Heat-Induced Degradation of Virgin Olive Oil Using Front Face Fluorescence Spectroscopy and Chemometric Analysis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, n. 10, p. 1399–1404, 2015.

KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Effect of endogenous antioxidants of sesame seeds and sesame oil to the thermal stability of edible vegetable oils. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1379–1386, 1 nov. 2010.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 6, p. 1009–1015, dez. 1999.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 9, p. 1746S-1751S, set. 2008.

KUMSSA, D. B. et al. Dietary calcium and zinc deficiency risks are decreasing but remain prevalent. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10974, 22 jun. 2015.

KURSTJENS, S. et al. Magnesium deficiency prevents high-fat-diet-induced obesity in mice. **Diabetologia**, v. 61, n. 9, p. 2030–2042, 1 set. 2018.

KWON, J. Y. et al. Piceatannol, Natural Polyphenolic Stilbene, Inhibits Adipogenesis via Modulation of Mitotic Clonal Expansion and Insulin Receptor-dependent Insulin Signaling in Early Phase of Differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 14, p. 11566–11578, 30 mar. 2012.

LAI, T. N. H. et al. Nutritional composition and antioxidant properties of the sim fruit (*Rhodomyrtus tomentosa*). **Food Chemistry**, v. 168, p. 410–416, 1 fev. 2015.

LEE, S. C.; PROSKY, L.; VRIES, J. W. D. Determination of Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber in Foods—Enzymatic-Gravimetric Method, MES-TRIS Buffer: Collaborative Study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 75, n. 3, p. 395–416, 1 maio 1992.

LEE, Y. J. et al. Dietary Wolfberry Extract Modifies Oxidative Stress by Controlling the Expression of Inflammatory mRNAs in Overweight and Hypercholesterolemic Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 309–316, 18 jan. 2017.

LEUNG, K. S. et al. Profiling of Omega-Polyunsaturated Fatty Acids and Their Oxidized Products in Salmon after Different Cooking Methods. **Antioxidants**, v. 7, n. 8, p. 96, ago. 2018.

LI, H. et al. Evaluating and predicting the oxidative stability of vegetable oils with different fatty acid compositions. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 4, p. H633-641, abr. 2013.

LI, Y. et al. Effects of multivitamin and mineral supplementation on adiposity, energy expenditure and lipid profiles in obese Chinese women. **International Journal of Obesity**, v. 34, n. 6, p. 1070, 2010.

- LIU, A. et al. High serum concentration of selenium, but not calcium, cobalt, copper, iron, and magnesium, increased the risk of both hyperglycemia and dyslipidemia in adults: A health examination center based cross-sectional study. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 59, p. 126470, 1 maio 2020.
- LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A-724A, 1 jun. 1983.
- LOPEZ, A. et al. Iron deficiency anaemia. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10021, p. 907–916, 27 fev. 2016.
- LORDÊLO CARDOSO SILVA, M. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, 2010.
- LU, L. et al. Magnesium intake is inversely associated with risk of obesity in a 30-year prospective follow-up study among American young adults. **European Journal of Nutrition**, 24 fev. 2020.
- LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2111–2117, 1 jun. 2011.
- MAJCHRZAK, T. et al. Thermal degradation assessment of canola and olive oil using ultra-fast gas chromatography coupled with chemometrics. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 148, n. 9, p. 1625–1630, 1 set. 2017.
- MARCELINO, G. et al. Characterization and oxidative stability of oils and bioactive compounds of the fruits of *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. at different ripening stages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 6, p. 2855–2864, 1 abr. 2019.
- MARCELINO, G. et al. Characterization and oxidative stability of oils and bioactive compounds of the fruits of *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. at different ripening stages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 0, n. ja, [s.d.].
- MARIOSIA, L. S. S. et al. Abdominal Obesity Is Associated With Potassium Depletion and Changes in Glucose Homeostasis During Diuretic Therapy. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 10, n. 6, p. 443–449, 1 jun. 2008.
- MATHUR, A. et al. Nonalcoholic fatty pancreas disease. **HPB**, v. 9, n. 4, p. 312–318, 1 ago. 2007.
- MATSUI, Y. et al. Extract of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seed Containing High Amounts of Piceatannol Inhibits Melanogenesis and Promotes Collagen Synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 11112–11118, 27 out. 2010.
- MAUS, M. et al. Store-Operated Ca^{2+} Entry Controls Induction of Lipolysis and the Transcriptional Reprogramming to Lipid Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 3, p. 698–712, 7 mar. 2017.
- MELO, E. et al. First Study on the Oxidative Stability and Elemental Analysis of Babassu (*Attalea speciosa*) Edible Oil Produced in Brazil Using a Domestic Extraction Machine. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4235, jan. 2019.

- MENG, B.; LI, J.; CAO, H. Antioxidant and antiinflammatory activities of curcumin on diabetes mellitus and its complications. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 11, p. 2101–2113, 2013.
- MILLER-IHLI, N. J. Atomic Absorption and Atomic Emission Spectrometry for the Determination of the Trace Element Content of Selected Fruits Consumed in the United States. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 9, n. 4, p. 301–311, 1 dez. 1996.
- MIRA, L. et al. Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity. **Free Radical Research**, v. 36, n. 11, p. 1199–1208, 1 jan. 2002.
- MOKDAD, A. H. et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. **Jama**, v. 289, n. 1, p. 76–79, 2003.
- MORALES, M. T.; RIOS, J. J.; APARICIO, R. Changes in the Volatile Composition of Virgin Olive Oil during Oxidation: Flavors and Off-Flavors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 2666–2673, 1 jul. 1997.
- MORALES, P. et al. Mediterranean non-cultivated vegetables as dietary sources of compounds with antioxidant and biological activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 389–396, 2014.
- MURAKAMI, K. et al. Ability of self-reported estimates of dietary sodium, potassium and protein to detect an association with general and abdominal obesity: comparison with the estimates derived from 24 h urinary excretion. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 8, p. 1308–1318, abr. 2015.
- MURAKAMI, K.; SASAKI, S.; UENISHI, K. The degree of misreporting of the energy-adjusted intake of protein, potassium, and sodium does not differ among under-, acceptable, and over-reporters of energy intake. **Nutrition Research**, v. 32, n. 10, p. 741–750, 1 out. 2012.
- MÜSELLIM, E. et al. Thermokinetic and TG/DSC-FTIR study of pea waste biomass pyrolysis. **Applied Thermal Engineering**, v. 137, p. 54–61, 5 jun. 2018.
- NAVARRO-ALARCON, M. et al. Melatonin increases magnesium concentrations in white adipose tissue and pancreas of diabetic obese rats. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 167–172, 1 set. 2018.
- NUTRITION, C. FOR F. S. AND A. Nutrient Content Claims. **FDA**, 2 maio 2020.
- OGILVIE, R. F. The islands of Langerhans in 19 cases of obesity. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 37, n. 3, p. 473–481, 1933.
- OGURTSOVA, K. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 128, p. 40–50, 1 jun. 2017.
- OLECHNOWICZ, J. et al. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 68, n. 1, p. 19–31, 1 jan. 2018.

OLIVEIRA, K. G. DE et al. Effect of the storage time and temperature on phenolic compounds of sorghum grain and flour. **Food Chemistry**, v. 216, p. 390–398, 1 fev. 2017.

OLSEN, T. S. Lipomatosis of the pancreas in autopsy material and its relation to age and overweight. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section A Pathology**, v. 86, n. 1-6, p. 367–373, 1978.

OLUSI, S. et al. Serum copper levels and not zinc are positively associated with serum leptin concentrations in the healthy adult population. **Biological trace element research**, v. 91, n. 2, p. 137–144, 2003.

PACHECO, R.; VASCONCELOS, H. L. Habitat diversity enhances ant diversity in a naturally heterogeneous Brazilian landscape. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 3, p. 797–809, 2012.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; MERTENS-TALCOTT, S.; TALCOTT, S. T. Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Thermal Stability of a Phytochemical Enriched Oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4631–4636, 1 jun. 2008.

PACKARD, C. Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein. 2003.

PANSERA, M. et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Rev. bras. farmacogn**, v. 13, n. 1, p. 17–22, 2003.

PINHAS-HAMIEL, O. et al. Greater prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents. **International Journal of Obesity**, v. 27, n. 3, p. 416–418, mar. 2003.

PIOTROWSKA, H.; KUCINSKA, M.; MURIAS, M. Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 750, n. 1, p. 60–82, 1 jan. 2012.

POTT, A. et al. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1519-69842011000200005&lng=en&nrm=iso&tlng=es. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 265–273, abr. 2011.

PRASAD, A. S. Chapter 20 - Discovery of Zinc for Human Health and Biomarkers of Zinc Deficiency. In: COLLINS, J. F. (Ed.). **Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals**. Boston: Academic Press, 2017. p. 241–260.

PRATES, M. F. O. et al. Nutritional and antioxidant potential of canjiqueira fruits affected by maturity stage and thermal processing. **Ciência Rural**, v. 45, n. 3, p. 399–404, mar. 2015.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química nova**, p. 755–760, 2006.

RAYMAN, M. P6 - Selenium Intake And Status In Health & Disease. **Free Radical Biology and Medicine**, SfrBM 2017 SfrBM's 24th Annual Meeting Program and Abstracts November 29 - December 2, 2017 Hilton Baltimore Baltimore, MD USA. v. 112, p. 5, 1 nov. 2017.

RAYMAN, M. P. Selenium intake, status, and health: a complex relationship. **Hormones**, v. 19, n. 1, p. 9–14, 1 mar. 2020.

REDA, S. Y. Evaluation of antioxidants stability by thermal analysis and its protective effect in heated edible vegetable oil. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 475–480, jun. 2011.

RIOS-LUGO, M. J. et al. Association of Serum Zinc Levels in Overweight and Obesity | SpringerLink. **Biological Trace Element Research**, 2020.

ROCHA, M. S. et al. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (in vitro) de frutos do cerrado Piauiense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 933–941, 2013.

ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215–1221, 2011.

RODRIGUES, H. G. et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, p. 315–320, 2003.

RODRÍGUEZ-MORÁN, M. et al. Oral Magnesium Supplementation and Metabolic Syndrome: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. **Advances in Chronic Kidney Disease**, Magnesium. v. 25, n. 3, p. 261–266, 1 maio 2018.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 53–60, 2007.

ROGERS, P.; WEBB, G. P. Estimation of body fat in normal and obese mice. **British Journal of Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 83–86, jan. 1980.

ROS, E.; MATAIX, J. Fatty acid composition of nuts – implications for cardiovascular health. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. S2, p. S29–S35, nov. 2006.

ROSBORG, I.; KOZISEK, F. Macro-minerals at Optimum Concentrations – Protection Against Diseases. In: ROSBORG, I.; KOZISEK, F. (Eds.). . **Drinking Water Minerals and Mineral Balance: Importance, Health Significance, Safety Precautions**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 33–61.

ROSENFELD, H. J.; BAARDSETH, P.; SKREDE, G. Evaluation of carrot varieties for production of deep fried carrot chips—IV. The influence of growing environment on carrot raw material. **Food Research International**, v. 30, n. 8, p. 611–618, 1 out. 1997.

ROSENSON, R. S. Management of non-high-density lipoprotein abnormalities. **Atherosclerosis**, v. 207, n. 2, p. 328–335, 2009.

SABLANIA, V.; BOSCO, S. J. D.; BASHIR, M. Extraction process optimization of *Murraya koenigii* leaf extracts and antioxidant properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 12, p. 5500–5508, 1 dez. 2019.

SACKS, F. M.; KATAN, M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. **The American Journal of Medicine**, v. 113 Suppl 9B, p. 13S–24S, 30 dez. 2002.

SAKURABA, H. et al. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. **Diabetologia**, v. 45, n. 1, p. 85–96, 2002.

SANHUEZA, J.; NIETO, S.; VALENZUELA, A. Thermal stability of some commercial synthetic antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 9, p. 933–936, 1 set. 2000.

SANTOS, V. S. DOS et al. Nutraceutical potential of *Byrsonima cydoniifolia* fruits based on chemical composition, anti-inflammatory, and antihyperalgesic activities. **Food Chemistry**, v. 237, p. 240–246, 2017.

SANTOS, J. C. O. et al. Thermal Stability and Kinetic Study on Thermal Decomposition of Commercial Edible Oils by Thermogravimetry. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 4, p. 1393–1398, 1 maio 2002.

SANTOS, S. et al. Pecuária no Pantanal: em busca da sustentabilidade. **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 535–570, 2008a.

SANTOS, S. H. S. et al. Mas Deficiency in FVB/N Mice Produces Marked Changes in Lipid and Glycemic Metabolism. **Diabetes**, v. 57, n. 2, p. 340–347, 1 fev. 2008b.

SEAH, J. Y. H. et al. Consumption of Red Meat, but Not Cooking Oils High in Polyunsaturated Fat, Is Associated with Higher Arachidonic Acid Status in Singapore Chinese Adults. **Nutrients**, v. 9, n. 2, p. 101, fev. 2017.

SEYMOUR, E. M. et al. Altered Hyperlipidemia, Hepatic Steatosis, and Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Rats with Intake of Tart Cherry. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 2, p. 252–259, 1 jun. 2008.

SHAO, W. et al. Association between level of urinary trace heavy metals and obesity among children aged 6–19 years: NHANES 1999–2011. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 12, p. 11573–11581, 1 abr. 2017.

SHI, M. et al. Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes and chronic inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 16–29, 1 mar. 2017.

SHIN, D. et al. Benefits of potassium intake on metabolic syndrome: The fourth Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES IV). **Atherosclerosis**, v. 230, n. 1, p. 80–85, 2013.

SILVA FIGUEIREDO, P. et al. Fatty Acids Consumption: The Role Metabolic Aspects Involved in Obesity and Its Associated Disorders. **Nutrients**, v. 9, n. 10, 22 out. 2017.

SILVA, M. P. D. et al. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, n. 2, jun. 2000.

SKOTTI, E. et al. Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 46–54, 1 fev. 2014.

SORDINI, B. et al. A quanti-qualitative study of a phenolic extract as a natural antioxidant in the frying processes. **Food Chemistry**, v. 279, p. 426–434, 1 maio 2019.

SOTO-ALARCÓN, S. A. et al. Docosaheaxaenoic acid and hydroxytyrosol co-administration fully prevents liver steatosis and related parameters in mice subjected to high-fat diet: A molecular approach. **BioFactors**, v. 45, n. 6, p. 930–943, 2019.

SOUSA, C. DE M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 200–208, 1 jul. 2007.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2015.

TAGHVAEI, M.; JAFARI, S. M. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 3, p. 1272–1282, 1 mar. 2015.

TAKASAWA, R. et al. Piceatannol, a natural trans-stilbene compound, inhibits human glyoxalase I. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 5, p. 1169–1174, 1 mar. 2017.

TASCILAR, M. E. et al. Trace Elements in Obese Turkish Children. **Biological Trace Element Research**, v. 143, n. 1, p. 188–195, 1 out. 2011.

TENA, N.; GARCÍA-GONZÁLEZ, D. L.; APARICIO, R. Evaluation of Virgin Olive Oil Thermal Deterioration by Fluorescence Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10505–10511, 25 nov. 2009.

TINKOV, A. A. et al. Aluminium levels in hair and urine are associated with overweight and obesity in a non-occupationally exposed population. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 56, p. 139–145, 1 dez. 2019.

TIWARI, A. K. et al. Mitigation of starch and glucose-induced postprandial glycemic excursion in rats by antioxidant-rich green-leafy vegetables' juice. **Pharmacognosy magazine**, v. 9, n. Suppl 1, p. S66, 2013.

TREVISAN, M. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. Rev. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

TURNLUND, J. R. et al. Copper status of young men consuming a low-copper diet. **The American journal of clinical nutrition**, v. 65, n. 1, p. 72–78, 1997.

VALDERRAMA, P. et al. A procedure to facilitate the choice of the number of factors in multi-way data analysis applied to the natural samples: Application to monitoring the thermal degradation of oils using front-face fluorescence spectroscopy. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Chimimétrie 2009, Paris, France, 30 November - 1 December 2009. v. 106, n. 2, p. 166–172, 15 abr. 2011.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 2007.

VASUDEVAN, H.; MCNEILL, J. H. Chronic Cobalt Treatment Decreases Hyperglycemia in Streptozotocin-Diabetic Rats. **BioMetals**, v. 20, n. 2, p. 129–134, 1 abr. 2007.

VILLANUEVA-MILLÁN, M.; PÉREZ-MATUTE, P.; OTEO, J. Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 71, n. 3, p. 509–525, 2015.

WALTERS, M. N. Adipose atrophy of the exocrine pancreas. **The Journal of pathology and bacteriology**, v. 92, n. 2, p. 547–557, 1966.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciencia & saude coletiva**, v. 15, p. 185–194, 2010.

WANG, X. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 8, p. 1240–1247, ago. 2014.

WANG, Y. et al. Significant Beneficial Association of High Dietary Selenium Intake with Reduced Body Fat in the CODING Study. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 24, jan. 2016.

WENZEL, B. J.; STULTS, H. B.; MAYER, J. Hypoferraemia in obese adolescents. **Lancet**, v. 2, p. 327–328, 1962.

WESSELS, I.; MAYWALD, M.; RINK, L. Zinc as a Gatekeeper of Immune Function. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1286, dez. 2017.

WHELAN, J.; FRITSCHKE, K. Linoleic Acid1. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 311–312, 6 maio 2013.

WOLFENDEN, L. et al. The challenge for global health systems in preventing and managing obesity. **Obesity Reviews**, v. 20, n. S2, p. 185–193, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Trace elements in human nutrition and health. 1996.

XU, D.-P. et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 96, jan. 2017.

XU, H.; CHEN, J. Commercial quality, major bioactive compound content and antioxidant capacity of 12 cultivars of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 6, p. 1057–1063, 2011.

YANG, Y. et al. Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 141–147, 1 fev. 2016.

YANOFF, L. B. et al. Inflammation and iron deficiency in the hypoferraemia of obesity. **International Journal of Obesity**, v. 31, n. 9, p. 1412–1419, set. 2007.

YON, B. A.; JOHNSON, R. K. US and Canadian Dietary Reference Intakes (DRIs) for the macronutrients, energy and physical activity. **Nutrition Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 176–181, 2005.

YU, H. et al. Antioxidant activities of aqueous extract from *Stevia rebaudiana* stem waste to inhibit fish oil oxidation and identification of its phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 232, p. 379–386, 1 out. 2017.

ZELMAN, K. The great fat debate: a closer look at the controversy-questioning the validity of age-old dietary guidance. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 111, n. 5, p. 655–658, maio 2011.

ZEMEL, M. et al. Dairy augmentation of total and central fat loss in obese subjects. **International journal of obesity**, v. 29, n. 4, p. 391, 2005.

ZEMEL, M. B. et al. Regulation of adiposity by dietary calcium. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 9, p. 1132–1138, 2000.

ZHANG, X. et al. Effects of magnesium supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized double-blind placebo-controlled trials. **Hypertension**, v. 68, n. 2, p. 324–333, 2016.

ZHANG, X. et al. A positive association between dietary sodium intake and obesity and central obesity: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2006. **Nutrition Research**, v. 55, p. 33–44, 1 jul. 2018.

ZHAO, T. et al. Zinc and its regulators in pancreas. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 3, p. 453–464, 1 jun. 2019.

ZHAO, X. et al. Changes of the plasma metabolome during an oral glucose tolerance test: is there more than glucose to look at? **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 2, p. E384–E393, 1 fev. 2009.

ZHENG, Y. et al. The role of zinc, copper and iron in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications: therapeutic effects by chelators. **Hemoglobin**, v. 32, n. 1–2, p. 135–145, 2008.

ZHOU, B. et al. Dietary intake of manganese and the risk of the metabolic syndrome in a Chinese population. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 5, p. 853–863, set. 2016.

CAPÍTULO DOIS

PRÓLOGO

Embora o projeto inicial deste trabalho contemplasse apenas a caracterização do fruto da canjiqueira, discorrida no capítulo um, houve a oportunidade de realizar um período de doutorado sanduíche na Universidade de Nebraska Medical Center (UNMC). Com o impedimento do envio de amostras de plantas e de amostras biológicas devido a empecilhos burocráticos com a Lei de Patrimônio Genético, o projeto inicial para este quesito foi modificado. Desta forma, o capítulo dois é dedicado ao projeto executado na UNMC, de síntese de peptídeos.

RESUMO

O uso de peptídeos sintéticos na indústria farmacêutica possui vasta abrangência, com aplicação de fármacos em diversos setores, como a produção de antimicrobianos e de medicina regenerativa. Peptídeos antimicrobianos (AMP) são moléculas do sistema imune inato, estando presente em organismos de todos os reinos, possuindo ao amplo espectro de ação antimicrobiana. Enquanto peptídeos utilizados em medicina regenerativa, são capazes de criar estruturas que mimetizam não apenas a arquitetura, mas a química da matriz extracelular, e após este estímulo inicial, o processo biológico promove a formação de novos tecidos, sem deixar vestígios de componentes não naturais ao organismo. Este trabalho teve como objetivo propor e sintetizar peptídeos análogos à Citropina 1.1 (AMP natural) e testá-los quanto a sua ação antimicrobiana *in vitro*; além de propor e sintetizar peptídeos análogos ao peptídeo P12 e avaliá-los em relação à sua citotoxicidade, ação proliferativa e resgates de células estressadas por indução de peróxido de hidrogênio. O peptídeo com maior ação antimicrobiana é o DAN-1-13, com substituição por Sarcosina, 1-Naftil-L-Alanina e Lisina nas posições 1, 3 e 11, respectivamente. Os peptídeos análogos da fração P12 utilizados para medicina regenerativa não apresentam toxicidade em nenhuma concentração, porém o Peptídeo 6 tem ação estática para crescimento celular. Em relação à ação proliferativa dos análogos do P12, o P12 apresenta atividade semelhante à Fibronectina, enquanto o Peptídeo 2 superou estes resultados. A mera presença do PDGF-BB foi suficiente para estimular o crescimento celular.

ABSTRACT

The use of synthetical peptides in the pharmaceutical industries is vast, with application in drugs of several areas, such as the production of antimicrobial peptides (AMP) and the use of peptides in regenerative medicine. AMPs are molecules from the innate immune system present in organisms of all kingdoms, with a broad antimicrobial spectrum. Peptides in regenerative medicine can create structures that mimic not only the architecture but also the chemistry of the extracellular matrix. After this first stimulus, the biological process takes over and promotes the production of new tissues, without leaving a trace of unnatural components in the organism. This work aimed at proposing and synthesizing analog Citropin 1.1 peptides (a natural AMP) and test them regarding their antimicrobial activity *in vitro*; other than that, to propose and synthesize P12 peptide analogs and evaluate them regarding their cytotoxicity, proliferative action, and rescue ability in cells stressed by hydrogen peroxide. The peptide with higher antimicrobial activity was DAN-1-13, with a replacement with a Sarcosine, a 1-Naphtyl-Alanine, and a Lysine in the positions 1, 3, and 11, respectively. The P12 analog peptides used in regenerative medicine did not show toxicity at any tested concentration. However, peptide 6 presented static action for cell growth. Considering the proliferative activity of P12 peptide analogs, the P12 shows similar results than Fibronectin, while peptide 2 overcame these results. The simple presence of PDGF-BB was enough to promote cellular proliferation.

1. INTRODUÇÃO

Peptídeos sintéticos são importantes entidades moleculares na pesquisa biomédica; podendo ser preparados em diversos formatos supramoleculares, como nano tubos e micelas, dentro outros, contendo variadas funções químicas, podendo ser customizados para funções específicas (ALBADA; METZLER-NOLTE, 2016).

A síntese de peptídeos é uma área central na indústria farmacêutica, provendo tanto medicamentos, quanto compostos primários para a preparação de fármacos peptídeo-miméticos e não-peptídeos (DOMALAON; ZHANEL; SCHWEIZER, 2016).

A terapêutica envolvendo peptídeos é reconhecida como sendo extremamente específica em seus locais de ligação em tecidos *in vivo*, resultando em um efeito majoritariamente potente e seletivo, enquanto possuem poucos efeitos colaterais negativos (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015; KASPAR; REICHERT, 2013).

No ano de 2017, nos Estados Unidos, mais de 60 drogas derivadas de peptídeos haviam sido aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA), cerca de 140 drogas em testes clínicos e mais de 500 em testes pré-clínicos (B. LAWRENSON; ARAV; NORTH, 2017). O mercado de fármacos baseadas em peptídeos, para o ano referido, estava estimado em US\$ 14,1 bilhões de dólares, com perspectiva de crescimento para os próximos anos (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015).

Desta forma, a aplicação dos peptídeos deve representar uma grande fatia no futuro da descoberta de drogas (GOODWIN; SIMERSKA; TOTH, 2012); despertando interesse na pesquisa e desenvolvimento de produtos.

Este trabalho focou sua breve investigação nas áreas de peptídeos com uso antimicrobiano e peptídeos em medicina regenerativa. Peptídeos antimicrobianos (AMP) são moléculas do sistema imune inato, com uma gama de AMP tendo sido isolados de espécies de todos os reinos. Geralmente, os AMP possuem capacidade antimicrobiano de amplo espectro, lisando as células microbianas por interação com sua membrana. Além disso, são capazes de influenciar em processos como mediação da inflamação, proliferação celular, indução imune, cicatrização de feridas, quimiotaxia, entre outros (KOCZULLA; BALS, 2003). Portanto, os AMP sintéticos são uma estratégia que visam superar a resistência bacteriana, logo que os antibióticos atuais não tem sido efetivos em destruir as superbactérias, necessitando de outros agentes de controle (BAHAR; REN, 2013).

Peptídeos podem ser úteis em medicina regenerativa, ao utilizá-los como unidades de blocos para criar estruturas supramoleculares que emulam não apenas a arquitetura, mas também a química da matriz extracelular na biologia de mamíferos. Após o início da resposta regenerativa *in vivo* a degradação inata, decorrente da estrutura destes sistemas permite que o processo biológico natural promova a formação de novos tecidos sem deixar traços de componentes não naturais. Estas matrizes bioativas podem ligar-se ou mimetizar fatores de crescimento ou outros ligantes de proteínas para provocar uma resposta celular, promovendo respostas mecânico-biológicas específicas, além de direcionarem células para o sítio de migração desejado (RUBERT PÉREZ et al., 2015).

Desta forma, o estudo da aplicação de peptídeos antimicrobianos e peptídeos em medicina regenerativa se torna relevante devido sua abordagem em relação a problemas conhecidos na medicina, como resistência microbiana e problemas de compatibilidade de drogas, justificando este estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Peptídeos antimicrobianos

A rápida e crescente resistência bacteriana frente ao uso de antibióticos comuns sugere que, sem a tomada de uma ação urgente, é possível estar chegando a “era pós-antibiótico”, na qual tratamentos que eram eficientes, deixarão de se tornar relevantes, deixando de ser efetivos. Devido ao número limitado de antibióticos disponíveis e da similaridade do seu espectro e modo de ação, pesquisas são realizadas de forma intensiva para identificar terapias capazes de atuar como agentes anti-infecciosos e em associação com outros componentes, ou como estratégias preventivas, que incluem anticorpos atacando fatores de virulência, probióticos e vacinas (CZAPLEWSKI et al., 2016).

Entre os novos candidatos a medicamentos com este propósito, os peptídeos antimicrobianos (AMP) têm chamado a atenção, uma vez que estão presentes em teoricamente todos os organismos (MAHLAPUU et al., 2016), incluindo unicelulares, insetos e outros invertebrados, plantas, anfíbios, pássaros, peixes e mamíferos, incluindo humanos (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006); sendo muitas vezes a primeira linha de defesa contra infecções (HANCOCK; LEHRER, 1998).

Os AMP são mecanismos de defesa evolucionários antigos, sendo estruturas relativamente pequenas, contendo uma sequência entre 12 e 100 aminoácidos, são predominantemente positivamente carregados (com uma carga líquida entre +2 e +9)

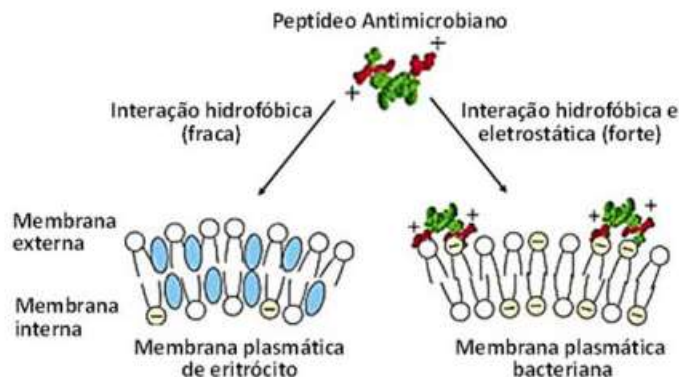
(JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006). Sua ampla distribuição pelos reinos vegetal e animal sugere que peptídeos antimicrobianos serviram como um mecanismo fundamental no papel da evolução de organismos multicelulares complexos; e apesar de sua antiguidade, eles se mantêm como efetivas armas de defesa, confundindo a crença geral de que bactérias, fungos e vírus podem desenvolver resistência a qualquer substância concebível (ZASLOFF, 2002).

2.1.1. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos

O alvo de ação dos AMP ataca uma clara e fundamental diferença entre a característica das membranas de micróbios e de animais multicelulares. As membranas bacterianas são organizadas de tal forma que a camada externa da bicamada lipídica é altamente densa em lipídios, com a porção fosfolipídica negativamente carregada. Em contraste, a camada externa da membrana de plantas e animais é composta basicamente de lipídios sem carga, e internamente, grande parte da carga negativa fica direcionada ao citoplasma (EBENHAN et al., 2014; ZASLOFF, 2002). Esta conformação *zwitterion* protege as células de mamíferos da ação dos AMP, conferindo caráter seletivo à ação destes peptídeos (YEAMAN; YOUNT, 2003). Em suma, a interação dos AMP com as células de mamíferos se dá principalmente via interações hidrofóbicas, relativamente fracas em relação às interações eletrostáticas dos AMP e das membranas bacterianas

Em bactérias Gram-positivas, a membrana citoplasmática é cercada por uma grossa camada de peptidoglicano, enquanto a camada de peptidoglicano de bactérias Gram-negativas é fina, e a membrana é composta de duas bicamadas distintas (LIN; WEIBEL, 2016). A membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é rica em fosfolipídios fosfatidilglicerol, cardiolipina e fosfatidilserina, com a cabeça dos grupos negativamente carregadas, com alta afinidade pelas cargas positivas dos AMP (YEAMAN; YOUNT, 2003). A presença de ácido teicóico na parede celular de bactérias Gram-positivas e de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa de bactérias Gram-negativas provém eletronegatividade adicional à essas bactérias (EBENHAN et al., 2014; LAI; GALLO, 2009). O mecanismo de ação simplificado está representado na Figura 14.

Figura 14. Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos em relação à sua interação com a membrana bacteriana



Fonte: domínio público

Desta forma, o modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) propõe que o mecanismo de ação envolve a interação do peptídeo com a membrana bacteriana, seguido do reposicionamento de lipídios, alteração da estrutura da membrana, e, em certos casos, a entrada do peptídeo no interior da célula alvo (MATSUZAKI, 1999; SHAI, 1999; YANG et al., 2000). A presença de colesterol na membrana alvo geralmente reduz a atividade antimicrobiana dos peptídeos, que pode ser devido a estabilização da bicamada lipídica ou de interações entre o peptídeo e o colesterol (YANG et al., 2000). Similarmente, supõe-se que o aumento da força iônica, o que geralmente diminui a atividade da maior parte dos AMP, provoca esse efeito ao enfraquecer as interações de cargas eletrostáticas (ZASLOFF, 2002). A força eletrostática entre os AMP catiônicos e a membrana bacteriana aniônica é considerada um determinante crítico para a interação inicial entre o peptídeo e a membrana bacteriana (EBENHAN et al., 2014).

Embora haja um vasto nível de potência, em teoria, todas as catecilidinas e defensinas (AMP naturais) têm efeito antimicrobial direto em condições apropriadas. No entanto, alguns peptídeos possam reter a atividade bactericida *in vitro* sob condições fisiológicas, a atividade de morte direta é frequentemente antagonizada por condições fisiológicas de sal, íons monovalentes e divalentes e soro (BOWDISH et al., 2005). Alguns AMP como as defensinas, nos grânulos de neutrófilos, estão presentes em concentrações que podem garantir sua ação microbicida direta, no entanto, para outros AMP, as baixas concentrações

e a ação antagonista das concentrações fisiológicas de sal é consistente com a interpretação de que alguns AMP agem de maneira alternativa *in vivo* (BROWN; HANCOCK, 2006).

Em condições fisiológicas de peptídeos, sal e soro, os AMP estimulam uma vasta gama de efeitos biológicos relevantes à inflamação, imunidade inata e imunidade adaptativa (HIEMSTRA et al., 2004; YANG et al., 2004) em células imune (neutrófilos e células epiteliais) e em células que ligam os sistemas de imunidade inata e adaptativa (monócitos, macrófagos e células dendríticas) (BROWN; HANCOCK, 2006); ainda, os AMP podem neutralizar a toxina de patógenos (KOSIKOWSKA; LESNER, 2016).

Os efeitos imunomodulatórios dos AMP incluem quimiotaxia, supressão de receptores *toll-like* (TLR)-, produção de citocinas pró inflamatórias e de atividade anti endotoxina, que em conjunto previnem a excessiva e prejudicial resposta do pró inflamatória, dentre elas, a sepse (YEUNG; GELLATLY; HANCOCK, 2011).

Como um exemplo destes efeitos imunomodulatórios, os AMP LL-37 e a lactoferrina bovina demonstraram atividade inibitória do LPS (TLR4-), indução da secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de interleucina 6 (IL-6), respectivamente em células *Human Monocytic Leukaemia* (THP-1) e, além disso, o LL-37 foi capaz de suprimir o ácido lipoteicóico (LTA) (TLR-2) e induziu a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 em monócitos primários (MOOKHERJEE et al., 2006).

Alguns dos mecanismos propostos para a imunomodulação derivada dos AMP em células de mamíferos como a ligação direta dos AMP na superfície celular e modificação local de parte da membrana celular bacteriana que contém receptores desencadeiam efeitos de ativação de sinalização celular e também indiretamente alteram o estado de ativação e função do receptor (LAI; GALLO, 2009).

Além disso, AMP como a nisina, pode se ligar ao lipídeo transportador de peptideoglicano, inibindo a síntese e regeneração da parede celular e, conseqüentemente a divisão celular (HALE; HANCOCK, 2007; SAHL et al., 2005).

2.1.2. Potencial para desenvolvimento de resistência aos AMP

O desenvolvimento de resistência bacteriana globalizado em relação aos AMP é considerado improvável, uma vez que o mecanismo de ação dos AMP envolve alvos múltiplos de baixa afinidade, invés de um alvo definido de alta afinidade, típico de antibióticos convencionais; o que torna difícil para micróbios se defenderem com um único mecanismo de resistência (FJELL et al., 2012).

Em particular, dado que a membrana celular bacteriana é o alvo primário dos AMP, é um desafio para os micróbios para preservar a membrana celular funcionante e a integridade de sua estrutura e ao mesmo tempo evitar a atividade disruptiva de membrana dos AMP (LAI; GALLO, 2009). No entanto, dados experimentais emergiram descrevendo mecanismos nos quais bactérias podem desenvolver resistência em relação aos AMP sob pressão de seleção *in vitro* (LOFTON et al., 2013; PRÄNTING et al., 2008).

2.1.3. Desafios e limitações associados ao uso de AMP na prática clínica

Uma vez que a atividade antimicrobiana dos AMP depende diretamente do tipo de ambiente em que este se encontra, existem muitas discrepâncias entre os resultados encontrados *in vitro* e *in vivo*, o que torna a predição dos resultados clínicos muito difícil (MAHLAPUU et al., 2016). Diversos compostos AMP reportaram efeito antimicrobiano em modelos animais, enquanto pareciam ser inativos ou minimamente ativos em modelos *in vitro* na presença de concentrações fisiológicas de sal e/ou soro (MAITI et al., 2014; MYHRMAN et al., 2013; RIVAS-SANTIAGO et al., 2013).

Além da baixa correlação entre os modelos *in vitro* e *in vivo*, os AMP exibem um problema limitante fundamental, sendo este, a baixa estabilidade metabólica. As drogas peptídicas geralmente apresentam baixa biodisponibilidade oral devido à ação enzimática pré-sistêmica e baixa penetração na mucosa intestinal, tornando sua administração oral pouco viável. Além disso, a administração parenteral de peptídeos resulta em meia-vida baixa, devido a rápida degradação de enzimas proteolíticas no plasma sanguíneo, seguido de acelerada remoção da circulação pelos *clearance* hepático e renal (VLIEGHE et al., 2010).

Métodos para contornar a farmacocinética dos AMP e aumentar sua estabilidade, como o encapsulamento pode resultar na liberação incompleta do composto, pois o peptídeo pode interagir com as paredes do seu nano carreador. O encapsulamento em um sistema hidrofóbico, contendo uma fase aquosa pode causar o vazamento dos peptídeos do sistema (MOHAMMADI-SAMANI; TAGHIPOUR, 2015).

Desta forma, a aplicação local dos AMP é a forma de administração mais predominante, na forma de cremes e emolientes, administração no local da ferida ou da cirurgia, aplicação na mucosa ou *spray* nasal. No entanto, mesmo com aplicação local, os peptídeos estão sujeitos à degradação enzimática no tecido alvo. Assim, algumas estratégias tecnológicas são utilizadas para melhorar a entrega e estabilidades das drogas AMP *in vivo* (MAHLAPUU et al., 2016).

2.1.4. Estratégias para formulações mais efetivas de AMP

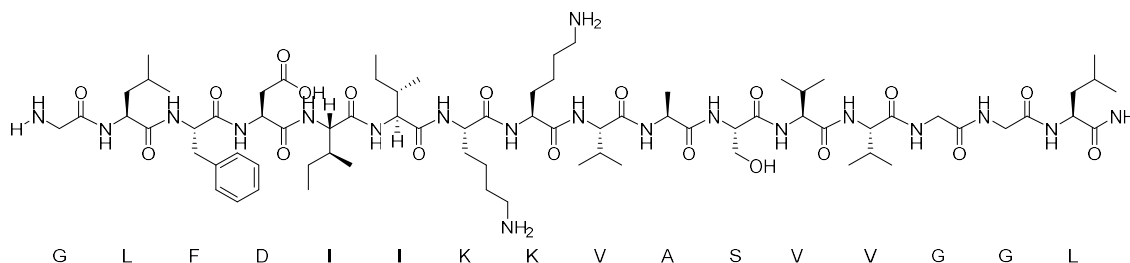
A baixa estabilidade de peptídeos devido à proteólise em ambiente fisiológico torna sua viabilização como drogas um desafio. Com isso, algumas estratégias conhecidas são utilizadas para otimizar as formulações e estabilidade dos AMP, como por exemplo, a inclusão de D-aminoácidos e de aminoácidos não naturais, e modificações na estrutura do peptídeo (FJELL et al., 2012).

Com exceção da glicina, todos os aminoácidos naturais possuem quiralidade, ou seja, existem na D ou L (BRUNNER; TSUNO; BALÁZS, 2019). A biologia é basicamente homoquiral, construída quase exclusivamente de enantiômeros L, no entanto, D-aminoácidos ocasionalmente são encontrados na natureza, no entanto, isto é extremamente raro. Uma aplicação prática muito útil desta condição é que D-proteínas são altamente resistentes à degradação e possuem baixa imunogenicidade (GARTON et al., 2018; UPPALAPATI et al., 2016).

Outra modificação comum capaz de conferir maior estabilidade aos peptídeos é a modificação da terminação do peptídeo com oligo aminoácidos hidrofóbicos, pois reduz a sensibilidade dos AMP à degradação proteolítica (MALMSTEN et al., 2011). Além disso, o bloqueio das terminações N e C dos AMP por modificações com a acetilação do N terminal ou a amidação do C é frequentemente utilizado para aumentar a resistência em relação às peptidases (RINK et al., 2010).

Milhares de peptídeos AMP já foram identificados até o momento, de acordo com o banco de dados de peptídeos antimicrobianos (“APD”, 2019). Os AMP sintetizados neste estudo são análogos da Citropina 1.1 (GLFDIIKKVASVVGGL) (Figura 15), um AMP natural extraído da pele de um sapo de árvore australiano, da espécie *Litoria citropa*. A Citropina 1.1 já demonstrou ser eficaz contra espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *S. aureus*, *S. epidermis*, *E. faecalis*, *E. coli* e *K. pneumoniae* (BOLAND; SEPAROVIC, 2006).

Figura 15. Estrutura molecular da Citropina 1.1



2.2. Peptídeos em medicina regenerativa

O termo medicina regenerativa engloba áreas com a perspectiva de cura ou de substituição de órgãos ou tecidos danificados, incluindo condições agudas e crônicas (MAO; MOONEY, 2015), com abordagens que compreendem o uso de materiais, células geradas *de novo* e a mistura de ambas as estratégias, substituindo o tecido faltante estrutural ou funcionalmente ou promovendo a regeneração tecidual (BAJAJ et al., 2014).

Para este fim, moléculas biocompatíveis e bioativas, capazes de se auto organizarem, que geram metabólitos conhecidos após sua degradação são os blocos ideais de construção estruturais para reparar tecidos e órgãos. Dentre os principais blocos de construção – açúcares, aminoácidos e ácidos nucleicos – os aminoácidos oferecem a maior gama de variedade e funcionalidade, bem como a capacidade de atuar em sinalização celular, com a rápida e fácil síntese de moléculas complexas. Quando se considera as estruturas secundárias de proteínas, pequenos peptídeos podem ser racionalmente projetados para se auto organizar em uma variedade de nanoestruturas supramoleculares, como esferas, cilindros, tubos e muitas outras morfologias (CUI et al., 2009; CUI; WEBBER; STUPP, 2010; STUPP, 2010).

2.2.1. Matriz extracelular

A utilização de biomateriais sintéticos que mimetizam as estruturas que estão presentes na matriz extracelular (ECM) é uma estratégia válida, pois estes materiais podem prover modificações microambientais promovendo o enxerto celular/tecidual e consequentemente a reparação no tecido local (LANGER; TIRRELL, 2004; PUGLIESE; GELAIN, 2017).

A ECM é uma rede complexa e dinâmica que cerca as células em todos os tecidos, provendo suporte estrutural e mecânico e mediando diversos processos biológicos cruciais para a formação e manutenção de tecidos. A ECM, considerada a “cola” celular é essencial na integridade celular, coesão celular e no crescimento e modelamento de células em tecidos e órgãos com atividade biológica e função mecânica definidas (KOZEL et al., 2006).

O espaço intercelular ocupado pela ECM, que é rico em água, pela afinidade de compostos presentes, como proteoglicanos e glicosaminoglicanos também serve de amortecimento para os tecidos dos efeitos das forças mecânicas, como o esmagamento por carga compressiva (CULAV; CLARK; MERRILEES, 1999).

De um ponto de vista estrutural, os constituintes da matriz extracelular natural são micro e nanoestruturas porosas de diferentes substratos de proteínas fibrilares entrelaçadas

com uma rede de glicosaminoglicanos. As proteínas fibrilares normalmente estão conectadas e extensivamente interligadas umas com as outras, dando origem a uma estrutura resistente à pressão, compressão e estresse mecânico (MUIZNIEKS; KEELEY, 2013).

As células regulam a síntese e secreção, ajudando a direcionar a composição de seus próprios elementos da ECM, portanto, coordenando a deposição de uma matriz específica tecidual durante a embriogênese. Uma vez que a ECM é definida, estímulos ambientais (incluindo sinais bioquímicos e estresse mecânico) continuam a modular a secreção de proteínas matriz que auxiliam a manutenção dos tecidos e a remodelação dinâmica (SUKI; BATES, 2008). Esta influência que as células têm sobre a ECM pode fazer com que a composição da ECM seja modificada, bem como as características de adesão celular (ZEIGER et al., 2012).

Com algumas exceções, os processos morfogenéticos modulados pela ECM falha em injúrias celulares, e a inflamação aguda subsequente resulta na formação de um microambiente hostil. Um exemplo desta falha ocorre na formação do tecido cicatricial, que é rico em colágeno e glicosaminoglicanos, impedindo a regeneração do tecido preexistente (PUGLIESE; GELAIN, 2017).

2.2.2. Materiais ideais em medicina regenerativa

Os materiais para uso em medicina regenerativa devem obedecer a alguns requerimentos: 1) os blocos de composição devem derivar de matrizes biológicas; 2) deve haver a possibilidade de modificar o design das unidades básicas de composição, conforme o objetivo específico; 3) deve haver uma taxa de biodegradação biológica controlada; 4) não devem ser citotóxicos; 5) devem promover interações célula-substrato; 6) não devem provocar ou provocar baixa resposta imune e inflamação; 7) ser relativamente baratos e passíveis de fabricação em escala industrial, com materiais reprodutíveis de produção, purificação e inflamação; 8) serem imediatamente transportáveis no organismo; 9) ser quimicamente compatíveis com soluções aquosas e condições fisiológicas; 10) ser passível de integração com outros materiais no organismo (GELAIN; HORII; ZHANG, 2007).

2.2.3. Peptídeos como estruturas similares à matriz extracelular

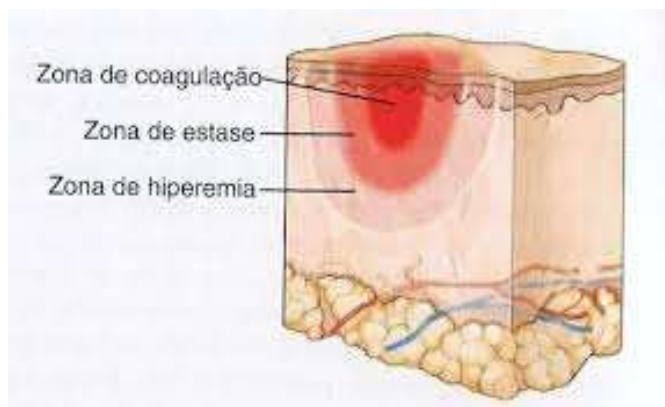
Nas últimas duas décadas o uso de peptídeos, especialmente peptídeos auto organizáveis têm sido investigados como uma opção de estruturas biofísicas e biomecânicas sob medida, com a possibilidade de facilitar a reparação tecidual (PUGLIESE; GELAIN, 2017).

Ainda que um grande número de materiais tenha sido explorado para aplicação em biomateriais, peptídeos representam particularmente uma forma popular e funcional para este objetivo por algumas razões. Primeiramente, os peptídeos são sinteticamente acessíveis devido à automação do método da síntese em fase sólida e purificados com HPLC padrão. Em segundo lugar, devido ao seu tamanho pequeno, os peptídeos podem ser desenhados para se auto organizarem anexando ou modificando engenhosamente componentes a fim de se criar estruturas supramoleculares. Em terceiro lugar, um número de motivos estruturais que ocorrem naturalmente é conhecido em proteínas e podem ser aplicados aos peptídeos por livre escolha, através da modificação da sequência de aminoácidos. Por fim, é possível identificar sequências funcionais capaz de realizar sinalização celular e incorpora-las na estrutura do peptídeo e desta forma imbuí-lo de potente atividade biológica (MATSUURUA, 2014; RUBERT PEREZ et al., 2017).

2.2.4. Peptídeos que mimetizam estruturas da ECM no tratamento de queimaduras

Injúrias causadas por queimaduras são um risco no cuidado de saúde, com a severidade e mortalidade dessas injúrias aumentando de acordo com a área total corporal afetada. Enquanto o dano tecidual na área primária afetada é usualmente irreparável, uma segunda injúria, devido a progressão da ferida da queimadura é favorável a intervenção reparativa (SALIBIAN et al., 2016). Zonas de tecido queimado foram propostos em 1953 (JACKSON, 1953), classificando-as em três diferentes estádios (Figura 16): zona central (*core*) ou zona de coagulação, com dano tecidual irreversível; fechado por uma zona de estase, com sangue estagnado e tecido com baixa perfusão; cercado por uma zona hiperêmica (SCHMAUSS et al., 2015). Embora a área de estase tecidual ainda esteja disponível, podendo ser recrutada para a zona central, assim, espalhando a ferida. Esta ocorrência é chamada de progressão de queimadura secundária (JACKSON, 1953). Enquanto o conhecimento em relação à patologia da progressão da queimadura ainda não é completamente compreendida, é notável que apenas algumas terapias tratam diretamente as queimaduras secundárias (SALIBIAN et al., 2016), sendo que a medicina regenerativa é um dos campos com perspectiva para abordar este tipo de injúria.

Figura 16. Representação de zonas de tecido queimado

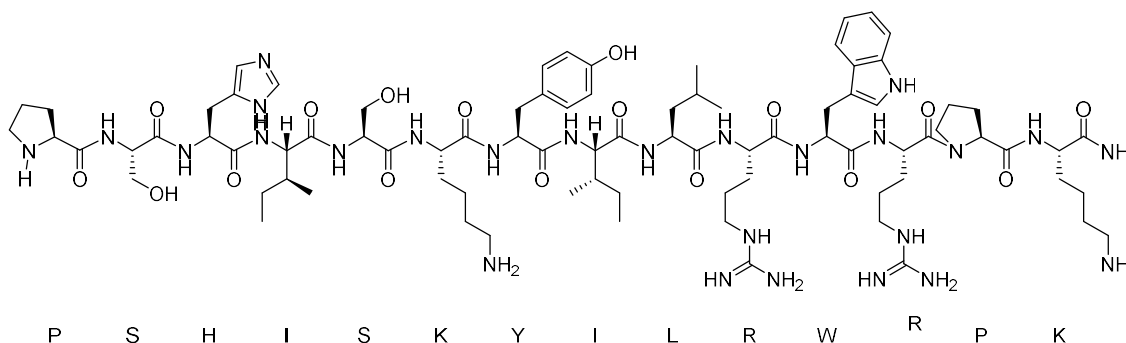


Fonte: domínio público

A fibronectina (FN) é uma proteína da ECM que está aumentada em diversas circunstâncias, como o desenvolvimento patológico de tecidos e na cicatrização de feridas. A FN é uma proteína capaz de se ligar a um diferente número de moléculas, como outros componentes do ECM, moléculas de sinalização, componentes de adesão celular e fatores de crescimento (ZHU; CLARK, 2014; ZOLLINGER; SMITH, 2017).

O P12 (PSHISKYILRWPK) (Figura 17) é um peptídeo constituído por 14 resíduos derivado da Anastelina, uma FN do tipo 1, domínio III, e demonstrou ligar-se ao Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas-BB (PDGF-BB), aumentando a sobrevivência de células *Adult Human Dermal Fibroblast* (AHDF) “Células fibroblásticas de adultos humanos” sob privação de soro com estressores oxidativos ou endoplasmáticos e limitou a injúria causada em modelo animal de queimadura utilizando pente quente (*hot comb model*) (ZHU; CLARK, 2014).

Figura 17. Estrutura molecular do peptídeo P12



A capacidade do peptídeo P12 de aumentar a proliferação celular *in vitro* foi atribuída à sua ligação ao PDGF. Embora o P12 seja uma fração derivada da Anastelina, um composto

natural, não significa que o composto possua a melhor performance em capacidade de ligação, proliferação celular, toxicidade e estabilidade do que peptídeos sintéticos. Desta forma, foram propostos alguns análogos do peptídeo P12, os quais foram testados em relação à sua toxicidade, proliferação celular e testes de estresse.

Ainda, para os peptídeos antimicrobianos, foram propostas modificações estruturais, os quais foram sintetizados, e testados em relação à sua ação antimicrobiana *in vitro*.

3. OBJETIVOS GERAIS

Sintetizar compostos AMP e peptídeos de medicina regenerativa com modificações estruturais que podem ser mais eficazes do que sua matriz origem.

3.1. Objetivos específicos

Propor modificações racionais na estrutura da Citropina 1.1 que podem favorecer a eficácia da ação dos peptídeos com ação antimicrobiana.

Sintetizar peptídeos análogos da Citropina 1.1 e realizar testes preliminares de atividade antimicrobiana.

Propor modificações racionais na estrutura do peptídeo P12 que podem favorecer a eficácia da ação dos peptídeos com ação regenerativa.

Sintetizar peptídeos análogos do P12.

Realizar teste *in vitro* de citotoxicidade de análogos do peptídeo P12.

Realizar teste *in vitro* de proliferação celular com análogos do peptídeo P12.

4. MÉTODOS

4.1. Nomenclatura dos peptídeos

A sequência dos peptídeos foi descrita utilizando o código de uma letra para os aminoácidos naturais. Para os aminoácidos especiais, foi utilizado o código de 3 letras. A estrutura de cada aminoácido utilizado está presente nos anexos.

4.2. Síntese e purificação de peptídeos (AMP e de medicina regenerativa)

Os peptídeos foram sintetizados utilizando Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPPS) em *Rink Amide Resin AM* em sintetizador automático Focus XC (AAPTEC, Louisville, KY), em uma escala de 0,25 mmol. A resina foi previamente encharcada em diclorometano (DCM) por 30 minutos. O grupo Fmoc foi removido utilizando uma mistura de 20% de 4-metil piperidina em dimetilformamida (DMF). Após a desproteção a resina foi lavada duas vezes com DMF por 10 minutos. Os aminoácidos necessários foram adicionados para alcançar a sequência desejada. Sempre após o acoplamento de um novo aminoácido, foi realizada nova desproteção. O peso molecular de cada composto foi confirmado por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI TOF) (SCIEX, Ontario, Canada). A purificação de peptídeos foi realizada utilizando HPLC preparativo utilizando 0,1 % de ácido trifluoracético (TFA) em água e 0,1 % de TFA em acetonitrila no sistema do HPLC (Agilent, Santa Clara, CA), com coluna em fase reversa (coluna Kinetex 5 u XB-C18 100 A, 150 X 30.0 mm).

4.3. Ensaios bacterianos

4.3.1. *Screening*

Os peptídeos antimicrobianos foram testados contra os seguintes patógenos de origem ATCC ou isolados clínicos: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Inicialmente os peptídeos foram submetidos à teste de *screening*, pela susceptibilidade aos antimicrobianos por difusão em disco, onde a Vancomicina foi utilizada como controle positivo.

Os peptídeos que apresentaram ação antimicrobiana nas concentrações de 1024 µg/mL e de 512 µg/mL foram identificados como A e B, respectivamente. Os peptídeos que apresentaram atividade inibitória (presença de halos) foram selecionados para os testes de concentração inibitória mínima (MIC) e de concentração bactericida mínima (MBC).

4.3.2. Testes de MIC e MBC

Os testes de MIC foram realizados em triplicata nas cepas de *S. aureus* HU25 e USA300. Brevemente: em uma placa de 96 poços as cepas de bactérias foram semeadas em caldo Mueller Hinton (MHB). Um branco foi realizado, apenas com MHB, para subtração de *background*. O controle negativo foi realizado, contendo bactérias semeadas e meio MHB. O controle positivo foi realizado com antibiótico (Vancomicina) e MHB. As bactérias foram tratadas com uma concentração de peptídeos entre 4 – 128 µL, além do meio MHB.

O teste MBC foi calculado utilizando as concentrações do teste MIC em que foi possível inibir 100 % do crescimento bacteriano (para cada concentração) em subcultura Mueller Hinton Agar. O MBC foi determinado como a menor dose utilizada neste teste que inibiu o crescimento bacteriano.

4.3.3. Ensaio celular

4.3.3.1. Teste de toxicidade (ensaio MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio))

Células imortalizadas de queratinócitos humanos (HaCaT) foram cultivados em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% penicilina/estreptomicina. Células da passagem 3 foram semeadas em placa transparente de 96 poços de fundo chato, totalizando o volume de 100 µl, em uma densidade de 5000 células por poço, sob atmosfera controlada de 37 °C e 5% de CO₂, por 24 h previamente a qualquer tratamento. As amostras testadas (n = 3) foram diluídas para alcançar a concentração final entre 8 e 512 µg/ml, onde, cada concentração diluída era metade da anterior. As placas contendo os compostos e controle, com apenas o meio (volume final 100 µl) foram incubadas por 24 h e incubadas posteriormente com a adição de 50 µl de solução de MTT por 2 h. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µl de sulfóxido de dimetila (DMSO) para dissolver os cristais de formazan. A absorbância foi lida no leitor de placas AccuSkan, Multi FC (ThermoFisher Scientific) com comprimento de onda de 590 nm.

4.3.3.2. Teste de proliferação celular (ensaio XTT - (2,3-bis- (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2H-tetrazólio-5-carbonilida))

Células isentas de fibronectina (FN -/- null) foram gentilmente doadas pelo Professor Doutor Deane Mosher, da Universidade de Winsconsin-Madison, sendo cultivadas conforme metodologia descrita acima para as células HaCaT. Células FN -/- null da oitava passagem foram semeadas em placa transparente de fundo chato de 96 poços na densidade

de 4000 células por poço, com volume final de 100 µl por poço, em atmosfera controlada de 37 °C e 5% de CO₂, 24 h antes do tratamento. Cada composto (n = 3) foi testado nas concentrações 0,5 µM, 0,25 µM e 0,125 µM, com ou sem a adição de PDGF-BB e foi realizado um grupo controle (n = 3). Além disso, um grupo com Fibronectina a 0,125 µM e um grupo com Fibronectina 0,125 µM + PDGF-BB foi utilizado como um controle positivo (n = 3) para ligação ao PDGF-BB. As placas foram incubadas com volume final de 100 µl/poço por 24 h. Após este período, foram adicionados 50 µl de solução de XTT e as células foram reincubadas por 4h. A absorbância foi lida em leitor de placas AccuSkan, Multi FC (ThermoFisher Scientific) com comprimento de onda de 450 nm e comprimento de onda de excitação de 650 nm.

4.3.3.3. Leitura dos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular em aparelho Incucyte

Para o teste de toxicidade, as células foram semeadas e tratadas da mesma forma do que para o ensaio MTT (n = 3) e acompanhadas por 96 h. Para o teste de proliferação celular, as células foram semeadas à densidade de 2000 células por poço e tratadas com os peptídeos em concentrações variando entre 0,125 µM a 0,500 µM e acompanhadas em leitor Incucyte por 96 h e analisados no software Incucyte Analysis®.

4.3.3.4. Teste de stress induzido por H₂O₂

O teste de stress foi realizado em células fibroblásticas da derme de adultos humanos (AHDF) conforme metodologia descrita por Lin et al (2014). Brevemente, as células AHDF foram cultivadas em DMEM e semeadas na densidade de 2000 células por poço. Sob ausência de soro, as células foram desafiadas com 15µM de H₂O₂ acrescida de diferentes concentrações de cada peptídeo (n = 3) (concentrações variando entre 0,125 µM e 0,500 µM) e deixadas de um dia para o outro. O controle foi realizado apenas com meio de cultura DMEM. A viabilidade celular foi detectada utilizando o teste XTT.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Peptídeos antimicrobianos

A Tabela 13 apresenta as modificações estruturais (na sequência de aminoácidos) realizadas nos peptídeos análogos da Citropina 1.1.

Tabela 13. Modificações na sequência de aminoácidos nos peptídeos análogos da Citropina 1.1.

Peptídeo	Sequência de aminoácidos*	Fórmula química	Peso molecular (kDa)
Citropina 1.1	GLFDIIKKVASVVGGL	C ₇₆ H ₁₃₁ N ₁₉ O ₁₉	1615
DAN-1-13	Sar-L-1Nal- DVIRKVAKVIGGL	C ₈₆ H ₁₄₉ N ₂₃ O ₁₆	1761,28
DAN-1-71A	SarLWKVIRKVAibKVIAibGL	C ₈₅ H ₁₅₂ N ₂₄ O ₁₆	1792,34
DAN-1-71B	Sar-L-Phe(3Cl)- KVIRKVAibKVIAibGL	C ₈₇ H ₁₅₄ ClN ₂₃ O ₁₆	1787,75

*Aminoácidos representados pelo código de uma letra para aminoácidos naturais e código de três letras para aminoácidos não naturais.

Os peptídeos análogos da Citropina 1.1 foram testados contra duas cepas de MRSA (Tabela 14), sendo que DAN-1-13 apresentou maior atividade bactericida dentre todos os compostos. Além disso, foi o único composto que apresentou atividade contra MRSA cepa HU25. Os compostos DAN-1-71A e DAN-1-71B apresentaram atividade em concentrações mais elevadas contra a cepa USA 300. Ainda, DAN-1-13 apresentou atividade com maior potência de todos os análogos de Citropina 1.1 propostos por Almeida et al., (2019), com menor MIC de 8 µg/mL. É determinante ressaltar que a cepa testada neste trabalho foi a MRSA JE2, portanto, não é possível estabelecer uma comparação direta, ainda que o composto tenha sido efetivo contra duas diferentes cepas.

Tabela 14. Atividade antimicrobiana dos peptídeos análogos da Citropina 1.1 em cepas de *S. aureus* MRSA

Peptídeo	HU25		USA 300	
	MIC	MBC	MIC	MBC
DAN-1-13	16 µg/mL	32 µg/mL	4 µg/mL	8 µg/mL
DAN-1-71A	NA	NA	64 µg/mL	128 µg/mL
DAN-1-71B	NA	NA	128 µg/mL	512 µg/mL

NA – os peptídeos não demonstraram atividade

Em relação às cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp, nenhum peptídeo manifestou atividade, o que pode demonstrar certa seletividade dos compostos em relação à atividade bactericida.

No que diz respeito às modificações estruturais, todos os peptídeos apresentam uma Sarcosina na face N terminal em substituição à Glicina. A Sarcosina é um amino ácido que ocorre naturalmente, possuindo uma terminação N-metilada (YAMAMOTO et al., 2013). A metilação de um aminoácido na terminação N do peptídeo é uma estratégia amplamente utilizada para conferir estabilidade ao peptídeo, uma vez que reduz a clivagem e inativação por peptidases na borda em escova dos enterócitos, aumentando sua biodisponibilidade (BIRON et al., 2008; YU et al., 1997). A metilação na terminação amina impediu o crescimento bacteriano no estudo de de ALMEIDA et al., (2019). Desta forma, a Sarcosina pareceu surtir um efeito mais adequado na atividade antimicrobiana.

Pequenas alterações estruturais perto da ligação peptídica cindível resultam em significantes mudanças conformacionais, a implantação de aminoácidos não naturais como a 1-naftil-L-alanina é uma estratégia utilizada para aumentar a estabilidade de um peptídeo (GENTILUCCI; DE MARCO; CERISOLI, 2010), o que pode ter aumentado a ação do composto. A substituição de uma Fenilalanina por um Triptofano apresenta um aminoácido mais hidrofóbico. O Triptofano é conhecido por facilitar as interações entre as hélices anfipáticas e a superfície da membrana de bactérias (WON et al., 2002). A troca da Fenilalanina pela 3-Cl-Fenilalanina favorece à auto-organização do peptídeo e a formação de estruturas secundárias (RYAN; ANDERSON; NILSSON, 2010). Este tipo de avaliação é importante para verificar como as estruturas secundárias interferem na ação deste AMP, que no caso, não favoreceu a atividade do peptídeo.

Portanto, a modificação na posição 3, originalmente uma Fenilalanina, que foi substituída por um 1-Naftil-L-alanina, Triptofano e 3-Cl Fenilalanina nos peptídeos DAN-1-13, DAN-1-71A e DAN-1-71B, respectivamente foi especialmente efetiva quando aumentou a robustez da cadeia lipídica. Isto é particularmente pertinente ao se comparar que a ação da 1-Naftil-Alanina com a ação do Triptofano, que embora tenha duas cadeias aromáticas, possui a presença de um nitrogênio, que aumenta a polaridade do composto e um carbono a menos. Da mesma maneira, a Fenilalanina, resíduo com mais hidrofílico, com a inclusão do Cloro, aumentando a polaridade, reduziu a ação do peptídeo.

A substituição do Ácido aspártico pela Lisina pareceu reduzir a atividade dos peptídeos, mesmo aumentando a carga positiva do composto, o que poderia aumentar a afinidade do peptídeo e da membrana bacteriana (MELO; FERRE; CASTANHO, 2009), assim, pode ser que é possível que esta modificação gere mudanças conformacionais que poderiam impedir a ligação peptídeo-membrana.

Embora as estruturas da Alanina e do ácido aminoisobutírico (Aib) serem bastante parecidas, a troca de uma alanina por um Aib, pode aumentar a solubilidade de peptídeos, uma vez que a presença de Alanina pode favorecer a ocorrência de folhas- β formando agregados (NARITA et al., 1985). Como esta substituição não melhorou a ação do peptídeo, as estruturas secundárias do peptídeo original podem agir de forma que aumentem a interação do composto com bactérias.

Enquanto a Serina possui uma cadeia lateral sem carga e polar (SINGH et al., 2017), a Lisina possui uma cadeia lateral mais longa e com carga positiva (CHEN; HORVÁTH, 1995). A carga positiva pode interagir diretamente com a membrana celular negativamente carregada (HAN; GOPAL; PARK, 2016) e aumentar a eficiência da interação do peptídeo com a bactéria.

Da mesma forma que a Glicina, o Aib é uma molécula aquiral. A substituição de Glicina por Aib é estratégica para identificar se a aquiralidade nesta posição é determinante para a ação do peptídeo. Além disso, a substituição por Aib já demonstrou predispor peptídeos a sua conformação ativa (MICHAEL CONLON et al., 2007). Devido à maior atividade no composto DAN-1-13, esta modificação não pareceu beneficiar a interação do peptídeo com a membrana bacteriana.

5.2. Peptídeos em medicina regenerativa

5.2.1. Modificações na estrutura química

Para cada análogo sintetizado de peptídeo P12, as modificações realizadas do composto original (PSHISKYILRWPK – Peptídeo 1) foram marcadas em vermelho (Tabela 15). Para uma leitura mais fluida, as alterações em cada peptídeo serão discutidas em conjunto com os resultados dos testes *in vitro*.

Tabela 15. Modificações na sequência de aminoácidos nos peptídeos análogos da Citropina 1.1.

Peptídeo	Sequência de aminoácidos*	Fórmula química	Peso molecular (kDa)
Peptídeo 1 – P12	PSHISKYILRWRPK	$C_{84}H_{134}N_{26}O_{17}$	1780,18
Peptídeo 2	PSHIS R YILRWRPK-NH ₂	$C_{84}H_{134}N_{28}O_{17}$	1808,18
Peptídeo 3	PSHISK W ILRWRPK-NH ₂	$C_{86}H_{135}N_{27}O_{16}$	1803,20
Peptídeo 4	PSHISKY(3-NO₂)ILRWRPK-NH ₂	$C_{84}H_{133}N_{27}O_{19}$	1825,16
Peptídeo 5	PSHISKYILRW[Cit]PK-NH ₂	$C_{84}H_{133}N_{25}O_{18}$	1781,15
Peptídeo 6	PSHISK F ILRWRPK-OH	$C_{84}H_{133}N_{25}O_{17}$	1765,15
Peptídeo 7	PSHISKYILRWR(N-metil-Ala)K-OH	$C_{83}H_{133}N_{25}O_{18}$	1769,13

*Aminoácidos representados pelo código de uma letra para aminoácidos naturais e código de três letras para aminoácidos não naturais.

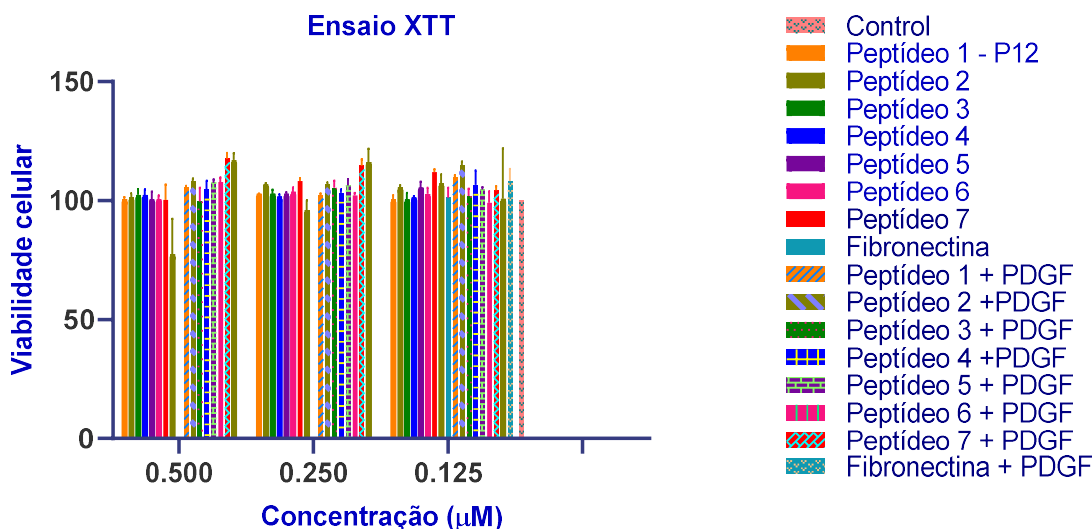
5.2.2. Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade do peptídeo P12 e seus análogos foram testados utilizando o ensaio MTT (Figura 18) e confirmado por imagem utilizando o instrumento Incucyte, com leituras ocorrendo a cada hora, por 96 h.

5.2.3. Teste de proliferação celular e teste de stress

Os testes de proliferação celular foram realizados utilizando ensaio XTT (Figura 20) e confirmadas com leitor Incucyte.

Figura 20. Atividade proliferativa do peptídeo P12 e análogos em células FN -/- por 24 h, nas concentrações entre 0,125 μ M e 0,500 μ M, com ou sem adição de PDGF

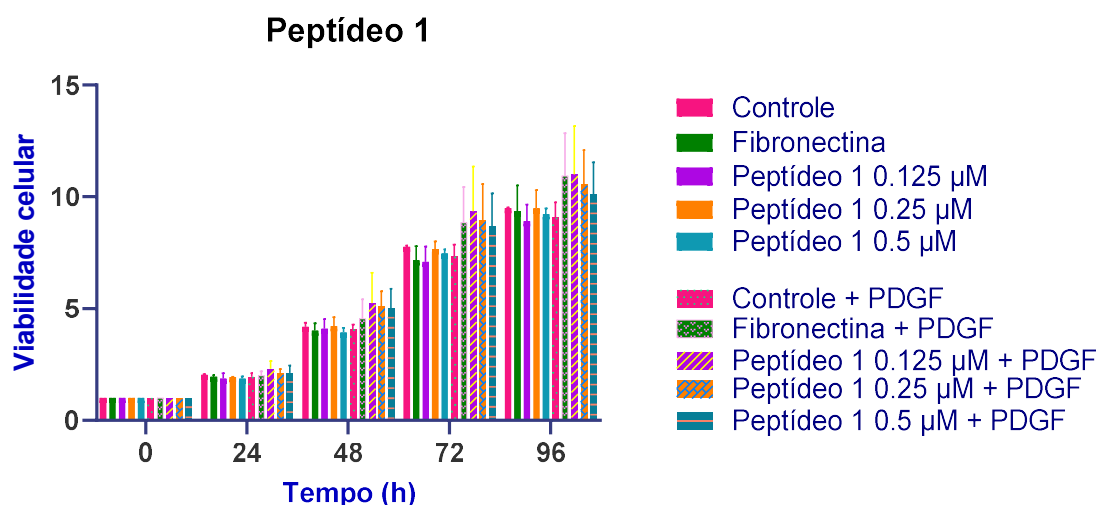


As leituras do teste de XTT após 24 h de incubação não mostrou diferença estatística entre o grupo Controle e os Peptídeos 1 – 6. É importante salientar que a inclusão de PDGF-BB com ou sem a adição de Peptídeos aumentou a viabilidade celular. No entanto, o Peptídeo 7 + PDGF demonstrou diferença em relação ao grupo Controle ($p=0,0225$).

As medições realizadas pelo Incucyte, hora-a-hora por 4 dias demonstrou que nas primeiras 24 h não houve diferença significativa entre os grupos, porém, este resultado mudou com a evolução do tempo. O peptídeo P12 na concentração de 0,125 μ M com associação de PDGF-BB demonstrou atividade proliferativa em relação ao grupo Controle e ao grupo Controle + PDGF-BB ($p=0,0013$). Nas concentrações de 0,250 μ M e de 0,500 μ M com PDGF-BB a diferença foi de $p=0,002$ e de $p=0,212$ respectivamente. Além disso, sem a adição do PDGF-BB, o P12 não diferiu do controle, o que pode indicar sua habilidade de se ligar ao PDGF-BB e promover crescimento celular. Esta hipótese pode ser corroborada quando se compara os resultados do P12 com os resultados da Fibronectina. A Fibronectina associada ao PDGF-BB promoveu crescimento celular em relação ao Controle e Controle + PDGF-BB ($p=0,0191$) e não diferiu do P12 ($p=0,89$). Todos esses achados corroboram com

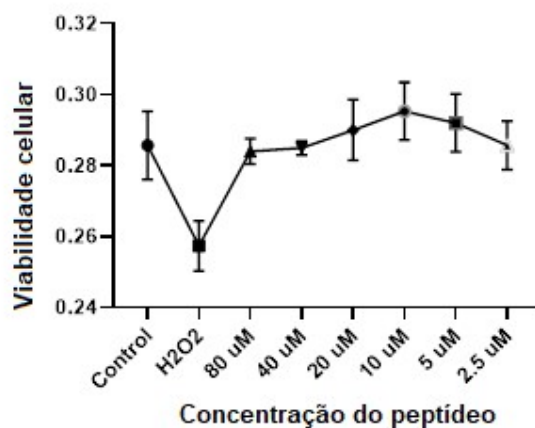
o trabalho do grupo Clark (LIN et al., 2014). A Figura 21 demonstra a atividade proliferativa do P12 por 96 h.

Figura 21. Atividade proliferativa do peptídeo 1 (P12) em células FN -/- por 96 h



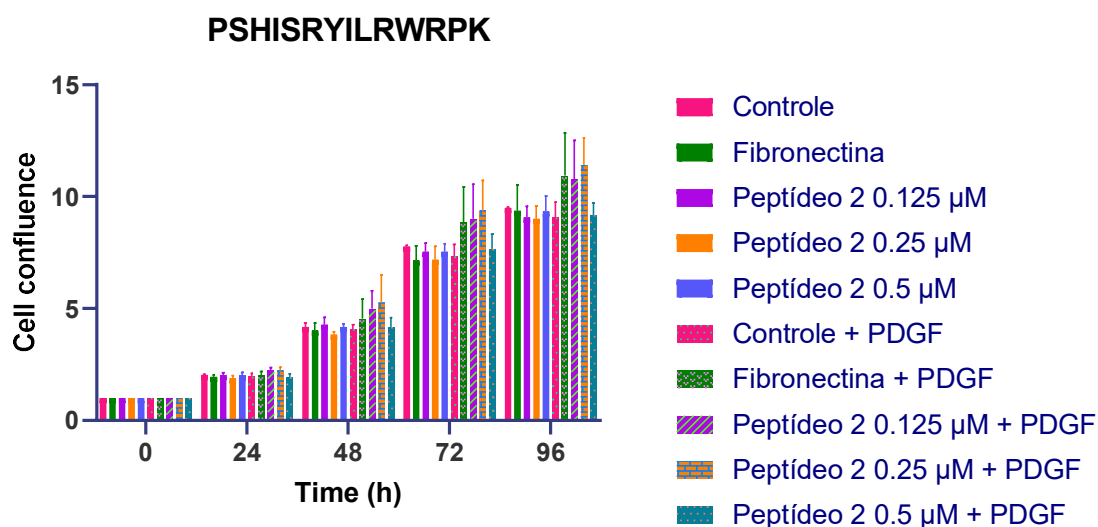
Após a administração do estresse e do tratamento com o peptídeo P12 (Figura 22), as células tratadas apresentaram proliferação em relação ao grupo estressado e, em algumas concentrações apresentou quantidades maiores de células do que o próprio grupo Controle, o qual não foi estressado. Estes resultados corroboram os achados de Lin et al., (2014), que encontraram recuperação de células estressadas com o tratamento do P12 na concentração de μ M, que demonstrou ser a concentração mais efetiva.

Figura 22. Teste de stress induzido por H_2O_2 e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o peptídeo P12



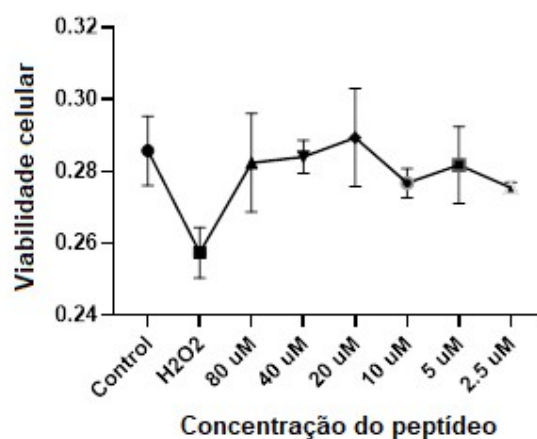
Resultados mais promissores foram encontrados no Peptídeo 2 (Figura 23) em associação com PDGF-BB após 4 dias; tanto o grupo Peptídeo 2 0,125 μ M e Peptídeo 2 0,250 μ M, com a adição de PDGF-BB apresentaram crescimento celular superior ao grupo Controle + PDGF-BB ($p=0,0001$). Contraditoriamente, o aumento da concentração do Peptídeo 2 para 500 μ M + PDGF-BB o tornou inefetivo em promover proliferação celular. Na concentração de 0,250 μ M + PDGF-BB o Peptídeo 2 aumentou o crescimento celular mesmo em comparação à Fibronectina + PDGF-BB ($p=0,0001$). Diversos estudos reportaram os efeitos da Arginina no tratamento de feridas, sendo um aminoácido condicionalmente essencial para a sobrevivência de tecidos em ambientes de estresse (LAIDLAW; KOPPLE, 1987; SEIFTER et al., 1978), bem como a habilidade de incitar crescimento celular em diferentes cepas, como células intestinais (TAN et al., 2010) e dermais (KIM et al., 2011). A proliferação de células fibroblásticas induzida pela arginina pode ocorrer devido a mediação do GPRC6A, que age como receptor de aminoácidos de caráter básico: L-Lisina, L-Ornitina e L-Arginina, habilitando a ativação das vias do sinal extracelular relacionado à quinase (ERK) e a serina treonina quinase. A substituição da Lisina pela Arginina aumentou o crescimento celular. Mesmo que ambos os resíduos tenham caráter básico, e carga positiva, a Arginina é menos hidrofóbica, sua carga positiva é menos contida, possui pKa maior e cargas parciais maiores dos átomos de hidrogênio e nitrogênio do que a Lisina, além de fornecer um local que favorece ligações de hidrogênio (RICE; WERESZCZYNSKI, 2017).

Figura 23. Atividade proliferativa do peptídeo 2 em células FN -/- por 96 h



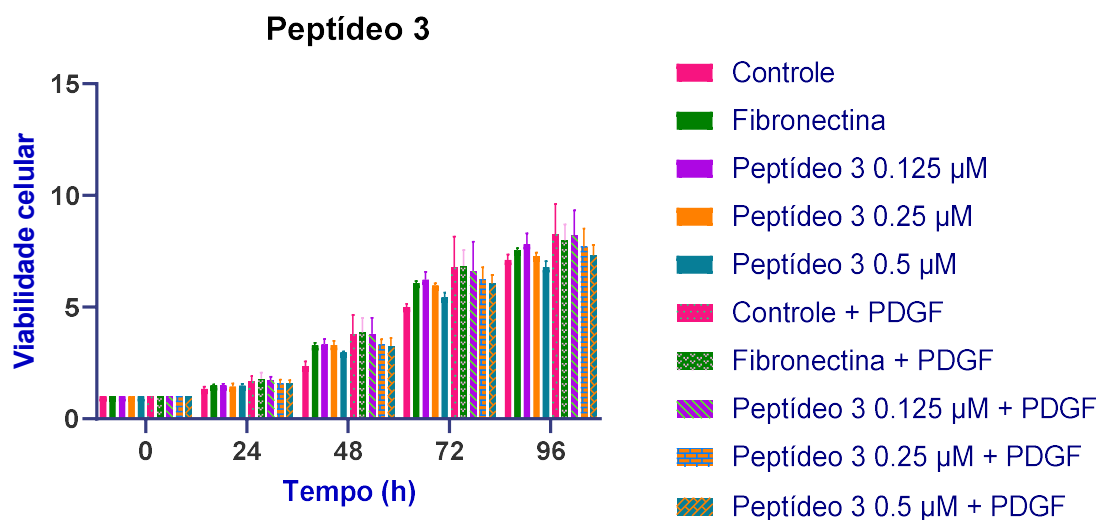
Apesar dos testes de citotoxicidade e proliferação celular demonstrarem que o Peptídeo 2 foi mais eficaz em propagar a viabilidade celular de células fibroblásticas sem a presença de fibronectina, no teste de stress (Figura 24), o Peptídeo 2 foi menos efetivo em recuperar as células da injúria causada pelo H_2O_2 do que o peptídeo P12, com a concentração mais efetiva na dose de 20 μ M, com valor superior ao grupo Controle.

Figura 24. Teste de stress induzido por H_2O_2 e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o Peptídeo 2



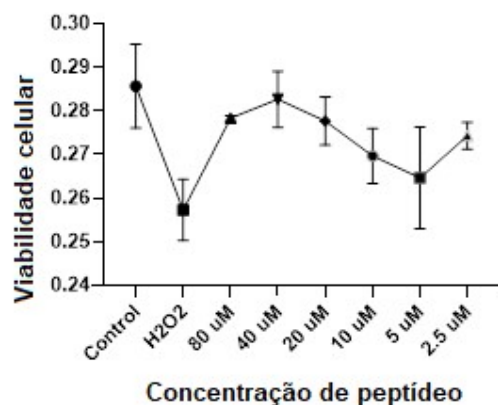
Por sua vez, o Peptídeo 3 não apresentou diferença em relação ao grupo Controle + PDGF-BB (Figura 25). Apesar de a associação com o PDGF-BB não ter aumentado a viabilidade celular no Peptídeo 3, a proliferação celular foi maior do que o grupo Controle nos grupos com ou sem a adição de PDGF-BB. Ainda, na concentração de 0,125 μ M, mesmo sem a adição de PDGF-BB, não diferiu do grupo Controle + PDGF-BB ($p=0.2320$), demonstrando que este peptídeo pode superar a necessidade de se ligar ao PDGF-BB para promover crescimento celular.

Figura 25. Atividade proliferativa do peptídeo 3 em células FN -/- por 96 h



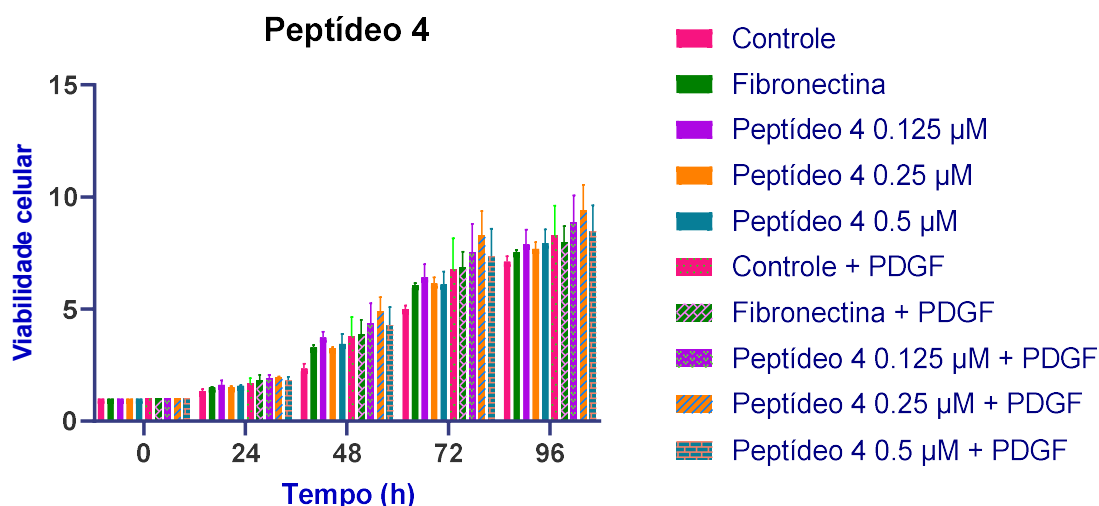
Em relação às células estressadas tratadas com o peptídeo 3 (Figura 26), a concentração que apresentou maior recuperação celular foi a de 40 μ M. Embora nenhuma concentração tenha apresentado resultado superior ao controle, todas as concentrações apresentaram valores maiores do que o grupo submetido ao stress, sem tratamento algum.

Figura 26. Teste de stress induzido por H₂O₂ e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o Peptídeo 3



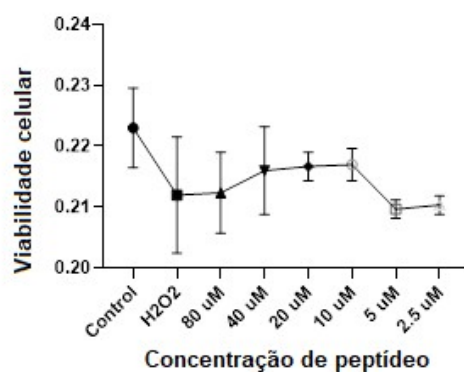
O Peptídeo 4 estimulou a proliferação celular com maior eficiência na concentração de 0,250 µM e associação com PDGF-BB ($p=0,0001$), em relação ao grupo Controle + PDGF-BB (Figura 27). Da mesma forma que ocorreu com o Peptídeo 3, o Peptídeo 4 demonstrou ter efeito proliferativo mesmo sem a adição do PDGF-BB, quando em comparação com o grupo Controle. É digno de nota que todas as concentrações do Peptídeo 4, com ou sem PDGF-BB demonstrou diferença em relação ao grupo Controle. Embora a presença de uma nitrotirosina seja associada com estresse oxidativo e com o desenvolvimento e progressão de doenças (BAR-OR et al., 2015; PENNATHUR et al., 2015; THOMSON, 2015), a presença deste aminoácido na sequência do peptídeo aumentou de maneira significativa a proliferação celular. A adição de um grupo NO₂ à tirosina é capaz de originar modificações conformacionais (SCHOPFER; BAKER; FREEMAN, 2003), modificar a solubilidade e predispor de formar agregados (ERKOÇ; ERKOÇ; SEPICI-DINÇEL, 2010), além de outras características, o que pode ter favorecido a ligação com o PDGF-BB, devido ao local extra de ligações de hidrogênio, com subsequente atividade do composto.

Figura 27. Atividade proliferativa do peptídeo 4 em células FN -/- por 96 h



Apesar de no teste de proliferação celular o Peptídeo 4 ter demonstrado resultados promissores, o tratamento com o Peptídeo 4 demonstrou não ser capaz de recuperar as células AHDF submetidas à injúria por H_2O_2 (Figura 28). Ainda, nas concentrações de 2,5 μM e 5 μM a viabilidade celular foi menor do que no próprio grupo H_2O_2 .

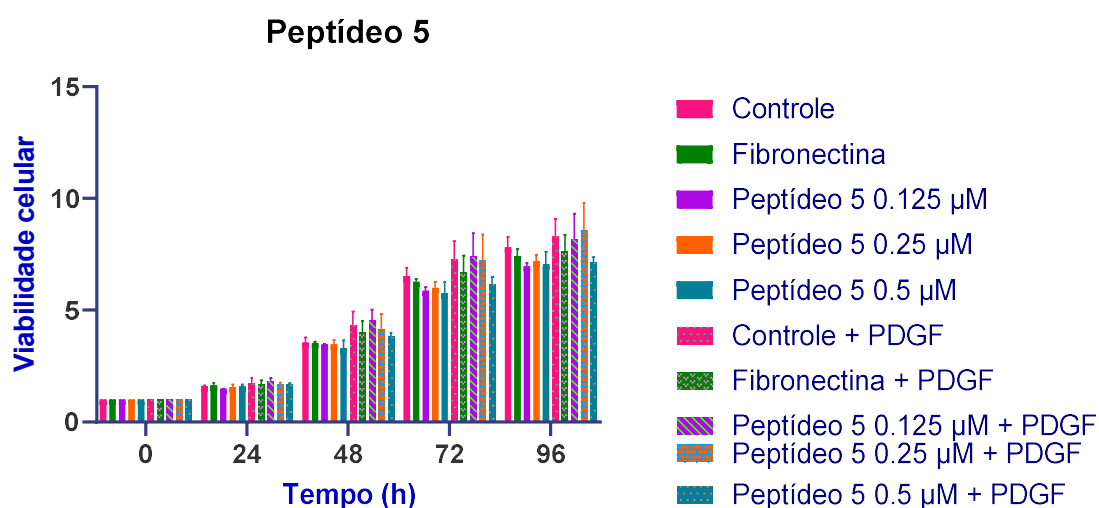
Figura 28. Teste de stress induzido por H_2O_2 e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o Peptídeo 4



A confluência celular nos grupos tratados com o Peptídeo 5 + PDGF-BB nas concentrações de 0,125 μM e 0,250 μM foram similares ao grupo Controle + PDGF-BB (Figura 29). No grupo Peptídeo 5, 0,250 μM + PDGF-BB foi superior ao grupo tratado com Fibronectina. Contudo, reduziu a viabilidade das células no grupo 0,500 μM , com ou sem PDGF-BB. Apesar disso, em relação ao grupo Controle, os grupos tratados com o Peptídeo

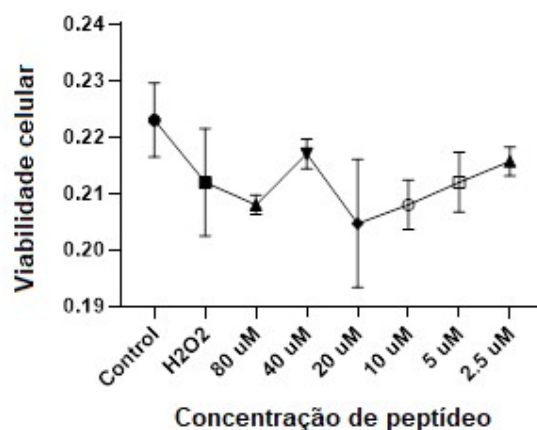
5 + PDGF-BB nas concentrações de 0,125 μ M e 0,250 μ M aumentou o crescimento celular ($p=0,0017$ e $p=0,0104$, respectivamente). A modificação da Arginina pela Citrulina na mesma posição afetará a carga na cadeia lateral, modificando sua polaridade e podendo reduzir a estabilidade do composto (CREESE; COOPER, 2016), o que pode explicar o porquê de nas primeiras 24 h o Peptídeo 5 favoreceu o crescimento celular, enquanto após este período a atividade proliferativa decaiu e se igualou ao Controle + PDGF-BB.

Figura 29. Atividade proliferativa do peptídeo 5 em células FN -/- por 96 h



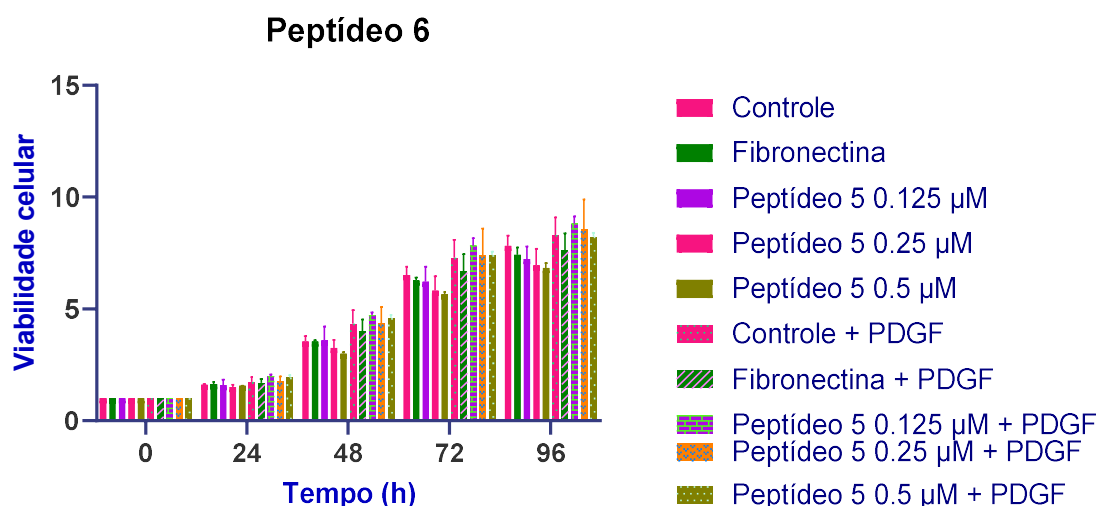
No teste de stress (Figura 30) as células tratadas com o Peptídeo 5 apresentaram mínima diferença de resultados, independentemente da concentração, sendo que a dose utilizada que possui com maior habilidade de auxiliar na recuperação de células estressadas foi a de 40 μ M.

Figura 30. Teste de stress induzido por H₂O₂ te de stress e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o Peptídeo 5



Para o Peptídeo 6, todas as concentrações em associação com PDGF-BB não diferiram do Controle + PDGF-BB ($p=0,2489$, $>0,9999$ e $0,9992$ para $0.125 \mu\text{M}$, $0.250 \mu\text{M}$ e $0.500 \mu\text{M}$, respectivamente), porém maior do que o grupo Controle (Figura 31). Apesar de este análogo não ter evitado que as células tenham chegado à confluência, não é possível afirmar que tenha facilitado o crescimento celular, portanto, a substituição da Tirosina pela Fenilalanina, tornando o peptídeo mais lipofílico piorou a ação biológica do composto, de alguma forma evidenciando a importância do local de pontes de hidrogênio fornecido pelo resíduo da Tirosina.

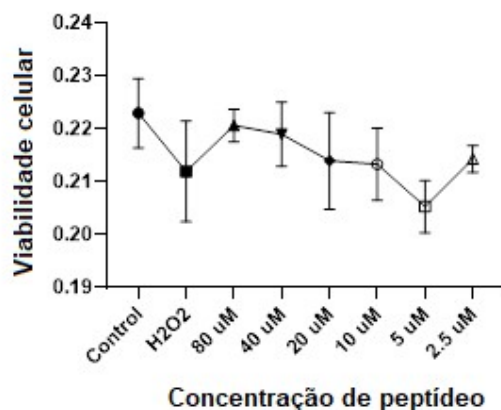
Figura 31. Atividade proliferativa do peptídeo 6 em células FN +/- por 96 h



O tratamento de células estressadas com o Peptídeo 6 não forneceu resgate de células estressadas (Figura 32). Ainda, na concentração de $5 \mu\text{M}$, o número de células viáveis foi

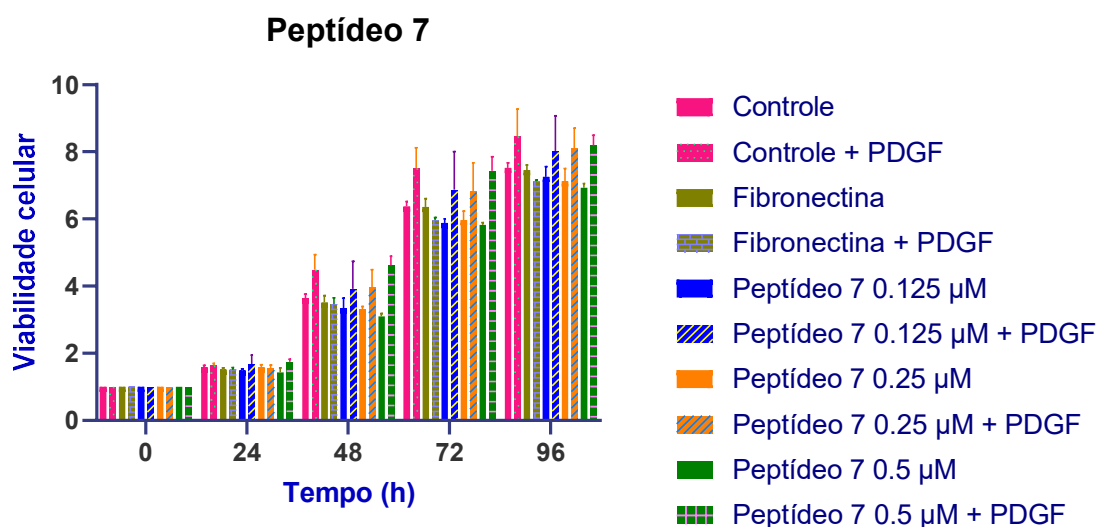
inferior ao grupo H_2O_2 . Nenhuma concentração do Peptídeo foi capaz de resgatar as células ao mesmo padrão do grupo Controle.

Figura 32. Teste de stress induzido por H_2O_2 e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o Peptídeo 6



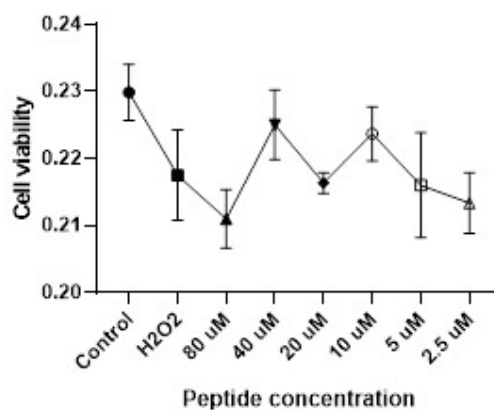
Apesar da diferença de crescimento celular após 24 h, o Peptídeo 7 não foi capaz de manter a atividade proliferativa em comparação com o grupo Controle + PDGF-BB, sendo menos ativo ($p=0,0222$, $0,0226$ para $0,125 \mu M$ + PDGF e $0,250 \mu M$ + PDGF) (Figura 33). Diferentemente dos outros peptídeos, o Peptídeo 7 demonstrou maior atividade proliferativa quando em maior concentração ($0,500 \mu M$), mas não o suficiente para diferir do grupo Controle + PDGF-BB ($p>0,9999$). A troca de uma Prolina por um aminoácido mais flexível como a Metil-alanina pode favorecer a ligação do Peptídeo com a molécula alvo. Por outro lado, devido sua rigidez e seu ângulo diédrico permanente, a Prolina pode prover um local para dobramento de proteína, bem como promover um local de ligação para cátions (LI et al., 1996), o que poderia explicar porque este peptídeo não diferiu do controle.

Figura 33. Atividade proliferativa do peptídeo 7 em células FN -/- por 96 h



Na maior concentração testada, de 80 μM e na menor concentração testada, de 2,5 μM , as células tratadas com o Peptídeo 7 apresentou menor confluência do que o grupo H_2O_2 (Figura 34), demonstrando que um ajuste de concentração é importante para se atingir o nível ótimo de composto, assim como ocorreu com outros Peptídeos. Nas demais concentrações, o número de células viáveis foi similar ao grupo H_2O_2 ou marginalmente melhor, evidenciando a ineficiência deste peptídeo neste tipo de injúria.

Figura 34. Teste de stress induzido por H_2O_2 e mediação de viabilidade celular em células AHDF tratadas com o Peptídeo 7



É importante notar que a mera presença do PDGF-BB pode ativar a regeneração celular, uma vez que age em todas as fases da cura de feridas, ativando processos de quimiotaxia para células em recuperação no local da injúria (HELDIN; WESTERMARK, 1999), estimulação e expressão de fatores de crescimento como fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (STAVRI et al., 1995; UUTELA et al., 2004), bem como aumentando a produção dos fibroblastos e portanto, a construção do ECM (LIN et al., 2006), o que explica a proliferação celular encontrada em todos os grupos tratados com PDGF-BB, mesmo sem a presença de Fibronectina ou qualquer peptídeo.

Em relação aos resultados do teste de stress, os mesmos foram realizados seguindo a metodologia de Lin et al (2014). Seria oportuno refazê-los encontrando a concentração de IC₅₀ para a injúria com o H₂O₂, e então tratar as células, de modo que haja diferença entre os grupos Controle e H₂O₂, permitindo avaliar com mais precisão a ação dos peptídeos no resgate celular. Outros tipos de injúria também devem ser considerados, uma vez que o teste com H₂O₂ simula apenas a injúria aguda e pode interagir com o composto, oxidando-o e, portanto, modificando sua eficiência.

6. CONCLUSÕES

Os peptídeos sintetizados são uma alternativa para o uso como fármacos bastante versátil, podendo atuar em diversas áreas, como antimicrobianos e em medicina regenerativa. As estratégias utilizadas para melhoria dos peptídeos devem ser racionalizadas para aperfeiçoar estruturas naturais e aumentar sua baixa estabilidade *in vivo*. O peptídeo com maior ação antimicrobiana é o DAN-1-13, com substituição por Sarcosina, 1-Naftil-L-Alanina e Lisina nas posições 1, 3 e 11, respectivamente.

Os peptídeos análogos da fração P12 utilizados para medicina regenerativa não apresentam toxicidade em nenhuma concentração, porém o Peptídeo 6 tem ação estática para crescimento celular. Em relação à ação proliferativa dos análogos do P12, o P12 apresenta atividade semelhante à Fibronectina, enquanto o Peptídeo 2 superou estes resultados. O Peptídeo 3 não demonstra diferença do grupo Controle + PDGF-BB, o Peptídeo 4 foi superior na concentração 0,250 μ M com a associação de PDGF-BB. O Peptídeo 5 demonstrou melhores resultados, similares ao grupo Controle + PDGF-BB nas concentrações 0,125 e 0,250 μ M, ambos em associação com o PDGF-BB. O Peptídeo 7 demonstrou diferença do Controle + PDGF-BB apenas nas primeiras 24 h, e em associação com o PDGF-BB. A simples presença do PDGF-BB foi suficiente para estimular o crescimento celular.

Novos testes devem ser realizados, para identificar a estabilidade do Peptídeo P12 e análogos, e em outros ambientes de estresse. Os peptídeos antimicrobianos necessitam ser testados em diferentes condições tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS

ALBADA, B.; METZLER-NOLTE, N. Organometallic–Peptide Bioconjugates: Synthetic Strategies and Medicinal Applications. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 19, p. 11797–11839, 12 out. 2016.

APD. Disponível em: <<http://aps.unmc.edu/AP/>>. Acesso em: 12 dez. 2019.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, dez. 2013.

BAJAJ, P. et al. 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 16, n. 1, p. 247–276, 2014.

BAR-OR, D. et al. Oxidative stress in severe acute illness. **Redox Biology**, v. 4, p. 340–345, 1 abr. 2015.

BIRON, E. et al. Improving Oral Bioavailability of Peptides by Multiple N-Methylation: Somatostatin Analogues. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 14, p. 2595–2599, 2008.

B. LAWRENSON, S.; ARAV, R.; NORTH, M. The greening of peptide synthesis. **Green Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 1685–1691, 2017.

BOLAND, M. P.; SEPAROVIC, F. Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian tree frogs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Membrane Biophysics of Antimicrobial Peptides. v. 1758, n. 9, p. 1178–1183, 1 set. 2006.

BOWDISH, D. M. et al. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, n. 4, p. 451–459, 2005.

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion in Immunology**, Innate immunity / Antigen processing and recognition. v. 18, n. 1, p. 24–30, 1 fev. 2006.

BRUNNER, H.; TSUNO, T.; BALÁZS, G. Chiral Selectivity in the Achiral Amino Acid Glycine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 84, n. 24, p. 16199–16203, 20 dez. 2019.

CHEN, H.; HORVÁTH, C. High-speed high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 705, n. 1, p. 3–20, 1995.

CREESE, A. J.; COOPER, H. J. The Deimination of Arginine to Citrulline. **Analysis of Protein Post-Translational Modifications by Mass Spectrometry**, Wiley Online Books. p. 275–306, 17 out. 2016.

CUI, H. et al. Self-assembly of giant peptide nanobelts. **Nano Lett**, v. 9, n. 3, p. 945–51, mar. 2009.

CUI, H.; WEBBER, M. J.; STUPP, S. I. Self-assembly of peptide amphiphiles: from molecules to nanostructures to biomaterials. **Biopolymers**, v. 94, n. 1, p. 1–18, 2010.

CULAV, E. M.; CLARK, C. H.; MERRILEES, M. J. Connective Tissues: Matrix Composition and Its Relevance to Physical Therapy. **Physical Therapy**, v. 79, n. 3, p. 308–319, 1 mar. 1999.

CZAPLEWSKI, L. et al. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 239–251, 1 fev. 2016.

DOMALAON, R.; ZHANEL, G. G.; SCHWEIZER, F. Short Antimicrobial Peptides and Peptide Scaffolds as Promising Antibacterial Agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 11, p. 1217–1230, 2016.

EBENHAN, T. et al. **Antimicrobial Peptides: Their Role as Infection-Selective Tracers for Molecular Imaging**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/867381/abs/>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

ERKOÇ, Ş.; ERKOÇ, F.; SEPICI-DİNÇEL, A. Quantum chemical investigation of nitrotyrosine (3-nitro-L-tyrosine) and 8-nitroguanine. **Amino Acids**, v. 38, n. 1, p. 319–327, 1 jan. 2010.

FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 37–51, 1 jan. 2012.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, 1 jan. 2015.

GARTON, M. et al. Method to generate highly stable D-amino acid analogs of bioactive helical peptides using a mirror image of the entire PDB. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 7, p. 1505, 13 fev. 2018.

GELAIN, F.; HORII, A.; ZHANG, S. Designer Self-Assembling Peptide Scaffolds for 3-D Tissue Cell Cultures and Regenerative Medicine. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 5, p. 544–551, 10 maio 2007.

GENTILUCCI, L.; DE MARCO, R.; CERISOLI, L. **Chemical Modifications Designed to Improve Peptide Stability: Incorporation of Non-Natural Amino Acids, Pseudo-Peptide Bonds, and Cyclization**. Text. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2010/00000016/00000028/art00012>>. Acesso em: 14 dez. 2019.

GOODWIN, D.; SIMERSKA, P.; TOTH, I. **Peptides As Therapeutics with Enhanced Bioactivity**. Text. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2012/00000019/00000026/art00006>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

HALE, J. D.; HANCOCK, R. E. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 5, n. 6, p. 951–959, 1 dez. 2007.

HAN, H. M.; GOPAL, R.; PARK, Y. Design and membrane-disruption mechanism of charge-enriched AMPs exhibiting cell selectivity, high-salt resistance, and anti-biofilm properties. **Amino Acids**, v. 48, n. 2, p. 505–522, 1 fev. 2016.

HANCOCK, R. E. W.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 82–88, 1 fev. 1998.

HELDIN, C.-H.; WESTERMARK, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. **Physiological reviews**, v. 79, n. 4, p. 1283–1316, 1999.

HIEMSTRA, P. et al. Antimicrobial peptides: mediators of innate immunity as templates for the development of novel anti-infective and immune therapeutics. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 23, p. 2891–2905, 2004.

JACKSON, D. M. The diagnosis of the depth of burning. **British journal of surgery**, v. 40, n. 164, p. 588–596, 1953.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 1 jul. 2006.

KASPAR, A. A.; REICHERT, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 17, p. 807–817, 1 set. 2013.

KIM, J.-Y. et al. Select Nutrients in the Ovine Uterine Lumen. VII. Effects of Arginine, Leucine, Glutamine, and Glucose on Trophectoderm Cell Signaling, Proliferation, and Migration. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 1, p. 62–69, 1 jan. 2011.

KOCZULLA, A. R.; BALS, R. Antimicrobial Peptides. **Drugs**, v. 63, n. 4, p. 389–406, 1 fev. 2003.

KOSIKOWSKA, P.; LESNER, A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 6, p. 689–702, 2 jun. 2016.

KOZEL, B. A. et al. Elastic fiber formation: A dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. **Journal of Cellular Physiology**, v. 207, n. 1, p. 87–96, 2006.

LAI, Y.; GALLO, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 3, p. 131–141, 1 mar. 2009.

LAIDLAW, S. A.; KOPPLE, J. D. Newer concepts of the indispensable amino acids. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, n. 4, p. 593–605, 1 out. 1987.

LANGER, R.; TIRRELL, D. A. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 487, 2004.

LI, S. C. et al. Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 13, p. 6676–6681, 25 jun. 1996.

LIN, F. et al. Fibronectin Peptides that Bind PDGF-BB Enhance Survival of Cells and Tissue under Stress. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 4, p. 1119–1127, 1 abr. 2014.

LIN, H. et al. The effect of collagen-targeting platelet-derived growth factor on cellularization and vascularization of collagen scaffolds. **Biomaterials**, v. 27, n. 33, p. 5708–5714, 1 nov. 2006.

- LIN, T.-Y.; WEIBEL, D. B. Organization and function of anionic phospholipids in bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 10, p. 4255–4267, 1 maio 2016.
- LOFTON, H. et al. Mechanisms and fitness costs of resistance to antimicrobial peptides LL-37, CNY100HL and wheat germ histones. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68875, 2013.
- MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, 2016.
- MAITI, S. et al. Effective Control of Salmonella Infections by Employing Combinations of Recombinant Antimicrobial Human β -Defensins hBD-1 and hBD-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6896, 1 nov. 2014.
- MALMSTEN, M. et al. Highly Selective End-Tagged Antimicrobial Peptides Derived from PRELP. **PLOS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16400, 27 jan. 2011.
- MAO, A. S.; MOONEY, D. J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 47, p. 14452–14459, 24 nov. 2015.
- MATSUURUA, K. Rational design of self-assembled proteins and peptides for nano-and micro-sized architectures. **RSC Advances**, v. 4, n. 6, p. 2942–2953, 2014.
- MATSUZAKI, K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1462, n. 1, p. 1–10, 15 dez. 1999.
- MELO, M. N.; FERRE, R.; CASTANHO, M. A. R. B. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 245–250, mar. 2009.
- MICHAEL CONLON, J. et al. Effect of aminoisobutyric acid (Aib) substitutions on the antimicrobial and cytolytic activities of the frog skin peptide, temporin-1DRa. **Peptides**, v. 28, n. 10, p. 2075–2080, 1 out. 2007.
- MOHAMMADI-SAMANI, S.; TAGHIPOUR, B. PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 20, n. 4, p. 385–393, 19 maio 2015.
- MOOKHERJEE, N. et al. Modulation of the TLR-Mediated Inflammatory Response by the Endogenous Human Host Defense Peptide LL-37. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 4, p. 2455, 15 fev. 2006.
- MUIZNIEKS, L. D.; KEELEY, F. W. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, Fibrosis: Translation of basic research to human disease. v. 1832, n. 7, p. 866–875, 1 jul. 2013.
- MYHRMAN, E. et al. The novel antimicrobial peptide PXL150 in the local treatment of skin and soft tissue infections. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 7, p. 3085–3096, 1 abr. 2013.

NARITA, M. et al. Critical Peptide Size for Insolubility Caused by a β -Sheet Aggregation and Solubility Improvement in Hydrophobic Peptides by Replacement of Alanine Residues with α -Aminoisobutyric Acid Residues. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 58, n. 9, p. 2494–2501, 1 set. 1985.

PENNATHUR, S. et al. Oxidative Modifications of Protein Tyrosyl Residues Are Increased in Plasma of Human Subjects with Interstitial Lung Disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 8, p. 861–868, 17 nov. 2015.

PRÄNTING, M. et al. Mechanism and Fitness Costs of PR-39 Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2734–2741, 1 ago. 2008.

PUGLIESE, R.; GELAIN, F. Peptidic Biomaterials: From Self-Assembling to Regenerative Medicine. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 145–158, 1 fev. 2017.

RICE, A.; WERESZCZYNSKI, J. Probing the disparate effects of arginine and lysine residues on antimicrobial peptide/bilayer association. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1859, n. 10, p. 1941–1950, 1 out. 2017.

RINK, R. et al. To protect peptide pharmaceuticals against peptidases. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 61, n. 2, p. 210–218, 2010.

RIVAS-SANTIAGO, B. et al. Activity of LL-37, CRAMP and antimicrobial peptide-derived compounds E2, E6 and CP26 against *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 2, p. 143–148, fev. 2013.

RODRIGUES DE ALMEIDA, N. et al. Understanding interactions of Citropin 1.1 analogues with model membranes and their influence on biological activity. **Peptides**, v. 119, p. 170119, 1 set. 2019.

RUBERT PÉREZ, C. M. et al. The Powerful Functions of Peptide-Based Bioactive Matrices for Regenerative Medicine. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, n. 3, p. 501–514, 1 mar. 2015.

RUBERT PEREZ, C. M. et al. Mimicking the Bioactivity of Fibroblast Growth Factor-2 Using Supramolecular Nanoribbons. **ACS Biomater Sci Eng**, v. 3, n. 9, p. 2166–2175, 11 set. 2017.

RYAN, D. M.; ANDERSON, S. B.; NILSSON, B. L. The influence of side-chain halogenation on the self-assembly and hydrogelation of Fmoc-phenylalanine derivatives. **Soft Matter**, v. 6, n. 14, p. 3220–3231, 6 jul. 2010.

SAHL, H.-G. et al. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 4, p. 466–475, 2005.

SALIBIAN, A. A. et al. Current concepts on burn wound conversion—A review of recent advances in understanding the secondary progressions of burns. **Burns**, v. 42, n. 5, p. 1025–1035, 1 ago. 2016.

SCHMAUSS, D. et al. Treatment of Secondary Burn Wound Progression in Contact Burns—A Systematic Review of Experimental Approaches. **Journal of Burn Care & Research**, v. 36, n. 3, p. e176–e189, 1 maio 2015.

SCHOPFER, F. J.; BAKER, P. R. S.; FREEMAN, B. A. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 12, p. 646–654, 1 dez. 2003.

SEIFTER, E. et al. Arginine: an essential amino acid for injured rats. **Surgery**, v. 84, n. 2, p. 224–230, ago. 1978.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1462, n. 1, p. 55–70, 15 dez. 1999.

SINGH, P. et al. α -Amino acids with electrically charged and polar uncharged side chains as chiral synthon: Application to the synthesis of bioactive alkaloids (1996-Dec, 2013). **Tetrahedron**, v. 73, n. 15, p. 1911–2008, 13 abr. 2017.

STAVRI, G. T. et al. Hypoxia and platelet-derived growth factor-BB synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. **FEBS Letters**, v. 358, n. 3, p. 311–315, 1995.

STUPP, S. I. Self-assembly and biomaterials. **Nano Lett**, v. 10, n. 12, p. 4783–6, 8 dez. 2010.

SUKI, B.; BATES, J. H. T. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, Respiratory Biomechanics. v. 163, n. 1, p. 33–43, 30 nov. 2008.

TAN, B. et al. L-Arginine stimulates proliferation and prevents endotoxin-induced death of intestinal cells. **Amino Acids**, v. 38, n. 4, p. 1227–1235, 1 abr. 2010.

THOMSON, L. **3-Nitrotyrosine Modified Proteins in Atherosclerosis**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/dm/2015/708282/abs/>>. Acesso em: 15 out. 2019.

UPPALAPATI, M. et al. A Potent d-Protein Antagonist of VEGF-A is Nonimmunogenic, Metabolically Stable, and Longer-Circulating in Vivo. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 4, p. 1058–1065, 15 abr. 2016.

UUTELA, M. et al. PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3198–3204, 15 nov. 2004.

VLIEGHE, P. et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 1, p. 40–56, 1 jan. 2010.

WON, H.-S. et al. Effects of a tryptophanyl substitution on the structure and antimicrobial activity of C-terminally truncated gaegurin 4. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 17, p. 4367–4374, 2002.

YAMAMOTO, F. et al. Radiosynthesis and initial evaluation of ^{18}F labeled nanocarrier composed of poly(L-lactic acid)-block-poly(sarcosine) amphiphilic polydepsipeptide. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 40, n. 3, p. 387–394, 1 abr. 2013.

YANG, D. et al. Multiple Roles of Antimicrobial Defensins, Cathelicidins, and Eosinophil-Derived Neurotoxin in Host Defense. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 181–215, 19 mar. 2004.

YANG, L. et al. Crystallization of Antimicrobial Pores in Membranes: Magainin and Protegrin. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 4, p. 2002–2009, 1 out. 2000.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 1 mar. 2003.

YEUNG, A. T. Y.; GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 13, p. 2161, 15 maio 2011.

YU, J. et al. Dynorphin A (1–8) analog, E-2078, is stable in human and rhesus monkey blood. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, n. 3, p. 1147–1151, 1997.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389–395, jan. 2002.

ZEIGER, A. S. et al. Macromolecular Crowding Directs Extracellular Matrix Organization and Mesenchymal Stem Cell Behavior. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37904, 23 maio 2012.

ZHU, J.; CLARK, R. A. F. Fibronectin at Select Sites Binds Multiple Growth Factors and Enhances their Activity: Expansion of the Collaborative ECM-GF Paradigm. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 4, p. 895–901, 1 abr. 2014.

ZOLLINGER, A. J.; SMITH, M. L. Fibronectin, the extracellular glue. **Matrix Biology**, Special issue on Provisional Matrix. v. 60–61, p. 27–37, 1 jul. 2017.

ANEXOS**Laboratório de Farmacognosia - UFMS**

C:\LabSolutions\Data\Vanessa\Doutorado\Piceatannol_Dani_1.lcd

Acquired by : Admin

Sample Name : Piceatannol_Dani_1

Sample ID : Piceatannol_Dani_1

Vail # :

Injection Volume : 20 uL

Data File Name : Piceatannol_Dani_1.lcd

Method File Name: método fruto piceatannol_curva padrao.lcm

Batch File Name :

Report File Name : guavira.lcr

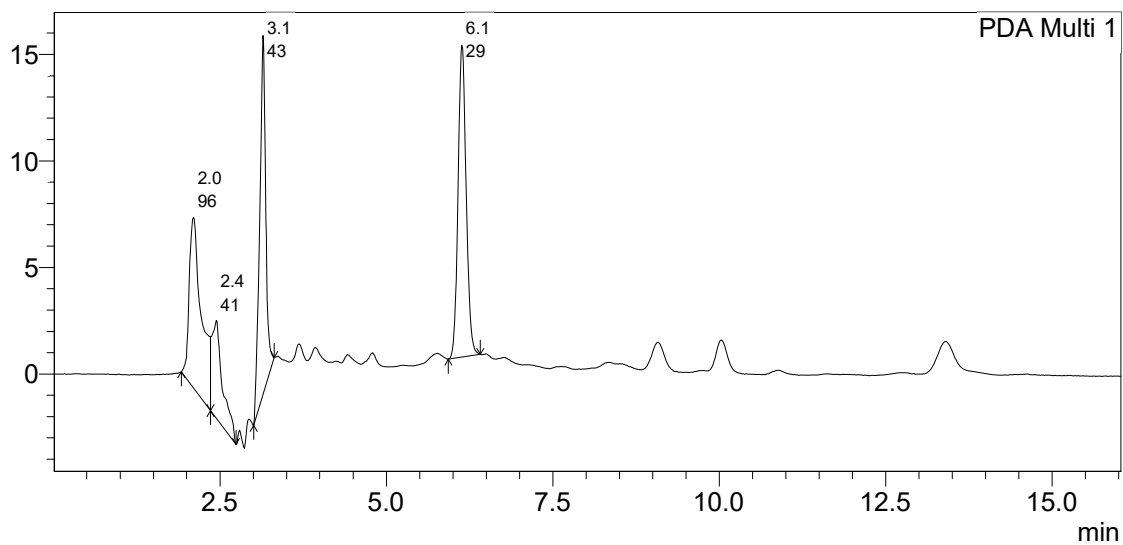
Data Acquired : 18/4/2017 17:11:01

Data Processed : 18/4/2017 17:27:05

Descrição : Piceatannol Dani 7:3 MeO:H2O

C:\LabSolutions\Data\Vanessa\Doutorado\Piceatannol_Dani_1.lcd

mAU



1 PDA Multi 1/314nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 314nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.096	104202	7986	27.097	18.100
2	2.441	50064	4587	13.019	10.396
3	3.143	106456	16898	27.683	38.298
4	6.129	123828	14651	32.201	33.207
Total		384551	44122	100.000	100.000

C:\LabSolutions\Data\Vanessa\Doutorado\Piceatannol_Dani_1.lcd

Laboratório de Farmacognosia - UFMS

C:\LabSolutions\Data\Vanessa\Doutorado\Piceatannol_Dani_2.lcd

Acquired : Admin

by

Sample : Piceatannol_Dani_2

Name

Sample : Piceatannol_Dani_2

ID

Vail # :

Injection : 20 uL

Volume

Data File : Piceatannol_Dani_2.lcd

Name

Method : método fruto piceatannol_curva padrao.lcm

File

Name

Batch :

File

Name

Report : guavira.lcr

File

Name

Data : 18/4/2017 17:41:19

Acquired

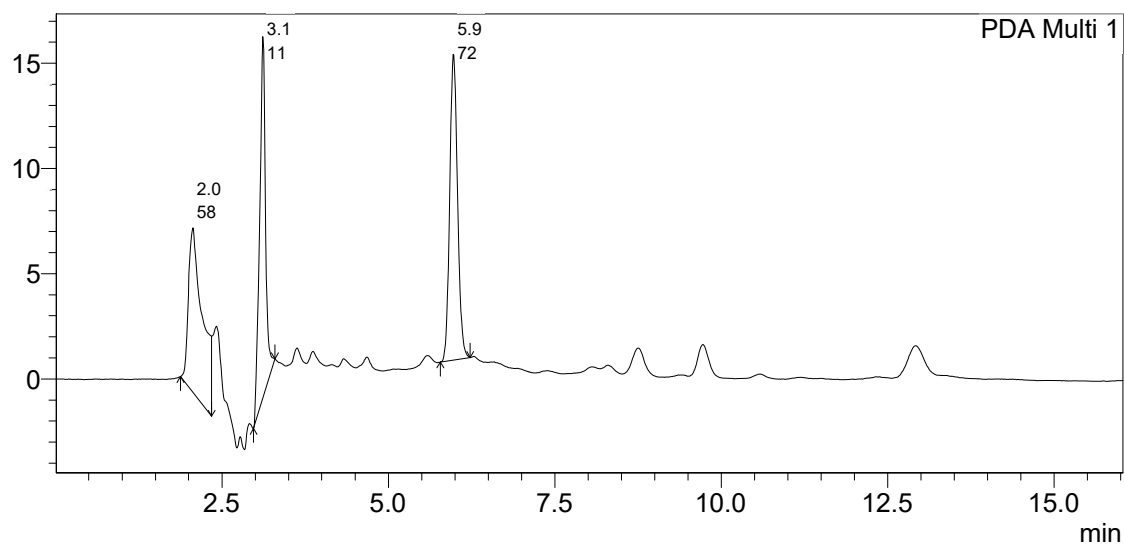
Data : 18/4/2017 17:57:23

Processed

Descrição : Piceatannol Dani 2 7:3 MeO:H2O

C:\LabSolutions\Data\Vanessa\Doutorado\Piceatannol_Dani_2.lcd

mAU



1 PDA Multi 1/314nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 314nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.058	116530	7789	34.106	19.707
2	3.111	106021	17204	31.030	43.530
3	5.972	119123	14529	34.865	36.763
Total		341674	39522	100.000	100.000

C:\LabSolutions\Data\Vanessa\Doutorado\Piceatannol_Dani_2.lcd

Laboratório de Farmacognosia - UFMS

C:\LabSolutions\Data\Vanessa\Doutorado\Piceatannol_Dani_3.lcd

Acquired : Admin
by

Sample : Piceatannol_Dani_3
Name

Sample : Piceatannol_Dani_3
ID

Vail # :

Injection : 20 uL
Volume

Data File : Piceatannol_Dani_3.lcd
Name

Method : método fruto piceatannol_curva padrao.lcm
File
Name

Batch :
File
Name

Report : guavira.lcr
File
Name

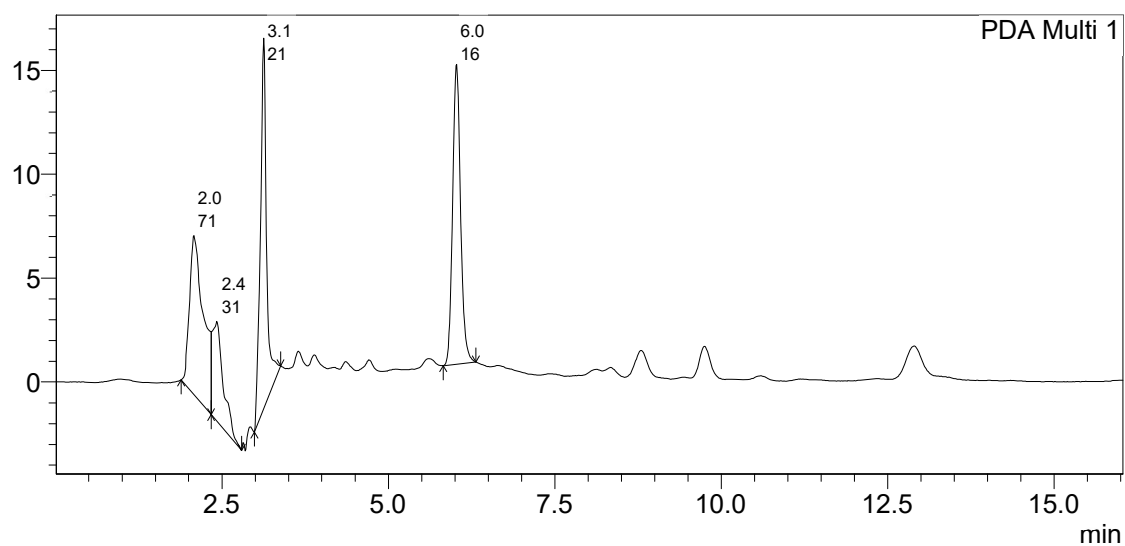
Data : 18/4/2017 18:00:09
Acquired

Data : 18/4/2017 18:16:13
Processed

Descrição : Piceatannol Dani 2 7:3 MeO:H2O

C:\LabSolutions\Data\Vanessa\Doutorado\Piceatannol_Dani_3.lcd

mAU



1 PDA Multi 1/314nm 4nm

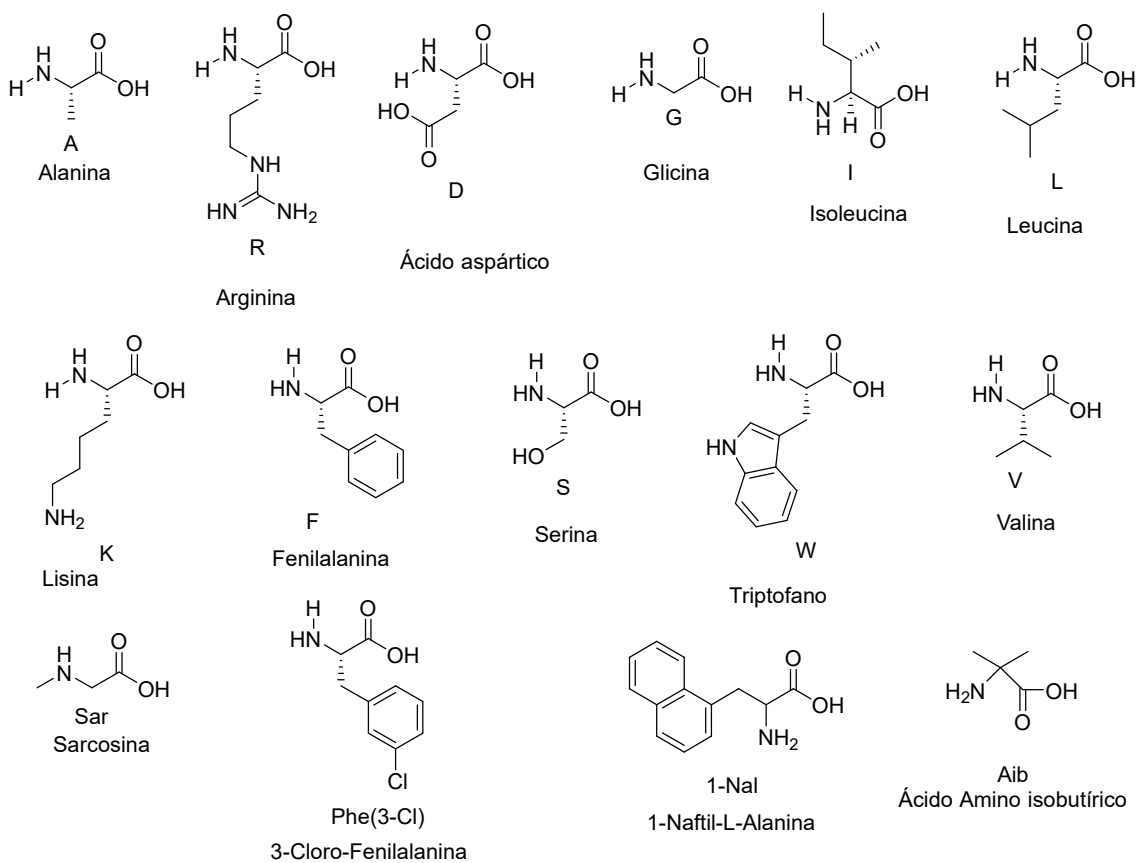
PeakTable

PDA Ch1 314nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.071	114611	7629	28.366	17.057
2	2.431	54009	4791	13.367	10.712
3	3.121	115484	17875	28.581	39.967
4	6.016	119948	14430	29.686	32.264
Total		404052	44724	100.000	100.000

C:\LabSolutions\Data\Vanessa\Doutorado\Piceatannol_Dani_3.lcd

Estrutura dos aminoácidos utilizados na síntese dos peptídeos





Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Doutorado

Aos vinte e seis dias do mês de março do ano de dois mil e vinte, às oito horas, na à distância, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Valter Aragao do Nascimento (UFMS), Adilson Beatriz (UFMS), Carlos Alberto do Nascimento Ramos (UFMS), Elaine Silva de Padua Melo (UFMS), Elisvania Freitas dos Santos (UFMS), Karla Rejane de Andrade Porto (FACSUL) e Simone Maria Neto (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **DANIELA GRANJA ARAKAKI**, CPF 70363714120, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Perfil mineral, potencial tecnológico e terapêutico da Canjiqueira (Byrsonima cydoniifolia) e avaliação de peptídeos antimicrobianos e com ação regenerativa**" e orientação de Valter Aragao do Nascimento. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Valter Aragao do Nascimento (Interno)

Dr. Adilson Beatriz (Interno)

Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos (Interno)

Dra. Elaine Silva de Padua Melo (Interno)

Dra. Elisvania Freitas dos Santos (Interno)

Dra. Karla Rejane de Andrade Porto (Interno)

Dra. Simone Maria Neto (Interno)

ASSINATURA

Valter Aragao do Nascimento

Elaine S. de Padua Melo

Elisvania Freitas dos Santos

Karla R. de Porto

Simone M. Neto

AValiação

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

RESULTADO FINAL:

☒ Aprovação

☐ Aprovação com revisão

☐ Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Valter Aragao do Nascimento
Presidente da Banca Examinadora

Daniela Arakaki
Aluna