

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DIANA MENDES DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA BERGENINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS IN  
VITRO RELACIONADOS A DOENÇAS METABÓLICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção de título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Emerson Silva Lima

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Danielle Oliveira de Almeida

MANAUS

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DIANA MENDES DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA BERGENINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS IN  
VITRO RELACIONADOS A DOENÇAS METABÓLICAS

Orientador: Prof. Dr.º Emerson Silva Lima

Coorientadora: Prof.ª Dr.ª Patrícia Danielle Oliveira de  
Almeida

MANAUS

2022

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N244a Nascimento, Diana Mendes do  
Avaliação da bergenina em modelos experimentais in vitro  
relacionados a doenças metabólicas / Diana Mendes do  
Nascimento . 2022  
70 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Emerson Silva Lima  
Coorientadora: Patrícia Danielle Oliveira de Almeida  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Bergenina. 2. Doença Metabólica. 3. Atividade Farmacológica.  
4. Atividade anti-inflamatória. 5. Antioxidante. I. Lima, Emerson  
Silva. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**“Avaliação da bergenina em modelos experimentais *in vitro* relacionados a doenças metabólicas”**

**DISCENTE: DIANA MENDES DO NASCIMENTO**

PARECER:

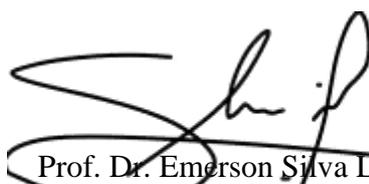
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 24/01/2022.



Profa. Dra. Ariane Mendonça Kluczkovski  
Coordenadora do PPGCF

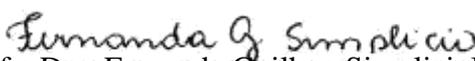
**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:**



Prof. Dr. Emerson Silva Lima  
Orientador e Presidente da Banca (UFAM)



Profa. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura  
Membro Externo (UFAM)



Profa. Dra. Fernanda Guilhon Simplicio  
Membro Interno (UFAM)

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, eu agradeço a Deus por ser o autor da minha vida e de tudo que existe;

A meus pais Antônia e Adelino (im memoriam) por todo o cuidado e amor;

Ao meu querido esposo Maurílio que nunca mediu esforços para me encorajar e ajudar nesta caminhada do mestrado. Agradeço por sua maneira carinhosa, amorosa e paciente para comigo;

Ao meu orientador Dr<sup>o</sup> Emerson S. Lima pela oportunidade a mim concedida para ingressar no mestrado. Por sua paciência e empenho para que este trabalho fosse possível, sobretudo num momento de uma pandemia;

À minha coorientadora Dr<sup>a</sup> Patrícia Danielle, por sua grande ajuda e cooperação;

Aos professores que contribuíram com seus conhecimentos para a realização deste trabalho;

Ao Leonard (Léo) pela imensa ajuda para que este trabalho fosse possível;

A toda a equipe do BIOPHAR e FITOPHAR, em especial Bárbara Janaína, Leilane, Ana, Márcia de Jesus, Talita Machado;

À UFAM (Universidade Federal do Amazonas), por proporcionar toda a infraestrutura necessária para a realização desta pesquisa;

À FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas) pelo apoio com a bolsa.

## RESUMO

Mudanças na economia global têm contribuído para um estilo de vida sedentário e ingestão excessiva de calorias, aumentando a incidência de doenças metabólicas, as quais têm se tornado problema de saúde pública mundial. Estima-se que esses números continuem a aumentar em 25% até 2030 e 51% em 2045. Em relação aos tratamentos disponíveis para doenças metabólicas, existem poucas opções terapêuticas até o momento e as terapias existentes são limitadas ou apresentam efeitos colaterais. O uso de produtos naturais nas doenças metabólicas tem exibido resultados positivos. Pesquisas recentes demonstram que a bergenina possui ampla variedade de efeitos farmacológicos sobre o estresse oxidativo e anti-inflamatório, colocando-a como candidata forte aos tratamentos dessas doenças. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos terapêuticos da bergenina em modelos de doença metabólica por procedimentos experimentais *in vitro*. A bergenina utilizada no estudo foi obtida comercialmente e avaliada quanto a sua natureza química e pureza. A atividade antioxidante foi avaliada por meio da atividade sequestrante do radical DPPH e ensaio de varredura do radical ABTS, onde, observou-se que a bergenina tem maior atividade sobre radicais ABTS. A bergenina foi avaliada quanto ao seu potencial de inibir a glicação de proteínas pelas vias oxidativa e não oxidativa. O efeito sobre viabilidade de células tumorais e não tumorais quando em contato com a bergenina foi analisado utilizando o método resazurina (Alamar Blue). A bergenina não foi tóxica para as linhagens MRC-5 e HepG2 até a concentração 200  $\mu\text{M}$ . O teste de antioxidante celular foi realizado utilizando-se 2',7'-dicloro-fluoresceína-diacetato (DCFH-DA), onde, a bergenina inibiu de forma concentração-dependente 30% das espécies reativas de oxigênio geradas. Este estudo mostrou pela primeira vez que a bergenina tem potencial de inibição sobre a enzima  $\alpha$ -amilase. O ensaio de captação de lipídeos foi realizado pelo método Oil Red O e os resultados da inibição da captação de lipídeos pela bergenina não apresentaram significância. Diante desses resultados, entende-se que a bergenina tem um potencial para ser melhor estudada como uma opção terapêutica nas doenças metabólicas. Contudo, estudos adicionais *in vivo* são necessários para melhor elucidar os possíveis efeitos farmacológicos da bergenina nas doenças metabólicas.

**Palavras-chave:** bergenina; doença metabólica; atividade farmacológica; atividade anti-inflamatória; antioxidante.

## ABSTRACT

Changes in the global economy have contributed to a sedentary lifestyle and excessive intake of calories, increasing the incidence of metabolic disease, and have become a global public health problem. It is estimated that these numbers will continue to increase by 25% through 2030 and 51% into 2045. Regarding available treatments for metabolic diseases, there are few therapeutic options to date, and existing therapies are limited or have side effects. The use of natural products in metabolic diseases has shown positive results. Recent research demonstrates that bergenin has a wide range of pharmacological effects on oxidative and anti-inflammatory stress, making it a strong candidate for treatments for these diseases. Thus, this work aimed to evaluate the possible therapeutic effects of bergenin in models of metabolic disease by *in vitro* experimental procedures. The bergenin used in the study was obtained commercially and evaluated for its chemical nature and purity. Antioxidant activity through DPPH radical scavenging activity and ABTS radical scanning assay, where it was observed that bergenin has greater activity on ABTS radicals. Bergenin was evaluated for its potential to inhibit protein glycation by the oxidative and non-oxidative pathways, showing a moderate effect of activity on the oxidative pathway. The effect on tumor and non-tumor cell viability when in contact with bergenin was analyzed using the resazurin method (Alamar blue). The bergenin was not toxic to MRC-5 and HepG2 strains up to the concentration of 200  $\mu$ M. The cell antioxidant test was performed using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA), where bergenin inhibited in a concentration-dependent manner about 30% of the reactive oxygen species generated. This study showed for the first time that bergenin has the potential to inhibit the  $\alpha$ -amylase enzyme. The lipid uptake assay was performed by the Oil Red O method and the results of the inhibition of lipid uptake by bergenin were not significant. Given these results, it is understood that bergenin has the potential to be better studied as a therapeutic option in metabolic diseases. However, additional *in vivo* studies are needed to better elucidate the possible pharmacological effects of bergenin in chronic disease.

**Keywords:** bergenin; metabolic disease; pharmacological activity; activity anti-inflammatory; antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - As complicações do diabetes tipo 2..... 17
- Figura 2** - Interação de adipocinas, citocinas e marcadores inflamatórios que contribuem para o desenvolvimento da doença metabólica e suas complicações. DHGNA (doença hepática gordurosa não alcoólica); EHNA (esteatohepatite não alcoólica). ..... 23
- Figura 3** - Delineamento experimental..... 35
- Figura 4** - Análise de pureza da bergenina através do método de HPLC. O gráfico (A) refere-se à absorbância da bergenina. O gráfico (B) representa o espectro UV da pureza da bergenina, analisados a 272nm..... 42
- Figura 5** - Efeito da bergenina sobre a viabilidade de fibroblastos normais de pulmão humano (MRC5) e hepatocarcinoma (HepG2), nas concentrações de 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 e 200µM, nos tempos de 24,48 e 72horas. Onde, os gráficos (A) e (B) representam o tratamento das linhagens HepG2 e MRC-5 com bergenina. O cont. (-) contem somente meio de cultivo e DMSO, sem tratamento. Os dados estão expressos em porcentagem de viabilidade celular com média ± desvio padrão (em relação ao controle de DMSO) e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. \*p < 0,05..... 43
- Figura 6** - Avaliação da atividade antioxidante através dos ensaios de DPPH e ABTS. O gráfico (A) representa a bergenina e Ácido gálico (padrão) no ensaio de ABTS. O gráfico (B) refere-se à CI<sub>50</sub> da bergenina no ensaio de ABTS. O gráfico (C) representa a bergenina e ácido gálico (padrão) no ensaio de DPPH e o gráfico (D) mostra a CI<sub>50</sub> do ácido gálico. A bergenina e o ácido gálico, encontram-se na concentração única de 100 µM e os dados estão expressos em porcentagem de inibição com D.P.M. 46
- Figura 7** - Avaliação da atividade antioxidante celular em linhagem de fibroblasto tratada com bergenina, na concentração de 50, 25 e 12,5 µM. A quercetina foi utilizada como padrão de atividade antioxidante testada nas mesmas concentrações que a bergenina. Os dados estão expressos em porcentagem de inibição de EROs com média ± desvio padrão e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. \*p < 0,05, foi considerado estatisticamente significativo ao comparar a bergenina com a quercetina (padrão). ..... 48
- Figura 8** - Atividade inibitória da bergenina. Gráfico (A) refere-se à atividade inibitória da bergenina e quercetina (padrão) sobre a via oxidativa. O gráfico (B) representa o efeito inibitório da bergenina e aminoguanidina (padrão) sobre a via não oxidativa. Os valores representam a porcentagem de inibição. A bergenina, bem como as drogas padrão, foram testadas na concentração de 100 µM. As letras diferentes indicam uma diferença estatística significativa pelo teste One-way ANOVA seguido do teste Dunnet, \*p <0,05..... 50
- Figura 9** - Avaliação do efeito inibitório da bergenina sobre a lipase na concentração 50 µM, α-amilase 1000 µM e α-glucosidase 100 µM. O gráfico (A) refere-se à bergenina comparada aos efeitos droga padrão Orlistate. O gráfico (B) representa a CI<sub>50</sub> do Orlistate. O gráfico (C) refere-se à bergenina comparada à droga padrão acarbose. O gráfico (D) representa o efeito da bergenina comparado à acarbose (droga padrão). Os dados estão expressos em porcentagem de inibição de lipase, α-amilase e α-glucosidase com média ± desvio padrão (em relação aos controles, as drogas padrão) e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. \*p < 0,05..... 52

**Figura 10** – Efeitos da bergenia sobre a captação de lipídeos em células HepG2. Tanto a bergenia quanto a substância padrão (resveratrol), foram testadas nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$ , no tempo de 24 horas. O ácido oleico foi testado na concentração de 1mM. O gráfico (A) refere-se ao tratamento com bergenia e ácido oleico. A imagem (B) refere-se ao controle (-) de captação de lipídeos, com meio de cultivo DMEM e DMSO. A imagem (C) representa controle (+) de captação lipídica, onde, contem ácido oleico. As imagens (D), (E) e (F) representam o tratamento com ácido oleico e com bergenia. A imagem (G) refere-se ao controle (-) de captação. A imagem (H) representa controle (+) de captação lipídica, que contem ácido oleico. O gráfico (I) refere-se ao tratamento com resveratrol. As imagens (J), (K) e (L) representam o tratamento com ácido oleico e com resveratrol. Os dados estão expressos em porcentagem de captação de lipídeos com média  $\pm$  desvio padrão (em relação ao controle (+) ácido oleico e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. \* $p < 0,05$ ..... 55

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b> Estudos relacionados às ações farmacológicas da bergenina .....	28
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
AGE	Produto final de glicação
AST	Aspartato aminotransferase
ATT	Terapia antitubercular
AASLD	Associação Americana para o Estudo de Doenças do Fígado
ALT	Alanina aminotransferase
ABS	Taxa de absorção
AChE	Acetilcolinesterase
ARFI	Impulso de força de radiação acústica
Anti-TB	Antituberculose
Abs	Absorbância
Akt2	Proteína quinase
ASC	Proteína associada à apoptose
AAPH	Dihidrocloreto 2,2 – azobis (2metilpropionamidina)
ABTS*	2,2'-azino-bis (ácido-etilbenzoalina-6-sulfônico)
AL	Ácido lipoico
Akt	Proteína serina/treonina quinase
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
A549	Linhagem celular adenocarcinoma
APCI	Fonte de ionização química à pressão atmosférica
BuChE	Butirilcolinesterase
BMSCs	Células-tronco mesenquimais ósseas
BCAA	Leucina, isoleucina e valina
Bcl-2.	Linfoma de células B
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
Bax	Proteína associada
CTL	Célula citotóxica
CE <sub>50</sub>	Concentração da amostra responsável pelo efeito de 50%
CAM	Central Analítica do Centro de Apoio Multidisciplinar
CD36	Cluster de diferenciação 36
ChREBP	Proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos
CHC	Carcinoma hepatocelular
CAT	Catalase
PCR	Proteína C reativa
CC	Cromatografia em coluna
DMEN	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPPH*	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DMSO	Dimetilsulfóxido
DCFH-DA	2,7-diclorofluoresceína-diacetato
DCM	Diclorometano

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DSS	Sulfato de dextrano e sódio
DMF	Dimetilformamida
DP	Doença de parkinson
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DGAT2	Diacilglicerol aciltransferase
D.A	Doença de Alzheimer
DN	Nefropatia diabética
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DU-145	Célula de câncer de próstata
ERK1	Cascata de quinase 1/2 regulada por sinal extracelular
ELISA	Ensaio de imunoabsorbância enzimática
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FGNA	Fígado gorduroso não alcoólico
FITOPHAR	Laboratório de Fotoquímica e Semissíntese
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
GMC	Células mesangiais glomerulares
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
HEPES	Ácido 4- (2-hidroxi-1-piperazina etanosulfônico
HMG-coA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase
HepG2	Linhagem celular de carcinoma hepatocelular
HeLa	Linhagem celular de câncer do colo do útero
HCT	Células de câncer de colo retal
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
IL6	Interleucina 6
IL 8	Interleucina 8
IL-1β	Interleucina -1beta
IL-12	Interleucina 12
IC <sub>50</sub>	Concentração da dose necessária para 50% de inibição
KIM-1	Imunoglobulina com domínio de mucina
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de potássio
LXR	Receptor X do fígado
LPS	Lipopolissacarídeo
LBA	Lavagem broncoalveolar
MCP-1	Proteína humana recombinante
MM	Massa molecular
MG	Metilglioxal
MMFF	Mechanics Molecular Force Field
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
MRE	Elastografia por ressonância

MHz	Mega-hertz
MUC-2	Mucina
MMP-9	Matriz da metalopeptidase 9
MCs	Células mesangiais
MRC5	Fibroblasto humano
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina
EHNA	Esteatohepatite não alcoólica
NF-Kappa B	Fator de transcrição nuclear Kappa B
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritroide 2
NaNO <sub>3</sub>	Nitrato de sódio
NK	Natural killer
nm	Nanômetro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NDLH	Número de grupos doadores de ligação de hidrogênio
NO	Óxido nítrico
NED	N-naftil- etilenodiamina
OSTM1	Proteína transmembranar 1 associada à osteoporose
PBS	Tampão fosfato salino
P-tau	Proteína tau
PC-3	Carcinoma de próstata humano
PPARs	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma
PC12	Linhagem celular de feocromocitoma de ratos
PLA	Ácido polilático
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de cultivo celular desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RE	Retículo endoplasmático
RT	Random primer
RMN	Ressonância magnética nuclear
RM	Ressonância magnética
STAT3	Tradutores de sinal e ativadores de transcrição
SWE	Elastografia por sonda de cisalhamento
STZ	Estreptozotocina
SOD	Superóxido dismutase
SGC-7901	Linhagem celular de câncer gástrico
SFB	Soro fetal bovino
Smad2 / 3	Transdutores de sinal para receptores da superfamília beta do fator de crescimento transformador TGF-β1
DT2	Diabetes tipo 2
TC	Tomografia computadorizada
TG	Triglicerídeos

TMS	Tetrametilsilano
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
Th1	T helper 1
TGF- $\beta$ 1	Fator de crescimento transformador - $\beta$ 1
TNBS	Ácido trinitrobenzenossulfônico
VCTE	Elastografia transitória de controle de vibração
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1 Doenças metabólicas</b> .....	16
<b>2.2 Tecido adiposo</b> .....	19
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	34
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	34
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	35
<b>4.1 Fluxograma</b> .....	35
<b>4.1 Obtenção da bergenina e avaliação do grau de pureza</b> .....	35
<b>4.2 Ensaio de Citotoxicidade</b> .....	35
<b>4.3 Ensaio antioxidantes</b> .....	36
4.3.1 Atividade sequestrante do radical DPPH .....	36
4.3.2 Ensaio de varredura do radical ABTS .....	37
4.3.3 Atividade antioxidante celular .....	37
<b>4.4 Inibições enzimáticas</b> .....	38
4.4.1 Ensaio da atividade inibitória da lipase .....	38
4.4.2 Atividade inibidora $\alpha$ -glicosidase .....	38
4.4.3 Inibição de $\alpha$ -amilase .....	38
<b>4.5 Atividade antiglicante: Via Oxidativa</b> .....	39
4.5.1 Via não oxidativa .....	39
<b>4.6 Cultura celular</b> .....	40
4.6.1 Captação de ácidos graxos .....	40
<b>4.7 Análise Estatística</b> .....	40
<b>5.1 Análise de pureza</b> .....	42
<b>5.2 Efeitos da bergenina sobre a viabilidade celular de HepG2 e MRC-5</b> .....	42
<b>5.3 Ensaio antioxidantes</b> .....	45
5.3.1 Atividade de eliminação de radicais DPPH e ABTS .....	45
<b>5.4 Atividade antiglicante por via oxidativa e via não oxidativa</b> .....	50
5.4.1 Efeito da bergenina sobre a atividade antiglicante por via oxidativa e não oxidativa .....	50
<b>5.5 Inibições enzimáticas</b> .....	52
5.5.1 Inibição de enzimas digestivas lipase, $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -glucosidase .....	52
<b>5.6 Ensaio da Captação de lipídeos</b> .....	54

<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças metabólicas, incluindo diabetes, obesidade, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), hiperlipidemia tornaram-se importantes problemas de saúde pública em todo o mundo (COSTELLO; SCHONES, 2018). É uma condição clínica resultante de uma ampla gama de distúrbios metabólicos, os quais conferem a um indivíduo risco significativo de doenças cardiovasculares. As constantes modificações ambientais, sociais, culturais e econômicas, juntamente com a susceptibilidade genética têm sido apontadas como as principais causas de obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), doenças cardiovasculares e várias outras doenças, incluindo o câncer (SRIKANTHAN et al., 2016; BERTHOUD; NEUHUBER, 2019; AKBAR et al., 2019).

Em 2019, foi estimado que 463 milhões de pessoas sofriam de diabetes em todo o mundo; quase meio bilhão de pessoas vivem com diabetes e a epidemiologia aponta que estes números continuem a aumentar em 25% até 2030 e 51% em 2045 (SAEEDI et al., 2019). As causas das doenças metabólicas são complexas e multifatoriais, incluindo estilo de vida sedentário, dietas não saudáveis, gasto energético reduzido, problemas intestinais, susceptibilidade genética, interferência entre muitos órgãos, incluindo o cérebro (FÄNDRIKS, 2017; BERTHOUD; NEUHUBER, 2019).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), declara que as doenças cardiovasculares e diabetes, juntas, são responsáveis pela maioria das mortes anuais (19 milhões) (MARRERO; ADASHI, 2015). Sem nenhuma cura real à vista, as intervenções para o combate das doenças metabólicas são destinadas principalmente ao tratamento sintomático, como o farmacológico, modificação comportamental e cirurgia, todavia, os tratamentos sintomáticos não têm sido eficazes (BERTHOUD; NEUHUBER, 2019).

Por outro lado, os benefícios atribuídos às melhorias do estilo de vida, incluindo exercícios e redução de peso, têm sido amplamente aceitos como constituintes no tratamento e prevenção das doenças metabólicas (LE LAY et al., 2014; DHINDSA; SANDESARA; SHAPIRO, 2018; LIZCANO, 2019). No entanto, devido à baixa adesão a este tipo de tratamento, principalmente para dietas de perda de peso em longo prazo, novas abordagens de tratamento são essenciais e estas têm surgido como opções terapêuticas adjuvantes direcionadas para preencher a lacuna entre o estilo de vida e a cirurgia bariátrica (ASRIH; JORNAYVAZ, 2014; HERNANDEZ-RODAS; VALENZUELA; VIDELA, 2015; SRIVASTAVA; APOVIAN, 2018).

Atualmente, as opções de tratamento para a obesidade são limitadas, e muitas das intervenções farmacológicas empregadas até o momento apresentam efeitos colaterais indesejados. Além disso, em muitos países, apenas alguns medicamentos foram aprovados e a eficácia terapêutica destes não é tão boa quanto o esperado (SLYPER, 2018; SRIVASTAVA; APOVIAN, 2018).

Medicamentos à base de produtos naturais, por sua vez, são de uso milenar e têm sido empregados amplamente aos tratamentos de doenças metabólicas. Ganham popularidade por promover saúde, bem como prevenção e cura de doenças (LÓPEZ et al., 2009; VALOIS et al., 2018). Diversos estudos relataram a importância desses compostos e sua relevância sobre o potencial farmacoterapêutico, bem como muitos exemplos da identificação bem-sucedida de novos fármacos de origem natural (JAYAKODY et al., 2018).

Dentre esses produtos naturais, pode-se citar a bergenina. Em 1881, a bergenina foi isolada pela primeira vez, porém, sua estrutura foi confirmada apenas em 1958, é um tanino hidrolisável, derivado da di-hidroisocumarina. Obtido, majoritariamente, de espécies de *Bergenia* (HAY; HAYNES, 1958).

A bergenina é um composto polifenólico presente em muitas plantas medicinais tais como *Bergenia crassifolia*, *Ficus racemosa*, *Mallotus japonicus*, *M. philippinensis*, dentre outras (QIAO et al., 2019). Ela é incorporada de múltiplas bioatividades versáteis, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, hepatoprotetora, antidiabéticas, antimicrobianas, antivirais e anticânceres (BAJRACHARYA, 2015; WANG et al., 2018).

Tem ganhado notoriedade no meio científico por suas propriedades farmacológicas, tornando possível sua aplicação na pesquisa clínica. Compostos fenólicos são descritos como tendo resultados significativos sobre o estresse oxidativo, metabolismo lipídico, resistência insulínica e inflamação (SRIVASTAVA; APOVIAN, 2018; FAN; PEDERSEN, 2021).

Assim, com base no papel benéfico promissor da bergenina por suas propriedades mencionadas acima, e considerando as limitações farmacológicas para o tratamento de doenças metabólicas, a bergenina tem se tornado forte candidata a ser incorporada na terapêutica dessas doenças por exibir resultados significativos em estudos *in vitro* e *in vivo*. O presente trabalho foi desenhado para investigar essa hipótese em um ambiente pré-clínico, usando modelo *in vitro* de inibição de captação de lipídeos e ensaios enzimáticos.

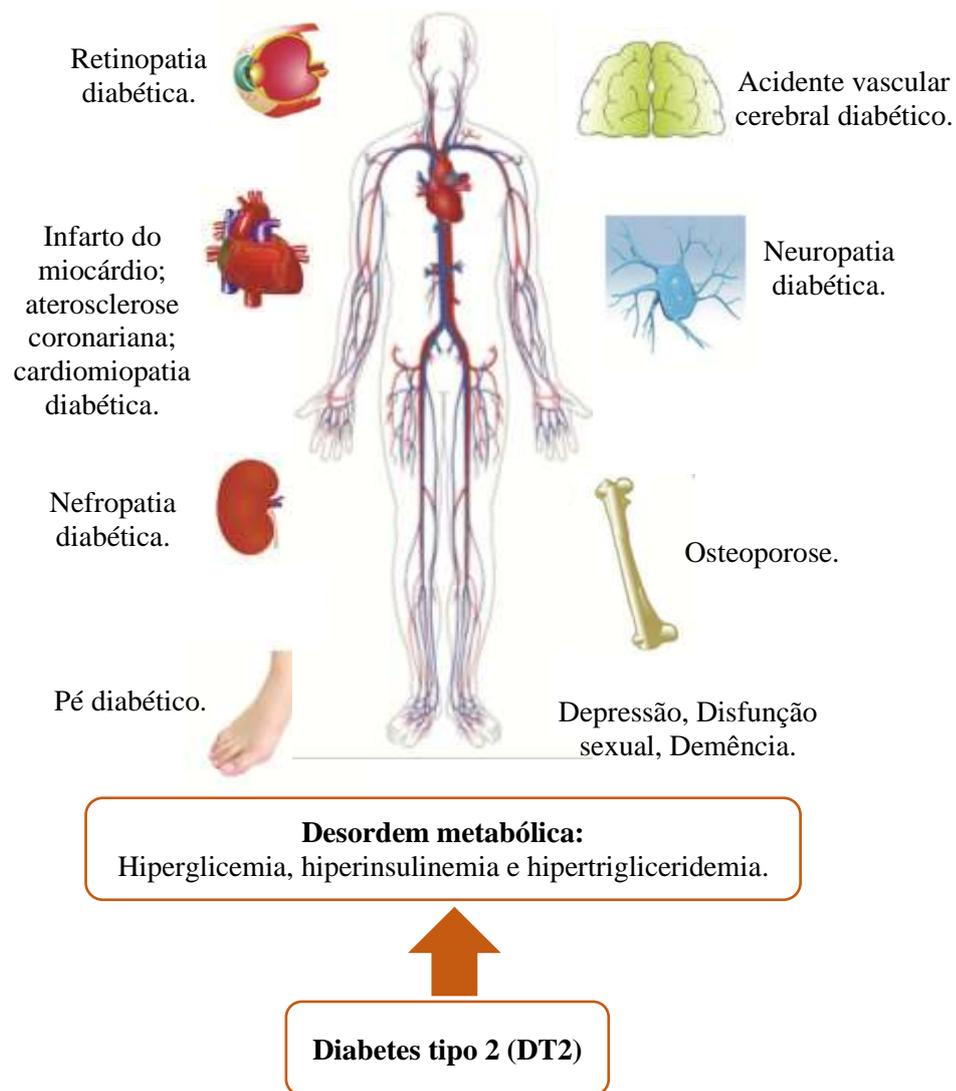
## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Doenças metabólicas**

A disfunção metabólica representa um grupo de anormalidades metabólicas relacionadas, cujo agrupamento de fatores de risco de doenças, incluindo hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão, obesidade e resistência à insulina, relacionam-se ao risco aumentado para doenças metabólicas como, diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (SRIKANTHAN et al., 2016; AKBAR et al., 2019).

A incidência de obesidade e suas comorbidades metabólicas nos países desenvolvidos aumentaram de forma avassaladora desde meados do século XX. Aproximadamente 1,5 bilhão de pessoas estão acometidas de sobrepeso ou obesidade (WHITING et al., 2011; LOH et al., 2019). Em 2019, estimava-se que 463 milhões de pessoas sofriam de diabetes em todo o mundo; a perspectiva é que estes números continuem a aumentar para 578 milhões de pacientes em 2030 e 700 milhões em 2045. Uma em cada duas pessoas que vivem com diabetes não sabe que tem diabetes (SAEEDI et al., 2019).

O estilo de vida prejudicial baseado aos novos padrões dietéticos com alto teor calórico irrestrito, gordura saturada e o sedentarismo ocasionam desordem metabólica importante constituindo-se as principais causas de disfunções metabólicas, (REAVEN, 1988; KAPLAN, 1989; FAN; PEDERSEN, 2021). As complicações crônicas do diabetes causadas pelo excesso de glicose no sangue são consequências graves. As lesões microvasculares podem causar retinopatia diabética, nefropatia diabética e neuropatia diabética, conforme mostra figura 1 (LABAZI; TRASK, 2017).



**Figura 1-** As complicações do diabetes tipo 2

**Fonte:** Adaptado de Xu et al., (2018)

Além dos fatores de risco tradicionais supracitados, outros dois fatores podem ser considerados, como distúrbios do sono e desalinhamento circadiano. Milhões de pessoas ao redor do mundo não dormem o suficiente para uma fisiologia metabólica saudável, e no momento em que o relógio fisiológico está promovendo o sono, muitas dessas pessoas estão ocupadas seja trabalhando por turno, seja por atividades sociais (MCHILL; WRIGHT, 2017; MAURY, 2019).

Carências de sono e interrupção dos ritmos circadianos favorece o desenvolvimento da obesidade e diabetes tipo 2, ganho de peso, prejudica o equilíbrio energético, inflamação, impacta negativamente a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina. Os ritmos circadianos

modulam e controlam padrões diários na fisiologia humana com papel importante para a função metabólica normal. Períodos inapropriados de consumo de alimentos e alimentação com alto teor de gordura também comprometem o funcionamento temporal do metabolismo e da fisiologia e, subsequentemente, desencadeia sua patogênese (DEPNER; STOTHARD; WRIGHT, 2014; MAURY, 2019; GALASSO et al., 2021).

A hipercolesterolemia é caracterizada por níveis séricos elevados de colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Os triglicerídeos (TGs) são provenientes dos ácidos graxos livres (AGLs) da dieta após a lipólise no tecido adiposo que entra no sangue e da lipogênese de novo, onde, os ácidos graxos são sintetizados nos hepatócitos a partir de outros substratos, por exemplo, carboidratos (DONNELLY; BOLDT; PARKS, 2005).

A síntese de TGs se constitui importante papel para a homeostase hepática e esse processo ocorre por meio da esterificação de AGLs. Nos hepatócitos, esses AGLs, via acil-CoA sintetase, são convertidos em acil-CoA graxo, que são transferidos para glicerol para esterificação; alternativamente, se a energia é necessária no hepatócito, os acil-CoA graxos são oxidados principalmente na mitocôndria ( $\beta$ -oxidação). Quando elevado os níveis de AGLs nos hepatócitos, a capacidade de  $\beta$ -oxidação é comprometida, podendo ocorrer peroxidação lipídica (POLYZOS; KOUNTOURAS; ZAVOS, 2009; FERRAMOSCA; ZARA, 2014).

Como consequência do acúmulo de AGLs em órgãos metabolicamente relevantes medeia disfunção metabólica. O aumento do influxo hepático de lipídeos intracelular é resultante de um desequilíbrio entre a absorção hepática de ácidos graxos, a síntese de lipídeos, a oxidação de lipídeos, e esses eventos favorecem espécies pró-oxidantes e compromete a capacidade e as defesas antioxidantes (DIRAISON F; BEYLOT, 2003; FABBRINI et al., 2009; KAUFMANN et al., 2020).

O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino que produz e secreta adipocinas, como a adiponectina e leptina, e citocinas como a interleucina -6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF) (POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2016). Funcionalmente, as adiponectinas possuem bioatividades de sensibilização à insulina, anti-inflamatória e efeitos antifibróticos, através da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias por meio da interferência com a função do fator nuclear kB (FN-kB) (TILG; MOSCHEN, 2006; POLYZOS et al., 2010).

O fígado regula o metabolismo lipídico por pelo menos três mecanismos primários: captação de ácidos graxos livres da circulação e síntese *de novo* de ácidos graxos; armazenamento de lipídeos, incluindo a conversão de ácidos graxos em triglicerídeos e outras

gotículas de lipídeos, que são exportados para o tecido adiposo ou armazenados no fígado; e consumo de lipídeos, incluindo lipólise,  $\beta$ -oxidação e geração de lipoproteínas (MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2009; PONZIANI et al., 2015; ALONSO et al., 2019).

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs), que são produzidos a partir de açúcares redutores que se ligam de forma não enzimática a proteínas e lipídeos, cujos ambientes hiperglicêmico e hiperlipidêmico, favorecem o desenvolvimento da obesidade, diabetes, resistência à insulina, inflamação e estresse oxidativo (MONDEN et al., 2013; ACOSTA et al., 2016; RUIZ; RAMASAMY; SCHMIDT, 2020).

Como consequência da inflamação induzida pela obesidade, bem como uma dieta rica em gorduras, aceleram modificações na microbiota intestinal e aumenta a permeabilidade da mucosa intestinal, levando ao extravasamento de fatores inflamatórios, incluindo metabólitos bacterianos (LOO et al., 2017).

Além disso, as alterações na ecologia intestinal resultam em produção de ácido biliar secundário por bactérias através da  $7\alpha$ -desidroxilase bacteriana. Tanto os ácidos biliares secundários, como o ácido desoxicólico e ácido liotocólico são reconhecidos como indutores carcinogênicos por meio da inflamação e do estresse oxidativo e causam dano hepático por meio da estimulação de receptores toll-like 2 (YOSHIMOTO et al., 2013; LOO et al., 2017).

Alimentação rica em gordura prejudica a função do receptor farnesiod X, o qual tem a função de manter a homeostase hepática dos triglicerídeos, no estágio da liberação da glicose e na aceleração da indução da esteatose (LU et al., 2014). As medidas de resistência à insulina, adiposidade visceral e doença aterosclerótica são marcadores de doença metabólica (AKBAR et al., 2019).

A resistência hepática à insulina pode ser definida como uma falha desse hormônio em suprir adequadamente a produção hepática de glicose e como consequências advindas da resistência insulínica, é o acúmulo de espécies de lipídeos citotóxicos, a exemplo o colesterol livre (não esterificado) e ácidos graxos livres no fígado. Estes, fazem com que haja dano na célula hepática, evento chamado de lipotoxicidade (ARGO; CALDWELL, 2009; DAI et al., 2017).

## **2.2 Tecido adiposo**

O tecido adiposo é caracterizado como um depósito de triglicerídeos, é reconhecido, majoritariamente, como um órgão dinâmico e que está envolvido em processos metabólicos, endócrinos e imunológicos (SHARMA; STAELS, 2007; POLYZOS; KOUNTOURAS;

MANTZOROS, 2016). O tecido adiposo subcutâneo (TAS), constitui 85% da massa adiposa do corpo, e o tecido adiposo visceral (TAV) 10% (SHULMAN et al., 1990). Todavia, o TAV em excesso pode conferir mais risco aumentado para doença metabólica do que TAS em excesso, este, por sua vez, apresenta influência metabólica protetora (FOX et al., 2007; BOUCHI et al., 2015; AKBAR et al., 2019).

Em mamíferos, existem dois tipos diferentes de tecido adiposo, a saber, o tecido adiposo branco e marrom. TAV e TAS são tecidos adiposos brancos, que compõem a grande maioria do tecido adiposo em humanos adultos; compreende > 50% na obesidade. O metabolismo celular dos adipócitos brancos é mais voltado para o armazenamento energético. O tecido adiposo marrom (TAM), abrange apenas 0,05% da massa corporal total em humanos, estes, por sua vez, desacoplam a fosforilação oxidativa do transporte de elétrons, gerando calor em vez de adenosina trifosfato (ATP) para a manutenção da temperatura do corpo e do consumo de energia (O'ROURKE, 2018; LEE et al., 2019).

A disfunção do tecido adiposo está subjacente à patogênese da doença metabólica. Os lipídeos e seus metabólitos são moléculas particularmente de alta energia e, como tal, o veículo de armazenamento de energia preferido para os adipócitos. O tecido adiposo, durante a escassez de energia, mobiliza para a circulação os triglicerídeos para ser usados como fonte energética para os outros tecidos, por meio da lipólise (TANDON; WAFER; MINCHIN, 2018; O'ROURKE, 2018).

A condição de obesidade está associada à diminuição das defesas antioxidantes; a supressão das capacidades antioxidantes da enzima glutathione-S-transferase A4 (GSTA4) em adipócitos resulta em aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e disfunção mitocondrial. A expressão das enzimas glutathione peroxidase (GPXs), superóxido dismutase (SOD) e GSTA4 são reduzidas em indivíduos obesos e resistentes à insulina (CURTIS et al., 2010; SRIKANTHAN et al., 2016).

Cerca de 97% do volume de adipócitos é composto por uma gota de lipídeo unilocular, tráfego de entrada e saída, que é rigidamente regulado por várias proteínas de ligação, transferência de ácidos graxos, mutações nas quais estão entre os muitos polimorfismos genéticos que contribuem para a obesidade comum e lipodistrofias congênitas (SMITH; ORDOVÁS, 2012).

Todo esse mecanismo promove uma alta capacidade de armazenamento de lipídeos com segurança pelos adipócitos, mais que qualquer outra célula de mamífero, por outro lado, quando

ultrapassados seus limites de armazenamento, levam à deposição ectópica de lipídeos nos tecidos periféricos e, conseqüentemente, ocasiona doença metabólica (O'ROURKE, 2018).

A hipertrofia de adipócitos acontece, quando são expostos a excesso de nutrientes, é um mecanismo adaptativo que mantém a capacidade de tamponamento de nutrientes do tecido adiposo e protege outros tecidos da lipotoxicidade (JOHANNSEN et al., 2014; MUIR et al., 2016). Os adipócitos podem chegar a uma hipertrofia de 200  $\mu$ M de diâmetros, além de estar forte e diretamente relacionada com a doença metabólica em obesos (ARNER et al., 2010; VEILLEUX et al., 2011).

A hipertrofia de adipócitos desenvolve estado de hipóxia celular, que desencadeia estresse celular, incluindo estresse do retículo endoplasmático e estresse oxidativo. Dentre os vários causadores de estresse oxidativo, o mais importante é o excesso de nutrientes (HOTAMISLIGIL; DAVIS, 2016). As respostas ao estresse celular estão interligadas a outros processos celulares fundamentais, incluindo inflamação e metabolismo. O sistema imunológico é altamente dependente de energia, com consumo de até 20% das necessidades energéticas totais do corpo (SEGERSTROM, 2002).

As citocinas pró-inflamatórias expressas pelas células do sistema imunológico induzem à resistência insulínica na maioria das outras células, e regulam negativamente a expressão das moléculas de sinalização da insulina, reduzindo a utilização da glicose pelos tecidos não imunes para preservar energia para o sistema imune. Esta ligação entre imunidade e metabolismo, a qual denomina-se metainflamação, ocorre em todos os tecidos, todavia, na obesidade tem sua gênese no tecido adiposo (HOTAMISLIGIL, 2006; LI et al., 2018).

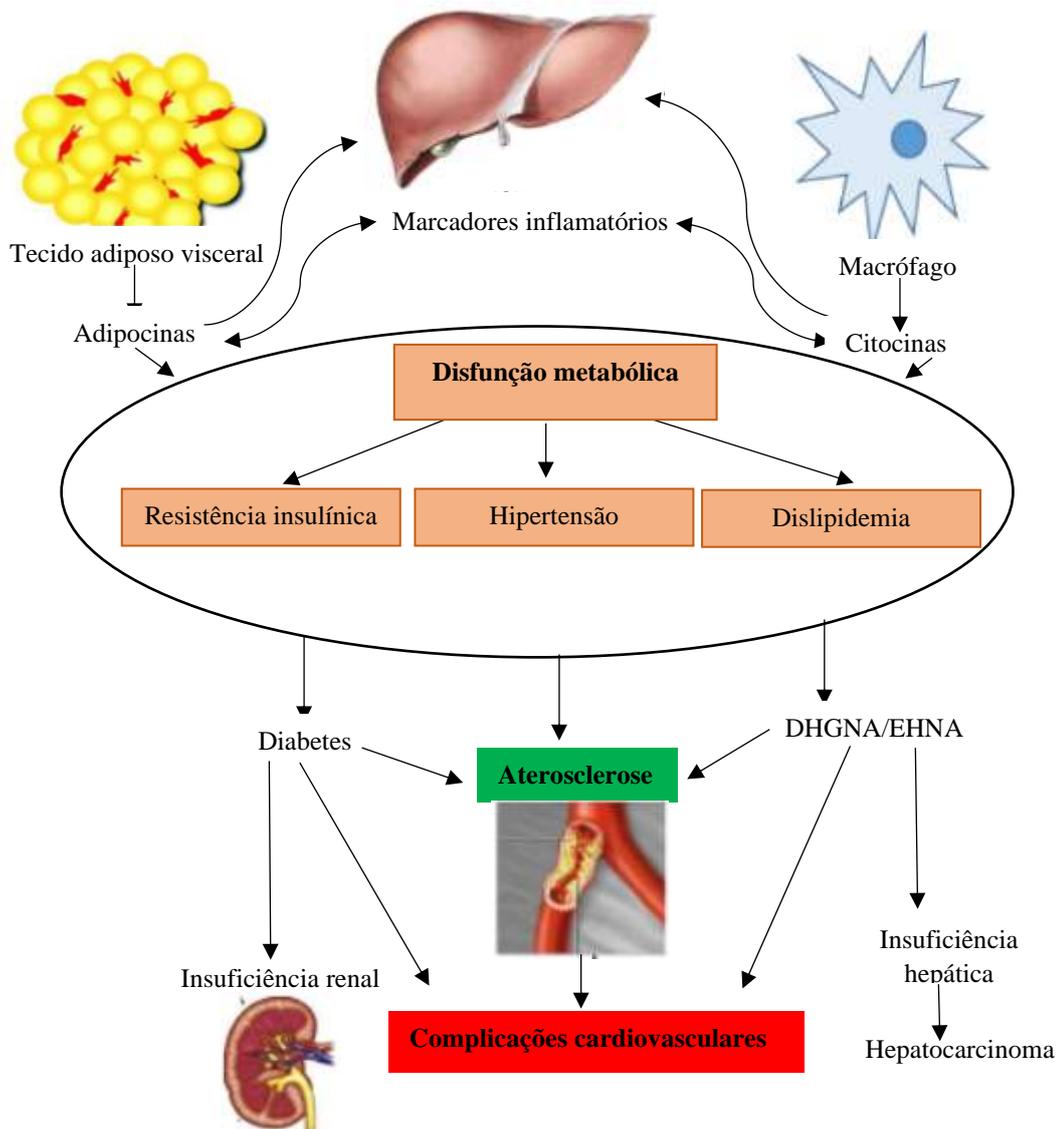
A relação entre o tecido adiposo e a inflamação foi comprovada pela primeira vez em 1990, quando o RNAm do fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) foi isolado do tecido adiposo de roedores obesos e descobriu-se que atenuava os eventos de fosforilação durante a sinalização de insulina (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; FEINSTEIN et al., 1993).

A resposta inflamatória oriunda do excesso de nutrientes, estresse celular, ocasionados pela hipóxia, gera apoptose de adipócitos, à medida que macrófagos e outras células imunes se infiltram no tecido adiposo para remover os adipócitos mortos e detritos. A expressão de mediadores inflamatórios pelas células imunes infiltradas, favorecem à resistência insulínica nos adipócitos vivos, prejudicando ainda mais o metabolismo do tecido adiposo (LAVIN et al., 2015; O'ROURKE, 2018).

Conforme o quadro inflamatório avança, uma matriz fibrótica é produzida, onde uma grande quantidade de colágenos, bem como outras proteínas da matriz extracelular são

depositadas em excesso, consequentemente diminuição da capacidade hipertrófica dos adipócitos, acentuando o transbordamento e ocasionando colapso do tecido adiposo (SINGER; CLARK, 1999; LI et al., 2018). A exposição do tecido adiposo a elevados níveis de EROS diminui a expressão de adiponectina, uma adipocina que que exibe propriedades de sensibilizantes à insulina, antiaterogênica e anti-inflamatória (WANG et al., 2013; YE; SCHERER, 2013).

Indivíduos com doença metabólica estão mais susceptíveis a outras comorbidades, incluindo síndrome do ovário policístico, esteatose hepática, cálculos biliares de colesterol, câncer, como o de mama, pancreático, colorretal e próstata. A hipertrofia dos adipócitos gera altos níveis de EROS que afetam a sinalização e o endotélio perivascular ou células imunes residentes, conforme figura 2 (SRIKANTHAN et al., 2016; LE LAY et al., 2014).



**Figura 2** - Interação de adipocinas, citocinas e marcadores inflamatórios que contribuem para o desenvolvimento da doença metabólica e suas complicações.

DHGNA (doença hepática gordurosa não alcoólica);  
EHNA (esteatohepatite não alcoólica).

**Fonte:** Adaptado de Srikanthan e colaboradores (2016).

Quando o metabolismo lipídico hepático está desregulado, devido à presença de grande quantidade de gordura, e não consegue mais processar o influxo de TGs, inevitavelmente o estresse lipoperoxidativo, a geração de EROs, a inflamação e a disfunção dos hepatócitos resultam no desequilíbrio entre a biodisponibilidade e eliminação de lipídeos, causas diretas de esteatohepatite não alcoólica (EHNA), que é um dos graus mais graves da esteatose e que pode progredir para fibrose, cirrose e hepatocarcinoma (LEE et al., 2019; LI et al., 2020).

### **2.3 Uso de produtos naturais nas doenças metabólicas**

É histórico o uso de produtos naturais como componentes de medicamentos tradicionais (CHEN et al., 2018). A utilização de ervas medicinais para tratamentos de várias doenças tem implicado avanços importantes nas terapias medicamentosas atuais. As plantas comumente utilizadas contêm numerosos componentes bioativos que proporcionam um papel ativo no tratamento ou prevenção de diversas enfermidades (KAUR; KAUR, 2018).

Diversos estudos descreveram os potenciais efeitos adversos das farmacoterapias médicas convencionais, tal fato tem impulsionado novas pesquisas em alvos terapêuticos complementares com uso de produtos naturais, a exemplo produtos fitoterápicos e alimentos funcionais (GURIB-FAKIM, 2006; GUNDERMANN et al., 2011).

Hoje, a grande maioria de todos os medicamentos usados pela humanidade são de fontes naturais, derivados quimicamente modificados ou miméticos obtidos de produto natural inalterado (LI et al., 2018). Em estudo abrangente, 6% de todos os medicamentos aprovados entre 1981 e 2014 são produtos naturais inalterados, 26% são derivados de produtos naturais e 32% são sintéticos de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Inúmeras pesquisas apontam que muitas ervas e produtos naturais têm sido amplamente utilizados para melhora dos distúrbios metabólicos. Diversos mecanismos envolvidos no sistema glicêmico e na modulação do metabolismo dos lipídeos por plantas foram descritos, como: estresse antioxidante, anti-inflamatório, redução de captação de ácidos graxos pelos hepatócitos, redução da lipogênese hepática *de novo*, aumento da lipólise e aumento da  $\beta$  oxidação de ácidos graxos (CHEN et al., 2016; LI et al., 2020).

Atualmente, não existem tratamentos específicos para a cura das doenças metabólicas e continua sendo um desafio. As estratégias atuais baseiam-se, primariamente, na recomendação da prática regular de exercícios físicos associados a uma alimentação saudável e uso de drogas farmacológicas (PEDERSEN; SALTIN, 2015; SAKELLARIOU et al., 2016; LEE et al., 2019).

Todavia, a adesão às recomendações de mudanças comportamentais ainda é baixa e as terapias aplicadas recentemente têm exibido várias limitações e efeitos colaterais, incluindo distúrbios gastrointestinais, hipoglicemia, disfunção hepática, mialgia, ganho de peso e danos cardiovasculares (RAMKUMAR; RAGHUNATH; RAGHUNATH, 2016; WANG; HOYTE, 2019). Portanto, a busca por medicamentos eficazes a partir de produtos naturais para o tratamento de doenças metabólicas tem atraído cada vez mais atenção (ANDRES; ARANGO, 2011).

A utilização de compostos naturais na doença metabólica é relatada na literatura, como é o caso do extrato de *Rhodiola e salidroside*, que é amplamente utilizada como fitoterápicos e suplementos dietéticos na Ásia, Europa e Estados Unidos, foi observado efeito antidiabético por meio da ativação da Adenosina monofosfato-ativado proteína quinase (AMPK) (ZHENG et al., 2019). A berberina, uma droga comumente usada na medicina tradicional chinesa, tem mostrado efeito terapêutico na dislipidemia e diabetes em diversos estudos, onde a atividade terapêutica foi evidenciada pela redução da esteatose hepática em células HepG2, bem como diminuição de colesterol em pacientes hipercolesterolêmicos (XIA et al., 2011; YUAN et al., 2015; SUN et al., 2018; XU et al., 2021).

O extrato de etanol de *Symplocos cochinchinensis*, que integra a fitoterapia indiana, foi descrito para regular a lipogênese e aumentar a sensibilidade à insulina. Tal atividade foi evidenciada ao observar redução de expressões gênicas capazes de modular o acúmulo de lipídeos e diminuir a resistência à insulina (ANTU et al., 2016). O ácido oleanólico, um composto triterpenoide presente em muitas plantas, é amplamente utilizado na medicina chinesa como hepatoprotetor. Seu efeito atribui-se à supressão do acúmulo de triglicerídeos no fígado (LIU et al., 2013).

A quercetina, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias tem muitas funções biológicas, e suas qualidades antidiabéticas foram amplamente investigadas. A quercetina pode melhorar a hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Seus efeitos foram evidenciados ao suprimir radicais livres e estresse oxidativo, diminuir o acúmulo de lipídeos em condições hiperglicêmicas, bem como influenciar a homeostase da glicose por meio da estimulação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT 4) translocação no músculo esquelético

e inibição da glicose 6-fosfatase (G6Pase) (MACIEL et al., 2013; ALAM; MEERZA; NASEEM, 2014; EID et al., 2015; CHEN et al., 2016).

Estudos relataram o envolvimento dos efeitos dos flavonoides sobre a homeostase lipídica, cujos flavonoides extraídos de *Lomatogonium rotatum* reduziram os níveis de lipídeos e agiram na prevenção da obesidade por meio do aumento da fosforilação de treonina-172 e proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) (BAO et al., 2016). No estudo conduzido por Qin (2016), as ações terapêuticas dos flavonoides foram observadas em atividade imunomoduladora, anti-inflamatória e antioxidante.

Os efeitos benéficos da curcumina na esteatose hepática, foram evidenciados associando-os às propriedades modificadoras de lipídeos, antioxidantes, anti-inflamatórias, redutor de resistência à insulina, antiesteatóticas e antifibróticas (SAHEBKAR, 2013; SAADATI et al., 2019). Estudos descreveram os efeitos positivos do resveratrol na saúde metabólica. O resveratrol reduz o conteúdo lipídico no fígado por diferentes mecanismos, incluindo diminuição da lipogênese e aumento da oxidação de ácidos graxos, além de reduzir a peroxidação lipídica (SHANG et al., 2008; S.GÓMEZ-ZORITA et al., 2012; ALBERDI et al., 2013).

Notavelmente, há uma grande demanda para explorar abordagens eficazes para obtenção de novas terapias aplicáveis no tratamento das doenças metabólicas (YAO et al., 2016).

## **2.7 Atividades farmacológicas da Bergenina**

A bergenina é uma isocumarina cristalina incolor, obtida majoritariamente de espécies de *Bergenia*, e é um C-glicosídeo do ácido 4-O-metilgálico (HAY; HAYNES, 1958). O estudo de isocumarina e seus derivados são de grande importância, pois elas possuem uma ampla gama de atividades biológicas comprovadas, dentre as quais pode-se citar antimicrobiana, antioxidante, antitumoral (RUNPANICHLERT et al., 2010; TIANPANICH et al., 2011; LAI et al., 2019).

A bergenina é relatada na literatura como uma substância de interesse farmacológico possuindo atividades biológicas. No quadro 1, apresenta-se um panorama geral da categorização e síntese das publicações relacionadas às ações farmacológicas da bergenina. Destacando-se os autores, ano de publicação, título e resultados dos artigos selecionados. Trata-se de uma revisão da literatura realizada no período de 2016 e 2019 nas bases de dados PubMed e Science Direct.

Com base nos 31 estudos revisados, as atividades farmacológicas da bergenina foram amplamente identificadas na literatura selecionada. Tal fato se justifica pela evidência dos estudos encontrados relacionados à atividade anti-inflamatória, citoprotetora, imunomoduladora, antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, metabolismo ósseo, espermatogênese, antiplasmodial, inibidor enzimático e ansiolítica. A literatura reporta que a bergenina ganhou importância no meio científico apenas no século 21, quando descobertas as suas propriedades farmacológicas, a partir de então foram exploradas gradativamente.

De forma consistente, considera-se as atividades anti-inflamatória, citoprotetora e antitumoral da bergenina as principais atividades em questão, discutida por 18 dos 31 estudos avaliados. Embora esta revisão tenha se concentrado em estudos publicados nos últimos 4 anos, estudos anteriores relataram achados semelhantes. Os resultados encontrados nesta pesquisa corroboram com as revisões de Patel et al., (2012) e Bajracharya, (2015) quando descreveram a variabilidade farmacológica da bergenina relacionadas às atividades supracitadas.

A literatura existente sugere que a anti-inflamação, citoproteção e atividade antitumoral da bergenina tem impulsionado novas pesquisas. Notavelmente, todos os 8 artigos sobre inflamação relataram associações da bergenina quanto à diminuição de citocinas pró-inflamatórias em colite, bronquite crônica e artrite. Nessa perspectiva, os estudos deram luz a uma nova possível classe de medicamentos anti-inflamatórios à base de produto natural, com pouco ou nenhum efeito colateral. A bergenina reduziu a progressão e gravidade da artrite através de mecanismo antioxidante, anti-inflamatório e estabilizador de membrana.

Em relação à atividade citoprotetora, a bergenina melhorou de forma significativa a imunossupressão ocasionada pela Ciclofosfamida elevando os níveis de IgM e IgG no soro, melhorando a capacidade antioxidante. Já em células osteoblásticas, aumentou os níveis de atividade da glicoxalase I, glutatona, heme oxigenase -1, na presença de metilglioxal. Atribuindo um efeito positivo da bergenina como citoprotetora e antioxidante.

A bergenina também melhorou a nefropatia diabética inibindo o estresse oxidativo. Apresentou efeitos neuroprotetores da doença de Alzheimer através da diminuição da atividade da acetilcolinesterase. Dados semelhantes foram encontrados no trabalho de Yun et al., (2015), quando a bergenina diminuiu a dependência física de morfina através da via antioxidante.

Em se tratando de efeitos antitumorais, dos 5 estudos relacionados a esta atividade, 3 eram oriundos da modificação da molécula da bergenina, como é o caso do estudo conduzido por Pavan Kumar et al., (2019), que sintetizou uma série de híbridos da bergenina capazes de interferir no ciclo celular tumoral, diminuindo sua capacidade mitótica. A justificativa desse

fato é que, a modificação molecular da bergenina, conferiu-lhe características mais citotóxicas às células cancerígenas. Assim, é possível afirmar que as inúmeras atividades farmacológicas da bergenina relatadas nestes estudos, podem contribuir de forma significativa em novas farmacoterapias.

**Quadro 1** – Estudos relacionados às ações farmacológicas da bergenina.

Autores, ano	Atividade farmacológica	Título	Resultados
AGGARWAL, D. et al, (2016)	<b>Citoprotetora</b>	Bergenina atenua lesão renal revertendo disfunção mitocondrial em modelo de rato hiperoxalúrico induzido por etileno glicol.	O tratamento com bergenina restaurou as atividades dos complexos I, II e IV da cadeia de transporte de elétrons; reduziu a peroxidação lipídica e elevou os níveis de antioxidantes regulados, melhorou o estado de disfunção mitocondrial; reduziu a produção de IL-1 $\beta$ e expressão de KIM-1 e MCP-1 no tecido renal.
BARAI et al, (2019)		Efeitos neuroprotetores da bergenina na doença de Alzheimer (D.A): investigação através de docking molecular, estudos in vitro e in vivo.	A bergenina inibiu dose-dependente de AChE e BuChE in vitro e considerado seguro até 50 $\mu$ M. O tratamento com bergenina a 80 mg / kg levou a uma redução significativa (p <0,05) da A $\beta$ <sub>1-42</sub> e aliviou os níveis de p-tau, levando a níveis significativamente baixos (p <0,01) de p-tau em homogenatos cerebrais de ratos em comparação com ratos injetados com ICV STZ.
QIAO et al, (2019)		A bergenina impede a geração de matriz extracelular nas células mesangiais glomerulares e melhora a nefropatia diabética em camundongos, inibindo o estresse oxidativo <i>pela via</i> mTOR / $\beta$ -TrcP / Nrf2.	A bergenina impediu a geração de ECM nos GMCs. Também impediu a geração de ECM. Melhorou o DN através da via mTOR/ $\beta$ -TrcP/Nrf2. A potência anti-ND da bergenina é quase equivalente à da mesma dose de metformina.
LEE; CHOI, (2018)		Efeitos da bergenina no dano induzido por metilglioxal em células osteoblásticas MC3T3-E1.	Bergenina inibiu o receptor solúvel induzido por MG para AGE, interleucina, espécies reativas de oxigênio e produção de superóxido mitocondrial. Aumentou os níveis de atividade da glioxalase I, glutatona, heme oxigenase-1 na presença de MG.
QI et al, (2018)		Efeito protetor da Bergenina contra a imunossupressão induzida pela ciclofosfamida por efeito imunomodulador e antioxidante em camundongos Balb/c.	Bergenina melhorou a função imune humoral, aumentando o nível de IgM e IgG no soro. Aumentou as funções dos macrófagos peritoneais, a proliferação de linfócitos T e B, as atividades das células NK e CTL e os subconjuntos de linfócitos T (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ). Elevou a capacidade antioxidante total, incluindo atividades de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Px).

SUH et al., (2019)	<b>Metabolismo ósseo</b>	Efeito da bergenina na diferenciação de osteoclastos induzidos por RANKL na presença de metilglioxal (MG).	A bergenina reverteu a atividade TRAP dos osteoclastos inibida por MG. Diminuiu a atividade de reabsorção óssea dos osteoclastos. Diminuiu a expressão dos genes ERK1, Akt2, MMP-9 e OSTM1 na presença de MG. A bergenina aumentou a $[Ca^{2+}]$ a função mitocondrial e a glicoxalase I reduzida em MG.
HOU et al., (2019)		Bergenina ativa SIRT1 como um novo agente terapêutico para osteogênese de células-tronco mesenquimais ósseas.	Bergenina melhorou os marcadores específicos para osteoblastos e reduziu os de adipócitos in vitro; melhorou significativamente a cicatrização óssea; regulou positivamente a expressão de SIRT1.
SUL et al., (2018)		Bergenina aumenta a diferenciação osteogênica e evita citotoxicidade induzida por metilglioxal em osteoblastos MC3T3-E1.	Aumentou significativamente a síntese de colágeno, a atividade da fosfatase alcalina, a síntese de osteocalcina e a mineralização nas células. Aumentou a proporção de osteoprotegerina para ativação do fator nuclear Kappa-B ligante e liberação de ciclofilina B.
KAUR, KAUR, (2018).	<b>Antimicrobiana</b>	Avaliação do potencial antileishmania in vitro e in vivo de <i>Bergenia ligulata</i> rica em bergenina. Extrato de raiz contra leishmaniose visceral em camundongos BALB/c por imunomodulação.	Reduziu significativamente a carga do parasita em 95,56% (dose-dependente); Aumentou o anticorpo IgG2a, resposta imune Th1 protetora.
OLIVEIRA et al., (2019)		O efeito preventivo da bergenina contra o desenvolvimento de colite aguda induzida por TNBS em ratos está associado à inibição de mediadores inflamatórios e às vias de sinalização do inflamassoma NLRP3 / ASC.	A bergenina reduziu proteínas pró-inflamatórias e citocinas pela modulação da sinalização STAT3 e NF- $\kappa$ B. Bloqueou as vias de inflamassoma NLRP3/ASC canônicas e não canônicas.

YANG et al., (2017)		O produto natural bergenina melhora a lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeos, inibindo a ativação de NF-kappaB	Reduziu significativamente o edema pulmonar; Diminuiu as células inflamatórias, a produção de IL-1 $\beta$ e IL-6. Reduziu a produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-6 no soro de camundongos; inibiu acentuadamente a fosforilação de NF- $\kappa$ B p65 induzida por LPS; inibiu significativamente a translocação nuclear e a fosforilação de NF- $\kappa$ B p65 estimulada por LPS em células Raw264.7.
ZHANG et al., (2019)		Mecanismos de tratamento com bergenina na bronquite crônica analisados por cromatografia líquida-espectrometria de massas em tandem com base na metabolômica.	A bergenina suprimiu a infiltração de células inflamatórias. Inibiu a secreção de muco e reduziu os glóbulos brancos no líquido de lavagem broncoalveolar.
REN et al., (2016)	<b>Anti-inflamatória</b>	Efeitos comparativos da dexametasona e bergenina na bronquite crônica e seus mecanismos anti-inflamatórios com base na metabolômica RMN.	A dexametasona e a bergenina suprimiram a infiltração de células inflamatórias. O mecanismo anti-inflamatório da dexametasona pode estar associado ao metabolismo do BCAA e à glicólise, enquanto a bergenina pode alterar o metabolismo do BCAA, o metabolismo da glicina, da serina e da treonina.
WANG et al., (2018)		A bergenina, agindo como agonista do PPAR $\gamma$ , melhora a colite experimental em camundongos, regulando a expressão de SIRT1 e, portanto, inibindo a ativação de macrófagos mediada por NF- $\kappa$ B.	Inibiu o mRNA e as expressões proteicas da IL-6 e TNF- $\alpha$ nos tecidos do cólon, mas não a das proteínas associadas à barreira mucosa ocludina, E-caderina e MUC-2. Inibiu significativamente as expressões de IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como a translocação nuclear e a atividade de ligação ao DNA de NF- $\kappa$ B-p65 peritoneais em macrófagos estimulados por LPS.
EL-HAWARY et al., (2016)		Atividade antiartrítica do 11- <i>O</i> -(4'- <i>O</i> -metil-galil)-bergenina e extrato de <i>Crassula capitella</i> em ratos.	A Bergenina com as doses testadas pôde reduzir a progressão e a gravidade da artrite. Bergenina diminui doenças inflamatórias crônicas como Artrite através de mecanismo antioxidante, anti-inflamatório e estabilizador de membrana.

YU et al, (2017)		Um novo composto, a metilbergenina, juntamente com oito compostos conhecidos com citotoxicidade e atividade anti-inflamatória de <i>Ardisia japônica</i> .	Efeitos inibitórios contra a produção de NO em macrófagos murinos RAW 264,7 estimulados por LPS; compostos 7 e 9 exibiram citotoxicidade contra células A549 e HepG2.
YANG, KAN, WU (2016)		A bergenia melhora a nefropatia diabética em ratos através da supressão da inflamação renal e da via TGF- $\beta$ 1-Smads.	Bergenia normalizou os parâmetros funcionais, melhorou as alterações histológicas diabéticas in vivo e inibiu a proliferação de MCs in vitro. Os níveis de fator de necrose tumoral alfa, IL-1 e IL-6 no tecido renal e MCs tratados com bergenia foram reduzidos. Reduziu acentuadamente a produção do fator de crescimento transformador - $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1); reduziu expressão de p-Smad2 / 3 e promoveu a expressão de Smads in vivo e in vitro.
SINGH et al, (2017)	<b>Ansiolítica</b>	Atividade antianxiedade guiou o isolamento e a caracterização da bergenia das raízes de <i>Caesalpinia digyna</i> Rottler.	A bergenia, isolada das raízes de <i>C. digyna</i> , exibiu significativa atividade antianxiedade em 80 mg / kg pó em três modelos diferentes.
AMBIKA, SARAVANAN, (2016)	<b>Hipoglicemiante</b>	Efeito da bergenia no metabolismo hepático da glicose e sinalização da insulina em camundongos C57BL / 6J com diabetes tipo 2 induzidas por dieta hiperlipídica.	A bergenia reduziu a hiperglicemia e insulina. Melhorou a via de sinalização da insulina.
LIANG et al, (2017)		Síntese e estudo da atividade antitumoral in vitro e in vivo de híbridos de bergenia esterificada com 11-hidroxil / ácido cinâmico.	Novos híbridos de bergenia/ácido cinâmico com melhor equilíbrio de solubilidade aquosa e lipídica. Atividade antitumoral in vitro superior e moderada in vivo, além de baixa toxicidade. O composto 5c induziu parada do ciclo celular em HepG2 na fase G <sub>2</sub> /M com apoptose mediada por mitocôndrias. 5c inibiu a expressão das proteínas da família Akt e Bcl-2 de maneira dose-dependente e do tempo, podendo ser um novo inibidor da via de sinalização de Akt/Bcl-2 para estudos pré-clínicos adicionais.

SHEN et al, (2018)	<b>Antitumoral</b>	Preparação de polímeros de bergenina - poli(ácido lático) e estudos de liberação controlada in vitro.	Bergenina-PLA na proporção de 1:30 possuiu boas propriedades biológicas e baixa citotoxicidade em variadas concentrações; mostrou-se bom modo de administração para medicamento com liberação prolongada; atividade antitumoral da bergenina-PLA aumentou significativamente em comparação à bergenina.
KUMAR et al, (2019)		Síntese e avaliação biológica de híbridos de bergenina-1,2,3-triazol como nova classe de agentes anti-mitóticos.	Foram sintetizados híbridos de bergenina-1,2,3-triazol. Entre os derivados, o composto 4j manifestou potente atividade citotóxica. Análise do ciclo celular 4j induziu parada do ciclo na fase G <sub>2</sub> /M em células HeLa. O ensaio de polimerização de tubulina in vivo mostra que 4j interrompe sua montagem.
JAYAKODY et al., (2018)		Bergenina: um andaime promissor para novos inibidores da galectina-3.	Bergenina tem o potencial de se ligar efetivamente ao domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) da galectina-3. Interação plausível de empilhamento $\pi$ entre a porção aromática da bergenina e o resíduo His158 no local de ligação. Bergenina exerce potencialmente um efeito inibitório sobre a galectina-3.
SHI et al., (2019)		A atividade anticâncer da bergenina contra células cancerígenas cervicais envolve apoptose, parada do ciclo celular, inibição da migração celular e a via de sinalização STAT3.	Bergenina aumentou expressão de Bax e diminuiu a expressão de Bcl-2. Verificou-se que a bergenina poderia induzir a parada do ciclo celular G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> .
OLIVEIRA et al, (2017)		<b>Antioxidante</b>	Bergenina de <i>Peltophorum dubium</i> : isolamento, caracterização e atividades antioxidantes em sistemas não biológicos e eritrócitos.

KHAN et al, (2016)		Atividades antioxidantes e antiplasmodiais da bergenina e 11-O-galoilbergenina isoladas de <i>Mallotus philippensis</i> .	O composto 2 foi considerado um antioxidante mais potente que o composto 1. Composto 2 exibiu melhores resultados de CE <sub>50</sub> em comparação com tocoferol, sendo comparável ao ácido ascórbico. Ambos os compostos exibiram boa atividade contra a cepa sensível a cloroquina de <i>Plasmodium</i> .
JI et al, (2019)	<b>Antiparkinsoniano</b>	A bergenina melhora a doença de Parkinson (DP) induzida por MPTP, ativando a via de sinalização PI3K / Akt.	Bergenina atenuou os efeitos citotóxicos nas células PC12 induzidas pelos sobrenadantes da cultura derivados das células microgliais induzidas por LPS.
SANJEEV et al, (2019)	<b>Espermatogênese</b>	Isolamento, caracterização e atividade terapêutica da bergenina da folha de <i>marlberry</i> ( <i>Ardisia colorata</i> Roxb.) Nas complicações testiculares diabéticas em ratos albinos Wistar.	Bergenina melhorou significativamente os processos fisiológicos e metabólicos e reverteu os testículos diabéticos; modulando eventos espermatogênicos e proliferação de células germinativas; restaurou a qualidade espermática; reduziu os danos no DNA espermático e equilibrou os níveis de enzimas antioxidantes.
DONG, ZHOU, SONG, (2018)	<b>Inibidor enzimático</b>	Efeitos inibitórios in vitro da bergenina nas enzimas do citocromo P450 do fígado humano.	Bergenina inibiu a atividade do CYP3A4, 2E1 e 2C9. Inibidor competitivo de CYP2E1 e 2C9. Inibidor dependente do tempo para CYP3A4.
DWIVEDI et al., (2017)	<b>Imunomodulador</b>	A bergenina fitoquímica melhora as Respostas do auxiliar T e a imunidade antimicobacteriana ativando a via MAP Cinase em macrófagos.	Bergenina ativou as vias MAP quinase e ERK; induziu respostas imunes de Th1; inibiu potencialmente o crescimento bacilar do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
KUMAR et al., (2019)		A bergenina fitoquímica como imunoterapia adjuvante para tuberculose em camundongos.	Cotratamento com o fármaco anti-TB Isoniazida e bergenina produz efeitos aditivos e reduz significativamente as cargas bacterianas em comparação com o tratamento com isoniazida isolado. Bergenina reduziu o comprometimento imunológico induzido por Isoniazida.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da bergenina em modelos experimentais in vitro relacionados a doenças metabólicas.

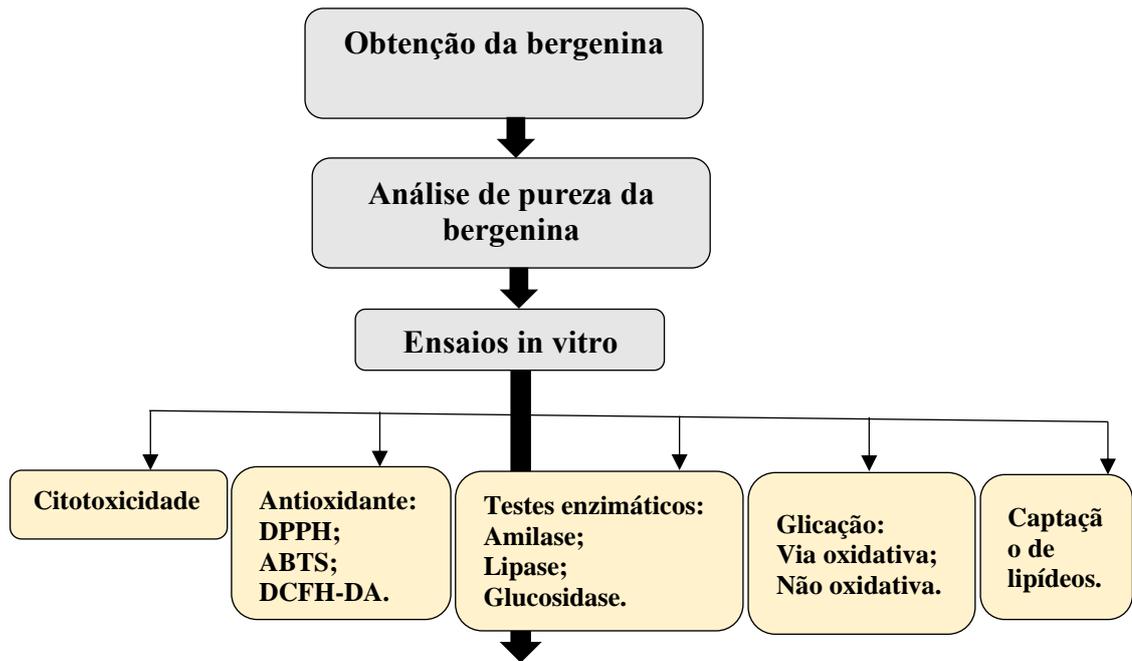
#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a citotoxicidade da bergenina em células tumorais e não tumorais;
- Investigar as atividades antioxidantes da bergenina in vitro;
- Estudar os efeitos da bergenina sobre a inibição de enzimas digestivas e da glicação oxidativa e não oxidativa;
- Analisar o efeito da bergenina sobre a captação de lipídeos.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Fluxograma

As atividades serão realizadas conforme a figura 3.



**Figura 3** - Delineamento experimental.

### 4.1 Obtenção da bergenia e avaliação do grau de pureza

A bergenia foi adquirida do laboratório CN Lab Nutrition. Asia Group com 98% de pureza. O grau de pureza da molécula foi avaliado por meio da injeção de uma solução da substância em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Proeminence, Shimadzu, Japão). O método utilizado foi a cromatografia de fase reversa usando como fase móvel acetonitrila: água acidificada com ácido fórmico 0,1% (70:30) de forma isocrática e detecção em 272nm.

### 4.2 Ensaio de Citotoxicidade

Este ensaio consiste na adição de um composto fluorogênico redox, a resazurina, ao meio de cultura das células cultivadas. A forma oxidada do alamar blue, a resazurina, possui

cor azul escura e fluorescência intrínseca limitada. Em células viáveis, a resazurina é reduzida a resofurina, a qual emite cor rosa, altamente fluorescente. Acredita-se que esse processo de redução seja mediado por enzimas mitocondriais, citosólicas e microssomais. Em células não viáveis a resazurina permanece na sua forma oxidada de coloração azul escura. A extensão da conversão de resazurina a resofurina reflete a viabilidade celular e pode ser quantificada pela leitura da fluorescência emitida em leitor de microplaca com filtro de excitação de 465nm e emissão de 540nm (NAKAYAMA et al., 1997). Neste ensaio, foram utilizadas células das linhagens: HepG2 e Fibroblasto humano (MRC5). As células foram cultivadas na concentração de  $5 \times 10^3$  células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, estas, foram tratadas com a bergenina nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200  $\mu\text{M}$ . Como controle negativo de morte, foi avaliada a citotoxicidade da bergenina com o meio de cultura e o diluente DMSO. Após o período de tratamento 24,48 e 72 horas, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de resazurina 0,4% (diluída 1:20). Após o tempo de metabolização da resazurina padronizado, que compreende de 2 horas, foi realizada a leitura da fluorescência. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo, onde Ft= (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e  $\Delta\text{Fb}$ = (fluorescência da célula + meio + resazurina).

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Ft} \times 100}{\text{Fb}}$$

### 4.3 Ensaios antioxidantes

#### 4.3.1 Atividade sequestrante do radical DPPH

O ensaio será realizado segundo metodologia utilizada por Molyneux, (2004), com modificações. Foram pesados 2 mg de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e dissolvidos em 12 mL de etanol absoluto. Em seguida, adicionou-se 270  $\mu\text{L}$  dessa solução e 30  $\mu\text{L}$  de etanol na microplaca, fazendo-se o ajuste com etanol na solução até que foi atingida a absorvância de  $1,00 \pm 0,1$  nm. Para conhecer a absorvância dos brancos, em uma placa de 96 poços foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  da bergenina (1 mg/mL) e 270  $\mu\text{L}$  de álcool etílico. Para o teste, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  da bergenina e 270  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH e a placa permaneceu incubada ao abrigo de luz por 30 minutos. Após esse tempo, realizou-se a leitura a 517 nm no leitor de ELISA. Como padrão e controle negativo, foi utilizado o ácido gálico e DMSO, respectivamente. Os resultados foram calculados segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ de atividade antioxidante} = 100 - (\text{Abs da amostra}/\text{média controle}) \times 100.$$

#### 4.3.2 Ensaio de varredura do radical ABTS

O 2,2'-azino-bis (ácido-etilbenzoalina-6-sulfônico) (ABTS), foi diluído em água destilada e oxidado com persulfato de potássio a 5 mM por 24 horas e coberto com papel alumínio, no escuro, em temperatura ambiente. Para conhecer a absorbância dos brancos, em uma placa de 96 poços foram adicionados 30 µL da bergenina (1 mg/mL) e 270 µL de água. Para o teste, foram adicionados 30 µL da bergenina e 270 µL da solução de ABTS e a placa permaneceu incubada ao abrigo de luz por 15 minutos. Após esse tempo, realizou-se a leitura a 630 nm no leitor de ELISA. Como padrão e controle negativo, foi utilizado ácido gálico e DMSO, respectivamente. Em seguida, foram efetuados os cálculos de inibição conforme metodologia descrita por Wahyuningrum et al., (2016), com modificações, por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de atividade antioxidante} = 100 - (\text{Abs da amostra}/\text{média controle}) \times 100.$$

#### 4.3.3 Atividade antioxidante celular

A avaliação da atividade antioxidante celular foi realizada segundo a metodologia descrita por Wolfe; Liu, (2007), com modificações. Nesse ensaio, foram utilizadas células MRC-5, plaqueadas na concentração de  $6 \times 10^4$ , em 100 µL do DMEM alta glicose, e incubadas por 24 horas. Após o período de incubação, os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS). Posteriormente, adicionou-se em uma microplaca de 96 poços, 100 µL de uma solução de 2,7-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) a 25 µM, dissolvida em tampão de Hank's, contendo a bergenina (50 µM), e incubados durante 60 minutos a 37°C e 5 % CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, os poços foram novamente lavados com PBS. Em seguida, foram tratados com 600 µM de dihidrocloreto de 2,2'-azobis (2metilpropionamida) (AAPH), e a fluorescência destes, foi mensurada utilizando leitor de ELISA, imediatamente, no comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão 520 nm, durante 60 minutos, em intervalos de 5 minutos. O controle positivo (quercetina – 50 µM) foi preparado com DCFH-DA e tampão Hank's e o controle negativo (DMSO) com PBS. Os resultados foram calculados segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ de atividade antioxidante} = 100 - (\text{Abs da amostra}/\text{média controle}) \times 100.$$

## 4.4 Inibições enzimáticas

### 4.4.1 Ensaio da atividade inibitória da lipase

Esta atividade enzimática foi determinada de acordo com Slanc et al., (2008), com ligeiras modificações. A Lipase pancreática tipo II, de porcino da SIGMA, com código L3126-25G, foi diluído em tampão TRISMA-HCL 75mM pH 8,5 e para preparar o substrato 4-Nitrophenyl palmitate (PNP) com código N2752-50G, foi diluído primeiro em acetonitrila, depois em etanol na proporção de 1:4. O padrão usado foi o Orlistate e as leituras foram feitas no Multimode Detetor DTX 800 da Beckman a 450nm. Em seguida, adicionou-se 30µL da bergenina, padrão e/ou controle (DMSO) nos diferentes poços da microplaca em triplicata, 250µL da enzima (0,8 mg/mL), e incubou-se por 5 minutos a 37°C ao abrigo de luz, adicionou-se 20µL de PNP (4mg/mL), incubou-se por 10 minutos ou até que a leitura do controle de 1,000±0,1. Em seguida, foram realizados os cálculos do percentual de inibição, bem como a determinação da CI<sub>50</sub> a inibição com valor maior de 50% para fazer diluições seriadas.

### 4.4.2 Atividade inibidora α-glicosidase

Esta atividade enzimática foi determinada de acordo com Andrade-Cetto e colaboradores (2008), com ligeiras modificações. Primeiramente, foi preparada a enzima numa concentração de 3mg/mL do Intestinal acetone powders from rat, sob agitação por 5 minutos, em seguida foi centrifugada a 3600rpm por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante que continha a enzima α-glicosidase já extraída, tanto o substrato 4-nitrofenil-D-glucopiranosido (4-NPGP) como a enzima foram diluídos em tampão fosfato 10mM pH 6,9. Em seguida, colocou-se 30µL da bergenina, acarbose (padrão) e/ou controle (DMSO) nos diferentes poços da microplaca em triplicata, 170µL da enzima extraída, foram incubados por 5 minutos a 37°C ao abrigo de luz, adicionou-se 100µL do 4-NPGP (5mg/ml), e incubados por 20 minutos ou até que a leitura do controle alcançasse 405nm de 1,000±0,1. Foram realizados os cálculos do percentual de inibição:

$$= 100 - [\text{Abs}_{a/p} / \text{Abs}_c] \times 100.$$

### 4.4.3 Inibição de α-amilase

O teste da enzima α-amilase foi determinado de acordo com Subramanian e colaboradores (2008), adaptado para microplaca. Inicialmente, colocou-se 30 µL da amostra,

acarbose (padrão) e/ou controle (DMSO) na concentração de 10 mg/mL. Em seguida, foram incubados por 5 minutos a 37°C com 100 µL da enzima (diluído em tampão fosfato 10mM pH 6,9), depois adicionou-se 170 µL do substrato (Amilase CNPG Liquiform) e imediatamente fez-se a primeira leitura com o leitor de microplaca a 405nm, depois foi incubado a 37°C por 20-40 minutos, até que a absorbância final do controle alcançasse 0,8-1,00 ± 0,1. Os resultados estão expressos em percentual de inibição e a CI<sub>50</sub> calculada através do programa estatístico GraphPad Prism 6.0. O padrão utilizado foi o acarbose.

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Abs}_{a/p} / \text{Abs}_c] \times 100$$

#### 4.5 Atividade antiglicante: Via Oxidativa

A atividade antiglicante foi determinada de acordo com Kiho e colaboradores (2004), com modificações. A reação foi efetuada em triplicata com concentrações de: Albumina (BSA) 8 mg/mL, Glioxal 30 mM, e bergenina 100 µM. As soluções de glioxal e BSA foram diluídas em tampão fosfato (200 mM, pH 7.4), contendo azida de sódio 3 mM como agente antimicrobiano. Os 300 µL da mistura total da reação foram compostos por: BSA (135 µL), glioxal (135 µL) e DMSO ou bergenina (30 µL) sendo incubados a 37°C durante 24 horas (em condições estéreis e no escuro). Após a incubação, cada amostra foi analisada no leitor de microplaca pela intensidade da fluorescência (emissão λ330 nm e excitação λ420 nm). A quercetina (100 µM) foi utilizada como padrão e o DMSO como controle negativo. Os resultados foram expressos em percentual de inibição.

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Fluor}_A / \text{Fluor}_C] \times 100$$

Onde: Fluor<sub>A</sub> = Fluorescência da Amostra

Fluor<sub>C</sub> = Fluorescência do Controle

##### 4.5.1 Via não oxidativa

A atividade antiglicante foi determinada de acordo à Kiho e colaboradores (2004), com modificações. Foram seguidos os passos usados na atividade antiglicante por via oxidativa, com exceção do glioxal, que foi substituído pela frutose (100 mM) e o tempo de incubação aumentou para 120 horas. A aminoguanidina (100 µM) foi utilizada como padrão de inibição.

## 4.6 Cultura celular

As linhagens celulares de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e fibroblasto humano (MRC-5), foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). No Laboratório de Cultura Celular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM), as células foram cultivadas nos meios de cultura DMEM alta glicose suplementados com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina-estreptomicina, em estufa a 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.6.1 Captação de ácidos graxos

O ensaio foi realizado conforme metodologia previamente descrita por Gao e colaboradores (2015), com modificações. As células HepG2 foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alta glicose na concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço em placas de 24 poços em estufa a 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, as células foram induzidas à esteatose adicionando-se ácido oleico a 1 mM e a bergenina nas concentrações 50, 25 e 12 µM. Como controle positivo, as células foram tratadas apenas com ácido oleico. No controle negativo, as células não receberam ácido oleico, mas DMSO, e como substância padrão de inibição da captação de lipídeos foi utilizado o Resveratrol (50, 25 e 12 µM). A inibição foi mensurada pelo método OIL RED O, um corante que colore de vermelho a gordura presente no interior da célula. Após retirar o meio de cultura, as células foram lavadas com PBS e, posteriormente, foram adicionados 250 µL de formaldeído a 4% em cada poço e placa foi incubada por 45 minutos em estufa a 37°C. Em seguida, o formaldeído foi removido, os poços foram lavados com PBS, adicionados 250 µL de OIL RED O 0,5% (0,05g/mL em álcool isopropílico 60%), a placa foi incubada por mais 30 minutos. Em seguida, o corante foi removido, os poços foram lavados com PBS e fotografados, as imagens foram fotografadas pelo microscópio Zeiss; depois foram adicionados 250 µL de álcool isopropílico para diluir o corante presente dentro das células. A placa foi agitada por 10 minutos em agitador de placas e, por fim, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 510 nm.

## 4.7 Análise Estatística

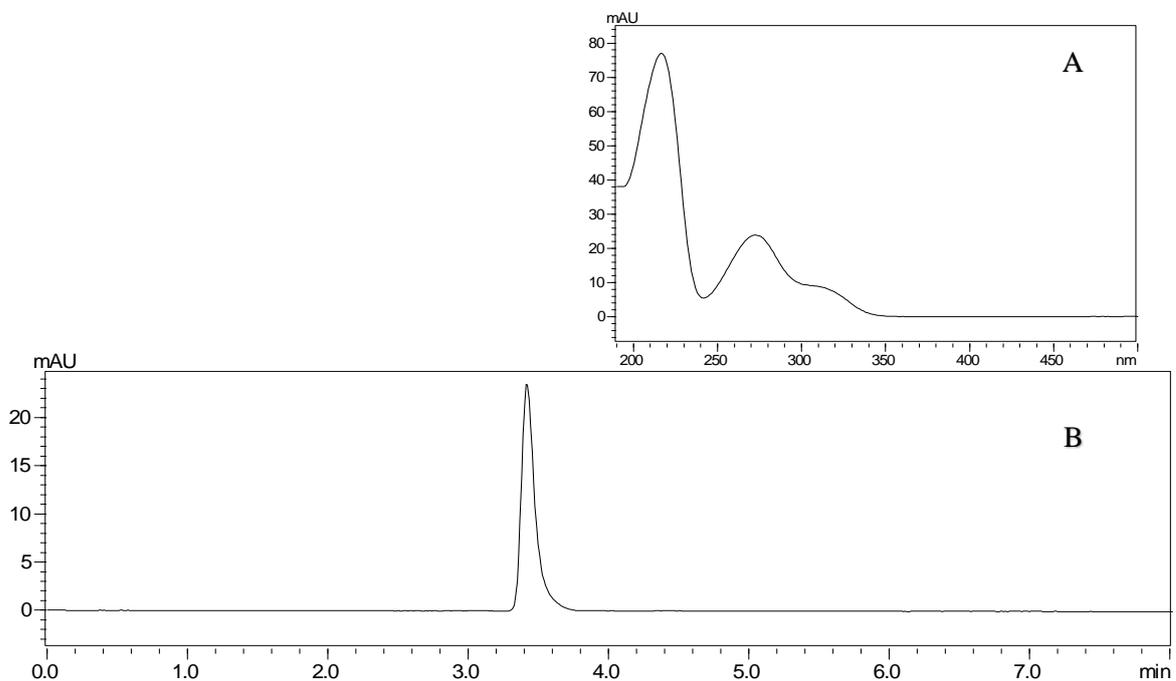
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  D.P.M. (Desvio Padrão da Média).

As médias foram analisadas por ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas (Dunnett com nível de significância  $p < 0,05$ ) pelo software GraphPad Prisma® 6.0

## 5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 5.1 Análise de pureza

Com o intuito de averiguar o grau de pureza da bergenina, foi realizada a análise pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), demonstrado na (figura 4). Como apareceu apenas um pico cromatográfico, como ilustra o (gráfico B), comprova o que foi informado pelo fabricante, que a bergenina está com pureza de 98%, e também está de acordo com a literatura (DHARMENDER et al., 2010; ALI et al., 2021).



**Figura 4** - Análise de pureza da bergenina através do método de HPLC. O gráfico (A) refere-se à absorbância da bergenina. O gráfico (B) representa o espectro UV da pureza da bergenina, analisados a 272nm.

### 5.2 Efeitos da bergenina sobre a viabilidade celular de HepG2 e MRC-5

É notório o interesse crescente por compostos derivados de plantas com perfil modulador celular capaz de agir na proliferação celular, ou mesmo, atuando como agentes citotóxicos, como é o caso das drogas para o câncer (DENG et al., 2020).

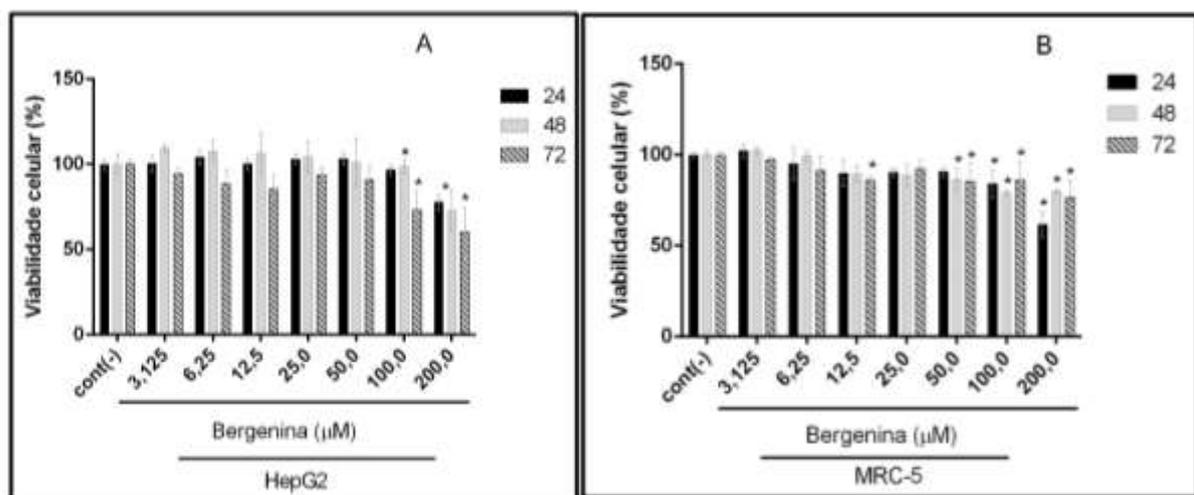
A medição da viabilidade celular é definida como o número de células viáveis em uma amostra e a proliferação de células desempenha papel fundamental para a elucidação dos mecanismos de ação de certos genes, proteína envolvidas na sobrevivência ou morte celular após exposição a agentes citotóxicos, e são geralmente usados para rastrear substâncias a fim

de averiguar se as moléculas possuem interferentes na proliferação celular ou exibem efeitos citotóxicos diretos (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016). Assim, a não toxicidade dos medicamentos é condição prévia para sua aplicação (XIANG et al., 2020).

Inicialmente, o composto bergenina foi testado nas concentrações de 3,12; 6,25 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu$ M em linhagens MRC-5 e HepG2, com o intuito de avaliar a capacidade dessa substância de interferir na viabilidade celular ou potencial efeito citotóxico, por meio do método resazurina (Alamar Blue).

Conforme a representação gráfica exibida na (figura 5), observa-se que a linhagem celular de HepG2 (gráfico A), tratada com bergenina no tempo de 24 horas, exibiu percentual de 77,5 $\pm$ 4,36 de células viáveis na concentração de 200 $\mu$ M, em 48 horas 79,7 $\pm$ 4,87 e 72 horas: 68,2 $\pm$ 6,43. A linhagem celular de fibroblasto humano (gráfico B), em 24 horas, mostrou 61,5 $\pm$ 6,96; em 48 horas 79,8 $\pm$ 1,12 e 72 horas 71,1 $\pm$ 1,01% de viabilidade celular.

A padronização internacional dos testes de citotoxicidade in vitro, de acordo com a ISO 10993-5 de 2009, estabelece parâmetros quantitativos e qualitativos referente a análise da citotoxicidade, com métodos biológicos apropriados (DEVI; DUTTA, 2017). De acordo com esses parâmetros, quando a porcentagem de viabilidade celular se encontra acima de 80% a substância teste não é considerada citotóxica, quando esta porcentagem está entre 80 e 60% é classificada como baixa citotoxicidade.



**Figura 5** - Efeito da bergenina sobre a viabilidade de fibroblastos normais de pulmão humano (MRC5) e hepatocarcinoma (HepG2), nas concentrações de 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 e 200 $\mu$ M, nos tempos de 24,48 e 72horas. Onde, os gráficos (A) e (B) representam o tratamento das linhagens HepG2 e MRC-5 com bergenina. O cont. (-) contem somente meio de cultivo e DMSO, sem tratamento. Os dados estão expressos em porcentagem de viabilidade celular com média  $\pm$  desvio padrão (em relação ao controle de DMSO) e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. \*p < 0,05.

Diante desta análise e dos dados obtidos, é possível concluir que a bergenina não apresenta um perfil citotóxico até concentração de 200  $\mu\text{M}$  para as linhagens de MRC-5 e HepG2. Liang e colaboradores (2014), investigaram o efeito antiplasmódico da bergenina, os resultados obtidos indicaram que o composto inibiu efetivamente o crescimento de *Plasmodium falciparum* in vitro ( $\text{CI}_{50} = 14,1 \mu\text{g/ml}$ , com 100% de inibição a 50  $\mu\text{g/ml}$ ).

Ainda de acordo com estudo acima, não houve alterações morfológicas nos eritrócitos não infectados, mesmo após a exposição a 50  $\mu\text{g/ml}$  de bergenina por 72 horas em concentrações eficazes para inibir o crescimento do parasita. Além disso, não foi observado efeito citotóxico aparente em células HeLa e HepG2 de mamíferos em concentrações de (1-5 mg/ml) por 72 horas. A  $\text{CI}_{50}$  da bergenina foi 12,5 nas células HeLa e 19,1 mg/ml nas células HepG2, o qual pode ser definido como não tóxico ( $\text{CI}_{50} > 30 \mu\text{g/ml}$ ) (MALEBO et al., 2009). Assim, a bergenina mostrou boa tolerabilidade para sua aplicação.

Da mesma forma, o estudo de Xue e colaboradores (2011), mostra que a bergenina não foi citotóxica para células HepG2. No entanto, a pesquisa de Newell e colaboradores (2010), relata atividade citotóxica da bergenina em células HepG2 com ( $\text{CI}_{50} = 18 \mu\text{M}$ ). Neste mesmo trabalho, a bergenina mostrou uma tendência de acumular células na fase G1 e reduzir G2/M levando à apoptose.

Os resultados obtidos por Pavan Kumar e colaboradores (2019), mostram que a maioria dos derivados sintéticos da bergenina apresentaram maior citotoxicidade do que a bergenina em linhagens celulares HepG2, HeLa e adenocarcinoma de pulmão (A549), onde, alguns derivados chegaram a apresentar ( $\text{CI}_{50} = 1,86 \mu\text{M}$  e  $1,33 \mu\text{M}$ ), comparável ao medicamento padrão Doxorrubicina ( $\text{CI}_{50} = 1,98 \mu\text{M}$  e  $1,34 \mu\text{M}$ ), em células A549 e HeLa, respectivamente. Enquanto que a bergenina, para as linhagens A549, HepG2 e HeLa, apresentou ( $\text{CI}_{50}$   $34,29 \pm 1,59$ ;  $60,91 \pm 3,96$ ;  $22 \pm 2,11 \mu\text{M}$ ), respectivamente.

Embora alguns estudos mostrem que a bergenina pode apresentar potencial citotóxico, como foi o caso do estudo de Newell e colaboradores (2010), no qual relata efeito tóxico em linhagem tumoral, a pesquisa de Shi e colaboradores (2019), demonstrou que a bergenina exibe atividade citotóxica considerável com ( $\text{CI}_{50}$  de  $15 \mu\text{M}$ ) contra células de câncer HeLa em comparação com ( $\text{CI}_{50}$  de  $75 \mu\text{M}$ ) contra células cervicais (HCerEpiC) normais, ou seja, menor toxicidade para células normais e portanto, representa um interessante candidato para a utilização como agente quimioterápico, fato que a literatura retrata a bergenina com um perfil de atividade biológica anticâncer (CHEN et al., 2008; LIANG et al., 2017; PAVAN KUMAR et al., 2019).

Barai e colaboradores (2019), revelaram que em todas as concentrações testadas de 50 e 500 nM por 48 horas, a bergenina não manifestou nenhuma atividade citotóxica nas células de neuroblastoma de medula óssea (SH-SY5Y), onde, mostraram cerca de 80 a 97% de viabilidade celular, e as concentrações maiores também mostraram alta viabilidade celular, como (50  $\mu$ M) mostrou cerca de 71 a 79% de viabilidade, o qual evidencia-se que o composto não é tóxico para a linhagem testada, o que corrobora com os achados do presente estudo.

Ainda no mesmo estudo, a bergenina elevou a sobrevivência celular de  $81,75 \pm 5,91$ ; 32,4% em comparação com todos os outros grupos testados contra a toxicidade induzida por N-Metil-D-Aspartato (NMDA). Dessa forma, a bergenina não apresentou efeitos adversos na proliferação celular. Foi observada uma melhora na viabilidade celular em células osteoblásticas no estudo de Lee e colaboradores (2017).

### 5.3 Ensaio antioxidantes

#### 5.3.1 Atividade de eliminação de radicais DPPH e ABTS

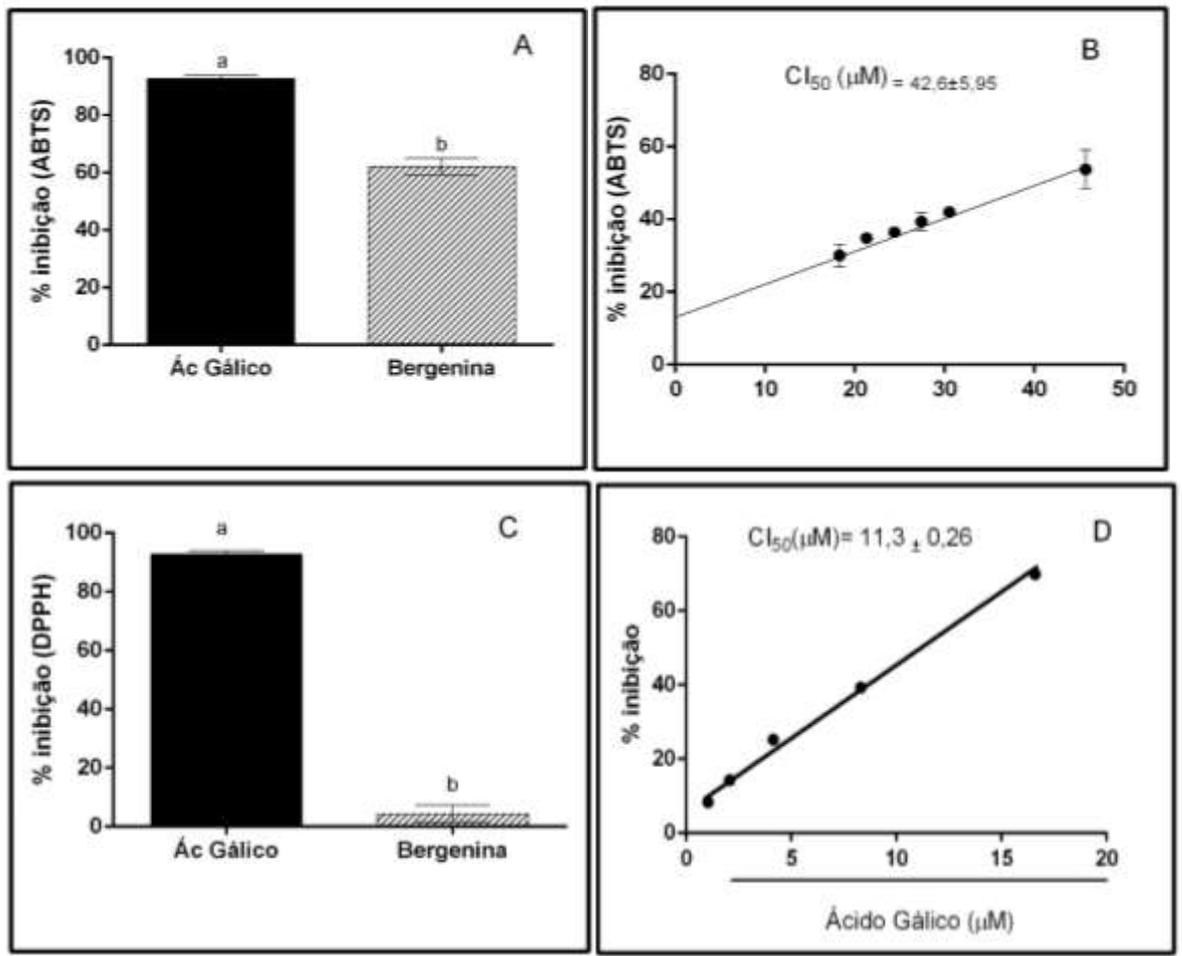
Os ensaios de DPPH e ABTS fornecem uma maneira fácil e rápida de avaliar o potencial antioxidante de um composto, um extrato ou outras fontes biológicas (KEDARE; SINGH, 2011). No presente trabalho, estes ensaios foram utilizados para investigar as propriedades antioxidantes da bergenina. Os resultados foram expressos em percentual de inibição e, posteriormente, foi realizada diluição seriada da bergenina para obtenção da concentração inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ).

No teste de DPPH, conforme mostra (figura 6), no gráfico (A), a bergenina quando comparada à substância padrão (ácido gálico), não apresentou atividade antioxidante significativa. No ensaio de ABTS, de acordo com o gráfico (B), a bergenina exibiu atividade antioxidante desse radical cerca de 60%, com  $CI_{50}$  de  $42,6 \pm 5,95 \mu$ M, que é a concentração de substrato que causa redução de 50% na cor de ABTS.

É relatado que quanto maior a atividade antioxidante, menor é o valor de  $CI_{50}$  (KEDARE; SINGH, 2011). Desse modo, a  $CI_{50}$  da bergenina, quando comparada ao ácido gálico, no gráfico (C), o qual exibiu  $CI_{50}$  de  $11,3 \pm 0,26 \mu$ M, mostra que o efeito antioxidante da bergenina não foi significativo.

A capacidade antioxidante é indicada pela diminuição da absorbância de DPPH (na cor roxa) para cor amarela. No ensaio de ABTS, a cor azul/verde é produzida pela oxidação de

ATBS em solução de persulfato de potássio e a reação com um antioxidante é monitorada pela diminuição da absorbância da reação (OLIVEIRA et al., 2017b).



**Figura 6** - Avaliação da atividade antioxidante através dos ensaios de DPPH e ABTS. O gráfico (A) representa a bergenia e Ácido gálico (padrão) no ensaio de ABTS. O gráfico (B) refere-se à  $CI_{50}$  da bergenia no ensaio de ABTS. O gráfico (C) representa a bergenia e ácido gálico (padrão) no ensaio de DPPH e o gráfico (D) mostra a  $CI_{50}$  do ácido gálico. A bergenia e o ácido gálico, encontram-se na concentração única de 100  $\mu$ M e os dados estão expressos em porcentagem de inibição com D.P.M.

Os radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) são amplamente reconhecidos como indutores da patogênese celular e tecidual ocasionando várias doenças, incluindo o câncer, distúrbios inflamatórios e processos de envelhecimento (SRINIVASAN et al., 2007). Os radicais hidroxila são considerados os agentes oxidantes mais poderosos. A produção excessiva de radicais livres oxidantes tem implicado em estresse oxidativo (SINGH; BARIK; PRIYADARSINI, 2009).

No estudo conduzido por Singh e colaboradores (2009), sobre o efeito da bergenina na peroxidação lipídica induzida pela radiação  $\gamma$ , carbonilação de proteínas, danos ao DNA e DPPH, aponta que a bergenina sozinha ( $CI_{50}$  377,5 $\pm$ 18,8  $\mu$ g/ml) não é responsável pela capacidade de eliminação de radicais livres e que os extratos de *Caesalpinia digyna* testados, enriquecidos com a bergenina, foram mais eficazes do que a bergenina isolada. Os extratos apresentaram ( $CI_{50}$  2,66 $\pm$ 0,13; 4,97 $\pm$ 0,24  $\mu$ g/ml), além disso, a bergenina é apontada como um bom eliminador de radicais hidroxila, porém, não é tão eficaz contra radicais superóxido e DPPH.

Ainda de acordo com o autor acima mencionado, a reação da bergenina com radicais hidroxila é inespecífica, enquanto a reação com outros radicais é mais específico e considerado aspecto importante na investigação de atividade antioxidante de novos compostos e, os extratos testados apresentaram melhor efeito antioxidante específico contra radicais livres do que a bergenina. Radicais hidroxila, ao reagir com os ácidos graxos poli-insaturados das biomembranas, produzem lipoperoxidação lipídica que ocasionam danos na estrutura celular (AMBIKA; SARAVANAN, 2016).

De maneira semelhante, também é relatado por Ivanov e colaboradores (2011), que a bergenina não é capaz de eliminar os radicais DPPH. A bergenina parece ter um potencial antioxidante mais forte para ABTS do que para DPPH, sugerindo que seu mecanismo de atividade antioxidante pode ser principalmente a transferência de elétrons (OLIVEIRA et al., 2017b). Pois é relatado que flavonoides e compostos polifenólicos exibem altas propriedades antioxidantes que inibem reações mediadas por radicais livres doando um átomo de hidrogênio ou elétron para os radicais (HAVSTEEN, 2002; SOONG; BARLOW, 2004).

Achados semelhantes também foram apresentados por Srinivasan e colaboradores (2007), ao estudar os extratos de *Caesalpinia digyna* e a bergenina isolada, observaram melhor potencial antioxidante da bergenina contra ABTS do que DPPH, com ( $CI_{50}$  75,06 $\pm$ 0,97  $\mu$ g/mL), ( $CI_{50}$  165,35 $\pm$ 1,60  $\mu$ g/mL), respectivamente, ao comparar com os extratos que obtiveram ( $CI_{50}$  0,92 $\pm$ 0,05  $\mu$ g/mL) para ABTS e (4,86 $\pm$ 0,90  $\mu$ g/mL) de inibição de radicais DPPH. A bergenina apresentou efeito antioxidante moderado.

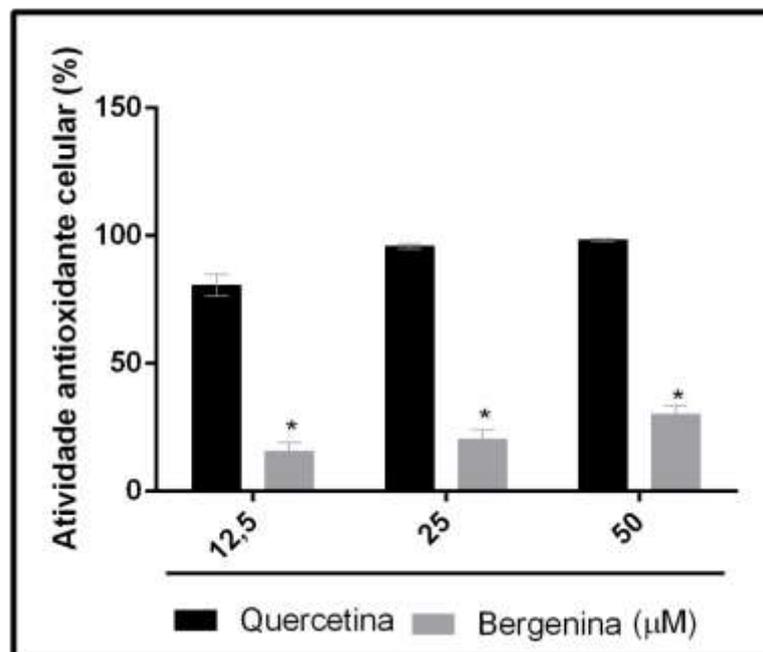
Da mesma forma, relatórios também foram apresentados sobre o potencial antioxidante da bergenina e sua predileção por radicais ABTS. Aggarwal e colaboradores (2016), avaliaram a atividade antioxidante da bergenina comparando-a com o  $\alpha$ -tocoferol e o ácido ascórbico, onde, a bergenina mostrou maior efeito antioxidante contra radicais ABTS do que ambos, onde, a bergenina com ( $CI_{50}$  28,99  $\mu$ g/mL) contra ( $CI_{50}$  57,46  $\mu$ g/mL) de  $\alpha$ -tocoferol e ( $CI_{50}$  64,85

$\mu\text{g/mL}$ ) ácido ascórbico. Por outro lado, a atividade de eliminação de radicais DPPH de  $\alpha$ -tocoferol é melhor do que a bergenina e ácido ascórbico com ( $\text{CI}_{50}$  37,95  $\mu\text{g/mL}$ ), ( $\text{CI}_{50}$  43,57  $\mu\text{g/mL}$ ), ( $\text{CI}_{50}$  96,65  $\mu\text{g/mL}$ ), respectivamente. Ambos foram testados em concentrações de 20, 40, 60 e 80  $\mu\text{g/mL}$ .

Contudo, o fato de substâncias apresentarem atividade antioxidante no ensaio de ABTS e não em DPPH, como é o caso da bergenina, pode ser atribuído à hidrofiliidade e lipofiliidade com as quais esses radicais possuem afinidade, onde, o ABTS tem maior preferência por antioxidantes mais hidrofílicos e o DPPH por lipofílicos (APAK et al., 2007). A presente molécula testada apresenta característica mais hidrofílica (LIANG et al., 2017).

### 5.3.2 Antioxidante celular

O potencial efeito antioxidante da bergenina foi avaliado através do ensaio de avaliação da atividade antioxidante celular, que é baseada na detecção da inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular, utilizando o composto fluorescente: 2'7'-dicloro-fluoresceína-diacetato (DCFH-DA) em linhagens celulares de fibroblastos, demonstrado na (figura 7).



**Figura 7** - Avaliação da atividade antioxidante celular em linhagem de fibroblasto tratada com bergénina, na concentração de 50, 25 e 12,5  $\mu\text{M}$ . A quercetina foi utilizada como padrão de atividade antioxidante testada nas mesmas concentrações que a bergénina. Os dados estão expressos em porcentagem de inibição de EROs com

média  $\pm$  desvio padrão e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. \* $p < 0,05$ , foi considerado estatisticamente significativo ao comparar a bergenina com a quercetina (padrão).

O estresse oxidativo está intimamente ligado ao aparecimento de doenças relacionadas ao envelhecimento. Diversos compostos antioxidantes são considerados capazes de atenuar ou prevenir os impactos causados nos indivíduos (CUI; KONG; ZHANG, 2012). Além disso, a abundância de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ocasionar lesões permanentes nas macromoléculas e interferir nos processos de sinalização redox-dependentes (KHAN, 2014).

Os resultados destas análises estão expressos em % de inibição. Nos ensaios de DPPH e ABTS, a bergenina testada na concentração de 50  $\mu$ M, apresentou inibição superior a 50% apenas no ensaio de ABTS. No ensaio antioxidante celular, quando testada na concentração supracitada, a bergenina demonstrou uma inibição de 30% ( $30,02 \pm 3,36 \mu$ M) de EROs, podemos observar no gráfico uma inibição dose dependente, pois houve um decaimento na inibição de acordo com a diminuição da concentração.

A partir desta análise, entende-se que a bergenina, quando comparada com a droga padrão (quercetina), que exibe inibição de 98% ( $98,4 \pm 0,50$ ) em 50  $\mu$ M, possui menor atividade antioxidante. A estrutura química, o grau e posição de hidroxilação, presença de ligações duplas ou conjugação, tipo e posição de substituintes e glicosilação, são elementos que determinam a ação antioxidante de substâncias (KUMAR; PANDEY, 2013).

Se os compostos apresentarem grupos hidroxilas na posição 3' e 4' do anel B ou na posição 7 e 8 do anel A, sua atividade antioxidante é elevada (AMIC et al., 2006). A bergenina, por sua vez, não apresenta hidroxilas na posição 3' e 4' nos anéis A e B, comparada com a quercetina (SINGH; BARIK; PRIYADARSINI, 2009).

Um estudo sobre atividade antioxidante da bergenina foi realizado por Roselli e colaboradores (2012), através dos ensaios de DPPH e ABTS, eles observaram fraca atividade antioxidante 40%, onde, os autores descreveram a bergenina como um antioxidante fraco. É consistente com estudos anteriores, que apesar de ser um polifenol, a bergenina pode não atuar como um potente antioxidante (SINGH; BARIK; PRIYADARSINI, 2009).

Conforme o autor supracitado, assim como outros polifenóis naturais, a bergenina pode eliminar os radicais livres oxidantes de forma muito eficaz, mas os radicais resultantes são reativos e atuam como uma fonte do radical peroxil. Assim, a bergenina pode não atuar como um antioxidante na proteção das biomoléculas do dano oxidativo induzido pelos radicais livres.

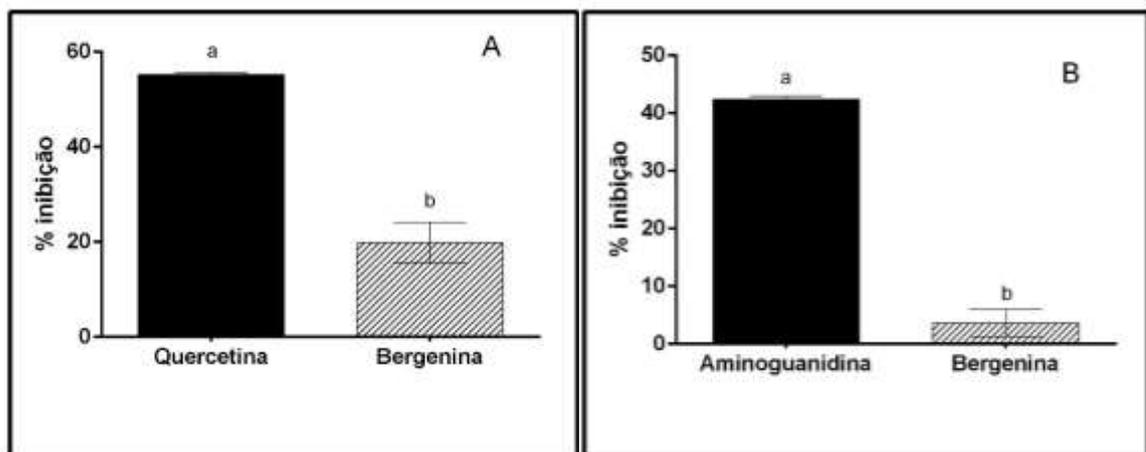
Todavia, Aggarwal e colaboradores (2016), avaliaram o potencial efeito antioxidante da bergenina sobre espécies reativas de oxigênio, onde, foi observado uma melhora quando realizado tratamento com bergenina.

#### 5.4 Atividade antiglicante por via oxidativa e via não oxidativa

##### 5.4.1 Efeito da bergenina sobre a atividade antiglicante por via oxidativa e não oxidativa.

A bergenina foi submetida a análise antiglicante por via oxidativa e não oxidativa e os resultados estão expressos na (figura 8). A aminoguanidina foi utilizada como padrão para o teste antiglicante por via não oxidativa e a quercetina como droga padrão para a via oxidativa. Ambas as drogas padrão, bem como a bergenina foram testadas em concentração única 100  $\mu\text{M}$ .

Os resultados destas análises estão expressos em % de inibição, conforme demonstrado na (figura 8). De acordo com a (figura 8), no gráfico A, a bergenina apresenta percentual de inibição na via oxidativa de  $(19,88 \pm 4,22)$  e  $(8,32 \pm 1,85)$  pela via não oxidativa, ilustrado no gráfico B. As drogas utilizadas como padrão de inibição tanto para a via oxidativa (quercetina) como para não oxidativa (aminoguanidina), apresentaram 55%  $(55,46 \pm 2,35)$ , 42%  $(42,68 \pm 3,78)$ , respectivamente.



**Figura 8** - Atividade inibitória da bergenina. Gráfico (A) refere-se à atividade inibitória da bergenina e quercetina (padrão) sobre a via oxidativa. O gráfico (B) representa o efeito inibitório da bergenina e aminoguanidina (padrão) sobre a via não oxidativa. Os valores representam a porcentagem de inibição. A bergenina, bem como as drogas padrão, foram testadas na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . As letras diferentes indicam uma diferença estatística significativa pelo teste One-way ANOVA seguido do teste Dunnet, \* $p < 0,05$ .

A glicação é um processo irreversível muito comum em pacientes diabéticos, que leva ao desenvolvimento de complicações porque afeta diretamente a atividade das proteínas. O acúmulo dos produtos da reação da glicação de proteínas em organismos vivos leva a modificações estruturais e funcionais das proteínas do tecido (KHALIFAH; BAYNES; HUDSON, 1999). Deste modo, os antiglicantes podem contribuir muito no tratamento do diabetes.

A partir das análises dos gráficos, entende-se que a bergenina não apresentou atividade antiglicante pela via não oxidativa, como mostra o (gráfico B) e que o efeito contra o glioxal pode ser por suas propriedades antioxidantes, demonstrado no (gráfico A), que ilustra que a bergenina inibiu quase 20% ( $19,88 \pm 4,22$ ) na via oxidativa e a quercetina (padrão) 55% ( $55,46 \pm 2,35$ ).

No estudo apresentado por Vijaya Kumar e colaboradores (2011), é relatado que a bergenina possui atividade antiglicante moderada ( $CI_{50} = 186,73 \mu M$ ), contudo, foram sintetizados uma série de derivados da bergenina testados em concentração de  $200 \mu M$ , os quais exibiram melhor atividade antiglicante do que a bergenina, pela via não oxidativa ( $CI_{50} = 60,75$  e  $12,28 \mu M$ ).

A glicação de proteína é um processo que é iniciado entre as carbonilas dos açúcares e os grupos amino livres das proteínas (Reação de Maillard), posteriormente, seguida pela isomerização (Rearranjo de Amadori), o qual acaba gerando um derivado de aminocetose relativamente estável. Esses derivados, por sua vez, sofrem degradação adicional dando origem a dicarbonilas altamente reativos, como glucosona, 3-desoxiglucosona e glioxal (KHALIFAH; BAYNES; HUDSON, 1999).

De forma semelhante ao presente estudo, Lee e colaboradores (2017), observaram que a bergenina preveniu a glicação induzida por metilglioxal. Forneceu proteção contra o dano carbonílico reativo em células osteoblásticas. Os resultados indicam que os mecanismos antioxidantes, ou seja, via oxidativa, contribuíram para o seu efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido por metilglioxal.

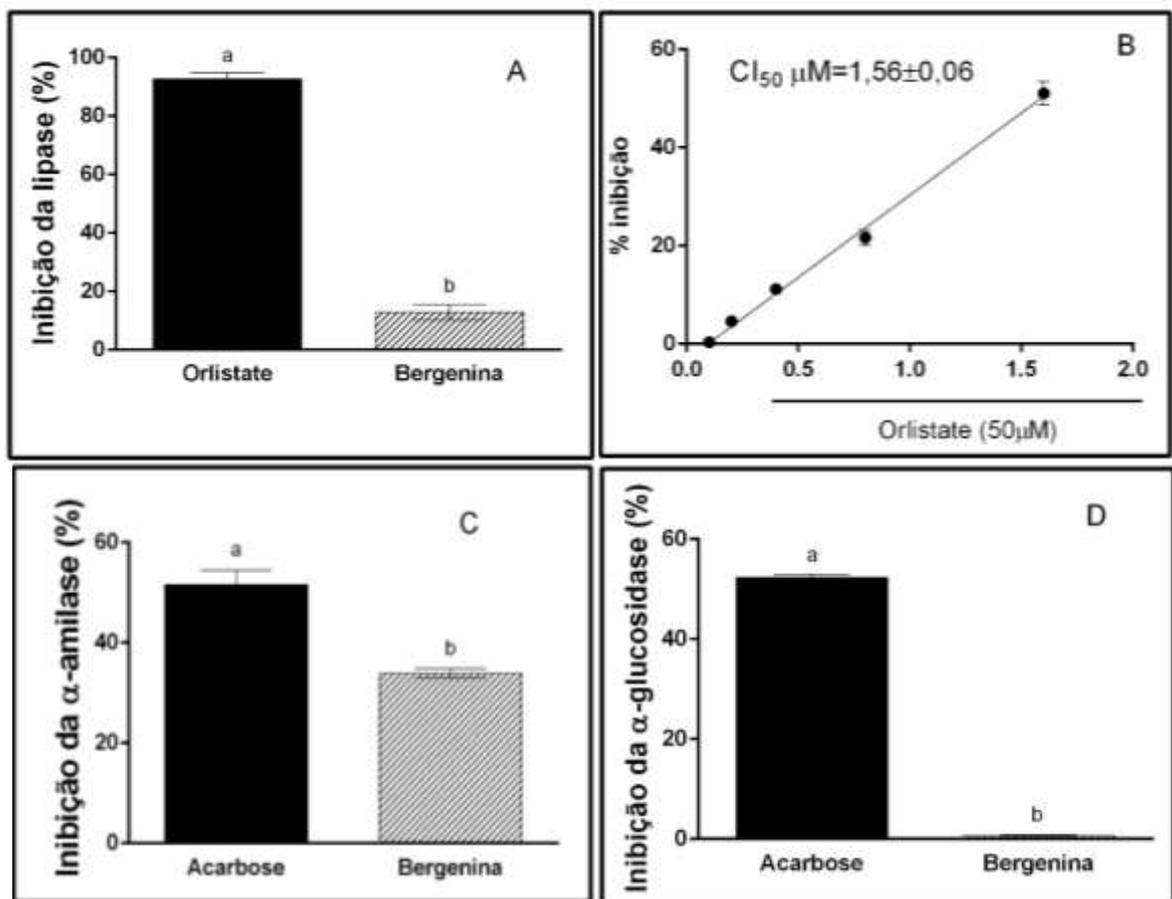
A enzima glioxalase-1 diminui os níveis de AGEs ocasionados por hiperglicemia e estresse oxidativo (BROUWERS et al., 2011). Desse modo, a remoção de metilglioxal mediada pela glioxalase-1 tem um papel importante na patogênese das complicações diabéticas, e a glioxalase-1 pode ser um alvo preventivo e terapêutico.

## 5.5 Inibições enzimáticas

### 5.5.1 Inibição de enzimas digestivas lipase, $\alpha$ -amilase e $\alpha$ -glucosidase

A bergenina foi submetida à análise de inibição das enzimas lipase,  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase, as quais estão apresentadas na (figura 9). Os gráficos A e B, mostram a substância padrão utilizada para o teste de inibição da lipase, o Orlistate, e a concentração usada tanto para o padrão como para a bergenina foi 50  $\mu$ M. O (gráfico C), mostra a substância padrão utilizada para o teste de inibição da  $\alpha$ -amilase, (acarbose 1000  $\mu$ M) e a bergenina na concentração de 50  $\mu$ M.

No (gráfico D), exibe a atividade inibitória da bergenina sobre a enzima  $\alpha$ -glucosidase, onde, a substância padrão usada foi a acarbose na concentração de 100  $\mu$ M e bergenina 50  $\mu$ M.



**Figura 9** - Avaliação do efeito inibitório da bergenina sobre a lipase na concentração 50  $\mu$ M,  $\alpha$ -amilase 1000  $\mu$ M e  $\alpha$ -glucosidase 100  $\mu$ M. O gráfico (A) refere-se à bergenina comparada aos efeitos droga padrão Orlistate. O gráfico (B) representa a  $CI_{50}$  do Orlistate. O gráfico (C) refere-se à bergenina comparada à droga padrão acarbose. O gráfico (D) representa o efeito da bergenina comparado à acarbose (droga padrão). Os dados estão expressos em porcentagem de inibição de lipase,  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase com média  $\pm$  desvio padrão (em relação aos controles, as drogas padrão) e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. \* $p < 0,05$ .

Notou-se que no teste de inibição da lipase (gráfico A), a bergenina não apresentou atividade inibitória significativa sobre esta enzima ( $5,48 \pm 1,41$ ). Foi relatado por Ivanov e colaboradores (2011), que extratos brutos de rizomas *Bergenia crassifolia*, podem suprimir com eficiência a atividade da lipase pancreática humana ( $IC_{50} = 3,4 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) in vitro.

Oliveira e colaboradores (2017a), relataram o efeito inibitório de extratos de *Endopleura uchi* da lipase pancreática. O autor, ainda propõe que o efeito é devido ao teor fenólico presente no extrato. Diversos estudos apontam a relação entre a inibição in vitro da lipase pancreática e os níveis derivados fenólicos e flavonoides. Moreno e colaboradores (2006), mostraram que o conteúdo de polifenol presente nos extratos etanólicos de *Mangifera indica L.*, teve forte relação com a inibição da atividade da lipase pancreática em 75%.

Zhang e colaboradores (2008), observaram que o extrato de *Taraxacum officinale* com alto teor de flavonoide inibiu a lipase pancreática em 86,3%. Não somente a atividade inibitória da lipase mas também de  $\alpha$ -amilase são reportadas na literatura que compostos fenólicos e flavonoides são capazes de inibi-las (MENDOZA MEZA; MEDINA VALDÉS, 2015).

Ao observar o (gráfico C), entende-se que a bergenina mostrou efeito inibitório de  $\alpha$ -amilase razoável ao comparar-se com a droga padrão. A atividade inibitória da acarbose (padrão) está em 55% ( $55,03 \pm 1,06$ ) contra 33,9% ( $33,89 \pm 0,96$ ) da bergenina. Este estudo mostra pela primeira vez que a bergenina tem potencial de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase.

A inibição da  $\alpha$ -amilase diminui a degradação do amido e, assim, a quebra de carboidratos complexos em açúcares simples absorvíveis (TADERA et al., 2006). Naveen e colaboradores (2014), mostraram o efeito antihiperlicêmico das cascas de *Eucalyptus tereticornis*, que pode ser atribuído devido a presença de diversos fitoquímicos importantes, como a bergenina, que está presente em maior quantidade no extrato.

A  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase são enzimas hidrolisante de carboidratos que quebra a ligação glicosídica e libera a glicose, o que aumenta a concentração de glicose no corpo e tem impacto negativo em pacientes diabéticos. Em um estudo sobre extrato bruto de *Bergenia pacumbis* do Nepal, cujo principal constituinte bioativo é a bergenina, foi observado inibições das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase comparáveis aos da droga padrão (acarbose).

No estudo conduzido por Silva e Teixeira (2015), foi testado pela primeira vez o efeito inibitório da enzima  $\alpha$ -glucosidase, tanto pelo extrato hidroetanólico do uxi, como a infusão da casca, com  $IC_{50} = 2,2 \mu\text{g}/\text{mL}$  e  $IC_{50} = 2,4 \mu\text{g}/\text{mL}$  para extratos hidroetanólico e de infusão, respectivamente. Por outro lado, esses resultados obtidos pelos autores são bastante inferiores ao compará-los com o controle positivo acarbose ( $IC_{50} = 284 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). O constituinte principal

do *Endopleura uchi* é bergenina. Contudo, os extratos revelaram grande potencial para inibir essa enzima.

Essas descobertas foram consistentes com relatos anteriores. Achado semelhante foi o de Kashima e colaboradores (2013), que em um estudo a partir de derivados da bergenina, evidenciou-se que a bergenina ( $IC_{50}$   $22,7 \pm 0,6\%$  a  $300 \mu\text{M}$ ) mostrou uma menor atividade inibitória da enzima  $\alpha$ -glucosidase do que seus derivados, onde, a inibição de 50% ( $IC_{50}$ ) da atividade enzimática foram calculadas como ( $24,6 \mu\text{M}$ ) que eram consideravelmente inferiores das concentrações dos medicamentos de referência, acarbose ( $907,5 \mu\text{M}$ ) e 1-desoxinojirimicina ( $278,0 \mu\text{M}$ ). Da mesma forma, San e colaboradores (2020), não observaram efeito significativo da bergenina contra essa enzima.

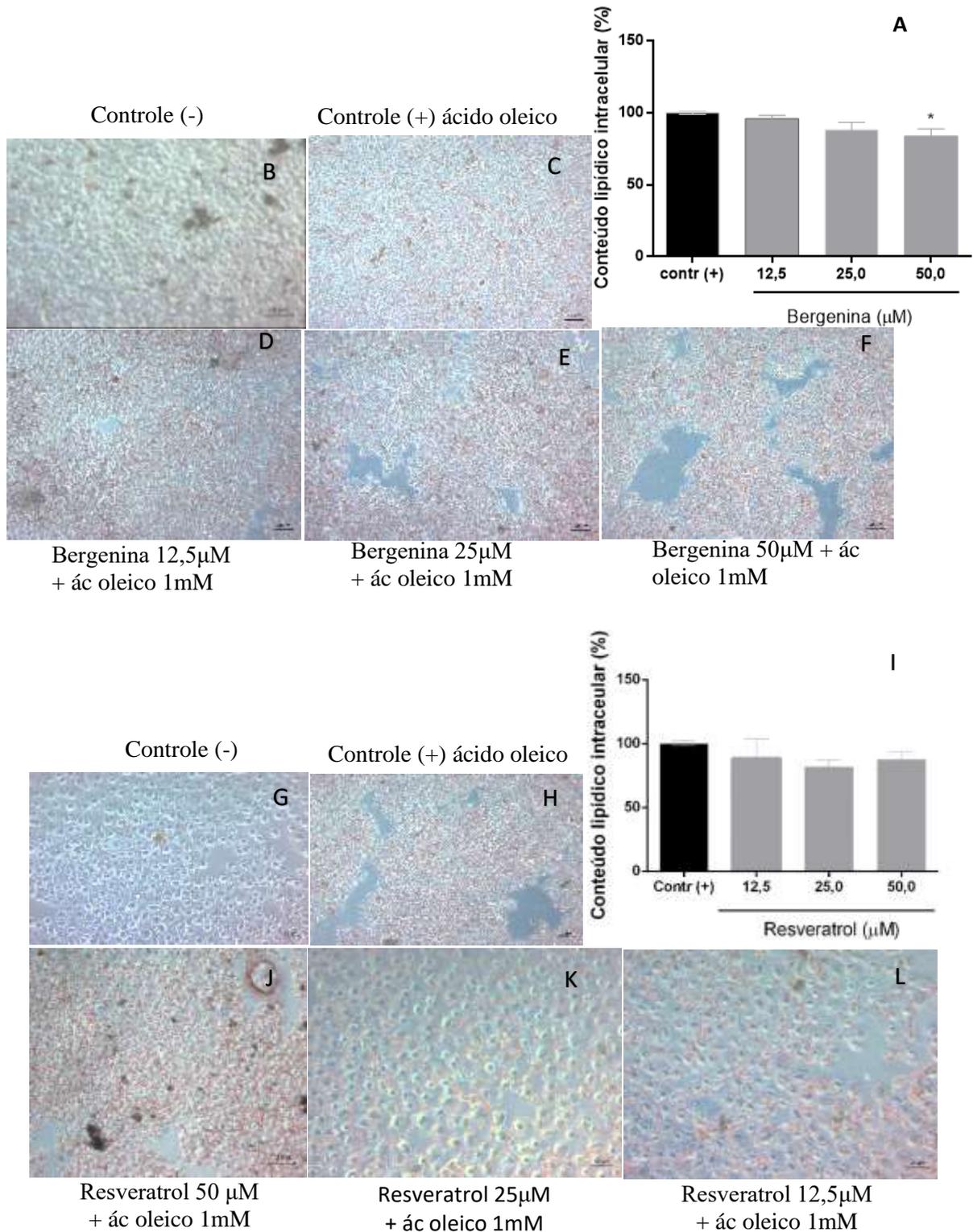
Enzimas como  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase, sacarase e lactase desempenham um papel crucial na digestão completa dos polissacarídeos em unidades menores, como os monossacarídeos. Os monossacarídeos se difundem para as células epiteliais intestinais, onde são levados pela difusão passiva, difusão facilitada através de transportadores denominados Glut e por co-transporte com outros íons, principalmente íons sódio (MUECKLER, 1994).

Os componentes que interferem em um dos processos importantes acima podem atuar como agentes antihiperlipidêmico, evitando a entrada de glicose na corrente sanguínea. De acordo com a literatura, ainda não existem pesquisas relatando o efeito inibitório da bergenina isolada contra a enzima  $\alpha$ -amilase. Assim, este estudo pode fornecer uma base para investigações futuras sobre o potencial papel terapêutico da bergenina no tratamento de doenças metabólicas.

## 5.6 Ensaio da Captação de lipídeos

A fim de investigar o efeito hipolipidêmico da bergenina, foi realizado teste de captação de lipídeos em células HepG2, como mostra a (figura 10). A bergenina, bem como a droga padrão de inibição resveratrol, foram testadas nas concentrações de 12,5; 25 e  $50 \mu\text{M}$ . O ácido oleico foi testado a  $1\text{mM}$ . Os resultados estão demonstrados na (figura 10).

Ao observar o (gráfico A) da figura 10, entende-se que não houve inibição da captação lipídica significativa. O mesmo pode ser observado no (gráfico I) da figura 10, quando a substância padrão (resveratrol), não apresentou efeito esperado.



**Figura 10** – Efeitos da berberina sobre a captação de lipídeos em células HepG2. Tanto a berberina quanto a substância padrão (resveratrol), foram testadas nas concentrações de 12,5, 25 e 50 µM, no tempo de 24 horas. O ácido oleico foi testado na concentração de 1mM. O gráfico (A) refere-se ao tratamento com berberina e ácido oleico. A imagem (B) refere-se ao controle (-) de captação de lipídeos, com meio de cultivo DMEM e DMSO. A imagem (C) representa controle (+) de captação lipídica, onde, contém ácido oleico. As imagens (D), (E) e (F) representam o tratamento com ácido oleico e com berberina. A imagem (G) refere-se ao controle (-) de captação. A imagem (H) representa controle (+) de captação lipídica, que contém ácido oleico. O gráfico (I) refere-se ao tratamento com resveratrol. As imagens (J), (K) e (L) representam o tratamento com ácido oleico e com resveratrol.

Os dados estão expressos em porcentagem de captação de lipídeos com média  $\pm$  desvio padrão (em relação ao controle (+) ácido oleico e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. \* $p < 0,05$ .

O acúmulo excessivo de gordura leva à hiperlipidemia e outros distúrbios metabólicos importantes relacionados à obesidade. A hiperlipidemia é caracterizada pelo aumento dos níveis de lipoproteína ou colesterol no sangue, anormalidades nas lipoproteínas plasmáticas circulantes são responsáveis pelo aumento de depósitos de triglicerídeos no fígado (AMBIKA; SARAVANAN, 2016a).

Em condições normais, a insulina ativa a enzima lipase que hidrolisa triglicerídeos. Todavia, a deficiência de insulina resulta na falha em ativar enzimas, resultando em hipertrigliceridemia. O aumento do acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, principalmente na forma de triglicerídeos, colesterol total (MEDRIKOVA et al., 2012).

Na (figura 10), o gráfico (I) nos mostra que a substância padrão (resveratrol), utilizada neste estudo não apresentou atividade de inibição de captação de lipídeos em nenhuma das concentrações testadas. Não há diferença notável entre a maior e a menor concentração.

Estudos apontam que a bergenia pode reduzir de forma significativa os níveis de lipídeos. Porém, há relatos que esse efeito pode acontecer de forma mais baixa em relação aos níveis de colesterol total e triglicerídeos. No presente estudo, observa-se que a bergenia apresentou baixa atividade de inibição de captação de lipídeos ( $26,71 \pm 4,6$ ) 50  $\mu$ M. Embora a bergenia apresente característica hipolipemiante, pode ser que esse efeito não ocorra por meio de inibição de captação hepática de colesterol, mas por outro mecanismo diferente do que foi avaliado no neste estudo.

Foi descrito por Ambika e colaboradores (2016), que a bergenia reduziu os níveis de lipídeos do fígado. Além disso, diminuiu o estresse oxidativo por meio da redução da peroxidação lipídica através de suas características antihiperlipidêmica, antihiperlipidêmica e antioxidantes. Embora o potencial da bergenia de reduzir produtos finais da peroxidação lipídica seja conhecido por sua capacidade de eliminação de radicais livres, outras averiguações sobre os sinais moleculares subjacentes ao mecanismo de ação da bergenia ainda precisam ser exploradas.

Estudos anteriores relataram achados semelhantes, como Shikov e colaboradores (2012), utilizando extratos *Bergenia crassifolia*, cuja principal substância presente é a bergenia, observaram uma redução razoável de 45% no nível de triglicerídeos. Por outro lado, no trabalho de Kumar e colaboradores (2012), é relatado que a bergenia diminuiu o perfil lipídico de ratos diabéticos, exceto o colesterol total e triglicerídeos.

Da mesma forma, foi revelado por Jahromi e Chansouria (1992), que administração de bergenina por 14 dias consecutivos, foi possível observar uma redução significativa dos níveis de lipídeos totais. Todavia, o mesmo não aconteceu com os níveis de colesterol total e triglicerídeos no grupo tratado com bergenina em comparação com o grupo controle hiperlipidêmico.

A redução de lipídeos e colesterol envolve numerosos grupos estruturais, desde simples ácidos graxos acetilênicos, até alfapironas, furanocromonas, flavonoides e também esteroides pertencem a esse grupo de agentes bioativos. Da mesma maneira como as características estruturais, os mecanismos pelos quais essas moléculas desencadeiam sua atividade também são abundantes (JAHROMI; CHANSOURIA; RAY, 1992).

Embora a estrutura da bergenina não se encaixe estritamente em um padrão de agentes hipolipidêmicos e antihipercolesterolêmicos, ela possui muitas características desses grupos. O papel dos diferentes grupos funcionais presentes na bergenina podem ser melhor compreendidos, uma vez que seu mecanismo de ação seja conhecido.

A patogênese da doença metabólica e seus componentes associados, ainda não são totalmente compreendidos, todavia, a obesidade central e a resistência à insulina são reconhecidas como fatores causais. É uma condição clínica que tem grande impacto na vida do indivíduo e da sociedade (SRIKANTHAN et al., 2016; ESLAM et al., 2020).

Deste modo, é desafiadora a busca por novas modalidades terapêuticas, considerando-se a complexidade das doenças metabólicas. Este trabalho, por sua vez, confirmou o que já existe na literatura sobre a bergenina e vislumbrou nova possibilidade de estudos futuros com a bergenina, agora, com a expectativa de potencial efeito inibidor da enzima  $\alpha$ -amilase.

A presente pesquisa fornece uma base para a possibilidade de se potencializar este efeito por meio de derivados da bergenina, e uma investigação mais aprofundada é necessária para fornecer evidências para as implicações da bergenina como candidata a um novo composto no manejo de doenças metabólicas.

## 6 CONCLUSÕES

- No presente trabalho, foi possível observar que a bergenina não foi tóxica para as linhagens MRC-5 e HepG2;
- A bergenina mostrou-se ser mais ativa contra radicais ABTS do que DPPH;
- No ensaio de antioxidante celular a bergenina não apresentou efeito significativo;
- A bergenina apresentou um efeito moderado de atividade inibitória sobre a via oxidativa de oxidação de proteínas;
- O presente estudo revela pela primeira vez que a bergenina tem potencial de inibição da  $\alpha$ -amilase;
- No entanto, subsequentemente, experimentos in vivo de validação em laboratório são necessários para confirmar seu papel fundamental, para que possa ser classificada como um novo grupo de inibidores da  $\alpha$ -amilase e compor os tratamentos contra doenças metabólicas;
- Não houve atividade notável observada no caso do ensaio de inibição sobre a enzima  $\alpha$ -glucosidase e lipase;
- A bergenina não mostrou efeito significativo de inibição de captação de lipídeos.

## 6 REFERÊNCIAS

- ACOSTA, J. R. et al. Increased fat cell size: a major phenotype of subcutaneous white adipose tissue in non-obese individuals with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 59, n. 3, p. 560–570, 2016.
- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213–1221, 2016.
- AGGARWAL, D. et al. Berberin attenuates renal injury by reversing mitochondrial dysfunction in ethylene glycol induced hyperoxaluric rat model. **European Journal of Pharmacology**, v. 791, p. 611–621, 2016.
- AKBAR, N. et al. Extracellular vesicles in metabolic disease. **Diabetologia**, v. 62, n. 12, p. 2179–2187, 2019.
- ALAM, M. M.; MEERZA, D.; NASEEM, I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. **Life Sciences**, v. 109, n. 1, p. 8–14, 2014.
- ALBERDI, G. et al. Hepatic lipid metabolic pathways modified by resveratrol in rats fed an obesogenic diet. **Nutrition**, v. 29, n. 3, p. 562–567, 2013.
- ALI, E. et al. Determination of berberin in different parts of berberis ciliata using a validated rp-hplc method. **Natural Product Sciences**, v. 27, n. 1, p. 54–59, 2021.
- ALONSO, C. et al. Biomarkers and subtypes of deranged lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 24, p. 3009–3020, 2019.
- AMBIKA, S.; SARAVANAN, R. Effect of berberin on hepatic glucose metabolism and insulin signaling in C57BL/6J mice with high fat-diet induced type 2 diabetes. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 14, n. 3, p. 221–227, 2016a.
- AMBIKA, S.; SARAVANAN, R. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effect of berberin on C57BL/6J mice with high fat-diet induced type 2 diabetes. **Journal of Pharmacy Research**, v. 10, n. 3, p. 126–132, 2016b.
- AMIC, D. et al. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 67, n. 18, p. 2058–2070, 2006.
- ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 27–32, 2008.
- ANDRES, C.; ARANGO, M. Hypertension and Herbal Plants. **Int Res J Pharm**, v. 2, n. 8, p. 26–30, 2011.
- ANTU, K. A. et al. Symplocos cochinchinensis enhances insulin sensitivity via the down regulation of lipogenesis and insulin resistance in high energy diet rat model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 500–509, 2016.
- APAK, R. et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1496–1547, 2007.

ARGO, C. K.; CALDWELL, S. H. Epidemiology and Natural History of Non-Alcoholic Steatohepatitis. **Clinics in Liver Disease**, v. 13, n. 4, p. 511–531, 2009.

ARNER, E. et al. Adipocyte turnover: Relevance to human adipose tissue morphology. **Diabetes**, v. 59, n. 1, p. 105–109, 2010.

ASRIH, M.; JORNAYVAZ, F. R. Diets and nonalcoholic fatty liver disease: The good and the bad. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 2, p. 186–190, 2014.

BAJRACHARYA, G. B. Diversity, pharmacology and synthesis of bergenin and its derivatives: Potential materials for therapeutic usages. **Fitoterapia**, v. 101, n. 10, p. 133–152, 2015.

BAO, L. et al. Hypolipidemic effects of flavonoids extracted from *Lomatogonium rotatum*. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 11, n. 4, p. 1417–1424, 2016.

BARAI, P. et al. Neuroprotective effects of bergenin in Alzheimer's disease: Investigation through molecular docking, in vitro and in vivo studies. **Behavioural Brain Research**, v. 356, n. 14, p. 18–40, 2019.

BERTHOUD, H. R.; NEUHUBER, W. L. Vagal mechanisms as neuromodulatory targets for the treatment of metabolic disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1454, n. 1, p. 42–55, 2019.

BOUCHI, R. et al. High visceral fat with low subcutaneous fat accumulation as a determinant of atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. **Cardiovascular Diabetology**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2015.

BROUWERS, O. et al. Overexpression of glyoxalase-I reduces hyperglycemia-induced levels of advanced glycation end products and oxidative stress in diabetic rats. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 1374–1380, 2011.

CHEN, S. et al. Therapeutic Effects of Quercetin on Inflammation, Obesity, and Type 2 Diabetes. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.

CHEN, Y. et al. Characterization of the Chemical Space of Known and Readily Obtainable Natural Products. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 58, n. 8, p. 1518–1532, 2018.

CHEN, Z. et al. Studies on the chemical constituents and anticancer activity of *Saxifraga stolonifera* (L) Meeb. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1337–1344, 2008.

COSTELLO, K. R.; SCHONES, D. E. Chromatin modifications in metabolic disease: Potential mediators of long-term disease risk. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 10, n. 4, p. 1–12, 2018.

CUI, H.; KONG, Y.; ZHANG, H. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. **Journal of Signal Transduction**, v. 2012, p. 1–13, 2012.

CURTIS, J. M. et al. Downregulation of adipose glutathione S-transferase A4 leads to increased protein carbonylation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. **Diabetes**, v. 59, n. 5, p. 1132–1142, 2010.

DAI, W. et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. **Medicine**, v. 96, n. 39, 2017.

DENG, L. et al. Natural products and their derivatives: Promising modulators of tumor immunotherapy. **Leukocyte Biology**, p. 493–508, 2020.

- DEPNER, C. M.; STOTHARD, E. R.; WRIGHT, K. P. Metabolic consequences of sleep and circadian disorders. **Current Diabetes Reports**, v. 14, n. 7, p. 1–15, 2014.
- DEVI, N.; DUTTA, J. Tests for in vitro cytotoxicity. **International Standard**, v. 104, p. 1897–1904, 2017.
- DHARMENDER, R. et al. Simultaneous Quantification of Bergenin, (+)-Catechin, Gallicin and Gallic acid; and Quantification of  $\beta$ -Sitosterol using HPTLC from *Bergenia ciliata* (Haw.) Sternb. *Forma ligulata* Yeo (Pasanbheda). **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 01, n. 01, 2010.
- DHINDSA, D. S.; SANDESARA, P. B.; SHAPIRO, M. D. The Intersection of Diabetes and Cardiovascular Disease—A Focus on New Therapies. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 160, p. 1–9, 2018.
- DIRAISON F, M. P.; BEYLOT, M. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during nonalcoholic fatty liver disease. **Diabetes Metab**, v. 29, n. 5, p. 478–485, 2003.
- DONG, G.; ZHOU, Y.; SONG, X. In vitro inhibitory effects of bergenin on human liver cytochrome P450 enzymes. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 620–625, 2018.
- DONNELLY, K. L.; BOLDT, M. D.; PARKS, E. J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343–1351, 2005.
- DWIVEDI, V. P. et al. The Phytochemical Bergenin Enhances T Helper 1 Responses and Anti-Mycobacterial Immunity by Activating the MAP Kinase Pathway in Macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.
- EID, H. M. et al. The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 41, p. 74–81, 2015.
- ESLAM, M. et al. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. **Gastroenterology**, v. 158, n. 7, p. 1999–2014.e1, 2020.
- FABBRINI, E. et al. Alteration in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 424–431, 2009.
- FAN, Y.; PEDERSEN, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 55–71, 2021.
- FÄNDRIKS, L. Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview. **Journal of Internal Medicine**, v. 281, n. 4, p. 319–336, 2017.
- FEINSTEIN, R. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 35, p. 26055–26058, 1993.
- FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 7, p. 1746–1755, 2014.
- FOX, C. S. et al. Abdominal Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Compartments. **Circulation**, v. 116, n. 1, p. 39–48, 2007.
- GALASSO, L. et al. Effects of shift work in a sample of italian nurses: Analysis of rest-activity circadian rhythm. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 16, 2021.

- GAO, F. et al. 4-Hydroxyisoleucine improves insulin resistance in HepG2 cells by decreasing TNF- $\alpha$  and regulating the expression of insulin signal transduction proteins. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 5, p. 6555–6560, 2015.
- GUNDERMANN, K. J. et al. Activity of essential phospholipids (EPL) from soybean in liver diseases. **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 3, p. 643–659, 2011.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, n. 2–3, p. 67–202, 2002.
- HAY, J. E.; HAYNES, L. J. 453. Bergenin, a C-glycopyranosyl derivative of 4-O-methylgallic acid. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 2231–2238, 1958.
- HERNANDEZ-RODAS, M. C.; VALENZUELA, R.; VIDELA, L. A. Relevant aspects of nutritional and dietary interventions in non-alcoholic fatty liver disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 25168–25198, 2015.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Insight Review - Nature**, v. 444, p. 860–867, 2006.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; DAVIS, R. J. Cell signaling and stress responses. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 10, 2016.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.
- HOU, W. et al. Bergenin Activates SIRT1 as a Novel Therapeutic Agent for Osteogenesis of Bone Mesenchymal Stem Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2019.
- IVANOV, S. A. et al. Isolation of a novel catechin from *Bergenia* rhizomes that has pronounced lipase-inhibiting and antioxidative properties. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 212–218, 2011.
- JAHROMI, M. A. F.; CHANSOURIA, J. P. N.; RAY, A. B. Hypolipidaemic Activity in Rats of Bergenin, the Major Constituent of *Flueggea microcarpa*. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 4, p. 180–183, 1992.
- JAYAKODY, R. S. et al. Bergenin: a computationally proven promising scaffold for novel galectin-3 inhibitors. **Journal of Molecular Modeling**, v. 24, n. 9, p. 257–299, 2018a.
- JAYAKODY, R. S. et al. Bergenin: a computationally proven promising scaffold for novel galectin-3 inhibitors. **Journal of Molecular Modeling**, v. 24, n. 10, p. 23–302, 2018b.
- JI, Y. et al. Bergenin Ameliorates MPTP-Induced Parkinson's Disease by Activating PI3K/Akt Signaling Pathway. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 72, n. 1, p. 1–11, 2019.
- JOHANNSEN, D. L. et al. Effect of 8 weeks of overfeeding on ectopic fat deposition and insulin sensitivity: Testing the “adipose tissue expandability” hypothesis. **Diabetes Care**, v. 37, n. 10, p. 2789–2797, 2014.
- KAPLAN, M. The Deadly Quartet Upper-Body Obesity, Glucose Intolerance. **Arch Intern Med**, v. 149, n. 7, p. 1514–1520, 1989.

- KASHIMA, Y. et al. Structure-activity relationships of bergenin derivatives effect on  $\alpha$ -glucosidase inhibition. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1162–1170, 2013.
- KAUFMANN, B. et al. Mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease and implications for surgery. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 405, n. 8, 2020.
- KAUR, R.; KAUR, S. Evaluation of in vitro and in vivo antileishmanial potential of bergenin rich *Bergenia ligulata* (Wall.) Engl. root extract against visceral leishmaniasis in inbred BALB/c mice through immunomodulation. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 8, n. 1, p. 251–260, 2018.
- KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011.
- KHALIFAH, R. G.; BAYNES, J. W.; HUDSON, B. G. Breakthroughs and views. Amadorins: Novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 257, n. 2, p. 251–258, 1999.
- KHAN, S. R. Reactive oxygen species, inflammation and calcium oxalate nephrolithiasis. **Translational Andrology and Urology**, v. 3, n. 3, p. 256–276, 2014.
- KIHO, T. et al. Tomato Paste Fraction Inhibiting the Formation of Advanced. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 200–205, 2004.
- KUMAR, R. et al. Type 2 antidiabetic activity of bergenin from the roots of *Caesalpinia digyna* Rottler. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 395–401, 2012.
- KUMAR, S. et al. The phytochemical bergenin as an adjunct immunotherapy for tuberculosis in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 39, p. 8555–8563, 2019.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An overview. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 162750, 2013.
- LABAZI, H.; TRASK, A. J. Coronary microvascular disease as an early culprit in the pathophysiology of diabetes and metabolic syndrome. **Pharmacological Research**, v. 123, p. 114–121, 2017.
- LAI, D. et al. Chromone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Xylomelasma* sp. Samif07, and their antibacterial and antioxidant activities. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2019.
- LAVIN, Y. et al. Regulation of macrophage peripheral tissues. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. December, p. 731–744, 2015.
- LE LAY, S. et al. Oxidative stress and metabolic pathologies: From an adipocentric point of view. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.
- LEE, J. H. et al. The role of adipose tissue mitochondria: Regulation of mitochondrial function for the treatment of metabolic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, 2019a.
- LEE, K. H.; CHOI, E. M. Effects of bergenin on methylglyoxal - induced damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 1, n. August, p. 1–9, 2017.
- LEE, K. H.; CHOI, E. M. Effects of bergenin on methylglyoxal - induced damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Journal of Wiley Applied Toxicology**, v. 38, n. 4, p. 585–593,

2018.

LEE, Y. et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Diabetes . Part I: Epidemiology and Diagnosis. **Journal Diabetes e Metabolism**, v. 43, n. 5, p. 31–45, 2019b.

LI, C. et al. Macrophage polarization and meta-inflammation. **Translational Research**, v. 191, p. 29–44, 2018a.

LI, S. et al. The Potential and Action Mechanism of Polyphenols in the Treatment of Liver Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 25, 2018b.

LI, S. et al. The Impacts of Herbal Medicines and Natural Products on Regulating the Hepatic Lipid Metabolism. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. 24, p. 351, 2020.

LIANG, C. et al. Synthesis and in vitro and in vivo antitumour activity study of 11-hydroxyl esterified bergenin/cinnamic acid hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 133, p. 319–328, 2017.

LIANG, J. et al. In vivo and in vitro antimalarial activity of bergenin. **Biomedical Reports**, v. 2, n. 2, p. 260–264, 2014.

LIU, C. et al. Oleanolic acid diminishes liquid fructose-induced fatty liver in rats: Role of modulation of hepatic sterol regulatory element-binding protein-1c-mediated expression of genes responsible for de novo fatty acid synthesis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 6–8, 2013.

LIZCANO, F. The beige adipocyte as a therapy for metabolic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, p. 50–58, 2019.

LOH, M. et al. Epigenetic disturbances in obesity and diabetes: Epidemiological and functional insights. **Molecular Metabolism**, v. 27, p. S33–S41, 2019.

LOO, T. M. et al. Gut microbiota promotes obesity-associated liver cancer through pge2-mediated suppression of antitumor immunity. **Cancer Discovery**, v. 7, n. 5, p. 522–538, 2017.

LOPES DE OLIVEIRA, G. A. et al. Preventive effect of bergenin against the development of TNBS-induced acute colitis in rats is associated with inflammatory mediators inhibition and NLRP3/ASC inflammasome signaling pathways. **Chemico-Biological Interactions**, 2019.

LÓPEZ, D. et al. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 1, p. 280–285, 2009.

LU, Y. et al. Yin Yang 1 promotes hepatic steatosis through repression of farnesoid X receptor in obese mice. **Gut**, v. 63, n. 1, p. 170–178, 2014.

MACIEL, R. M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of quercetin in functional and morphological alterations in streptozotocin-induced diabetic rats. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 389–397, 2013.

MALEBO, H. M. et al. Antiplasmodial, anti-trypanosomal, anti-leishmanial and cytotoxicity activity of selected Tanzanian medicinal plants. **Tanzania Journal of Health Research**, v. 11, n. 4, p. 226–234, 2009.

MARRERO, S.; ADASHI, E. Y. Noncommunicable Diseases. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 33, p. 35–40, 2015.

- MAURY, E. Off the clock: From circadian disruption to metabolic disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1–25, 2019.
- MCHILL, A. W.; WRIGHT, K. P. Role of sleep and circadian disruption on energy expenditure and in metabolic predisposition to human obesity and metabolic disease. **Obesity Reviews**, v. 18, n. February, p. 15–24, 2017.
- MEDRIKOVA, D. et al. Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: Adipose tissue expandability and glycemic control. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 2, p. 262–272, 2012.
- MENDOZA MEZA, D. L.; MEDINA VALDÉS, R. Inhibición in vitro de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl). **Avances en Química**, v. 10, n. 1, p. 33–40, 2015.
- MICE, B. et al. Protective Effect of Bergenin against Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression by Immunomodulatory Effect and Antioxidation in Balb/c Mice. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 2668, 2018.
- MOLYNEUX, P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. December 2003, p. 211–219, 2004.
- MONDEN, M. et al. Receptor for advanced glycation end products regulates adipocyte hypertrophy and insulin sensitivity in mice: Involvement of toll-like receptor 2. **Diabetes**, v. 62, n. 2, p. 478–489, 2013.
- MORENO, D. A. et al. Inhibition of lipid metabolic enzymes using *Mangifera indica* extracts. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 4, n. 1, p. 21–26, 2006.
- MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **European Journal of Biochemistry**, v. 219, n. 3, p. 713–725, 1994.
- MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 1, p. 1–26, 2009.
- NAKAYAMA, G. R. et al. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p. 205–208, 1997.
- NAVEEN, Y. P. et al. Phytochemical Composition and In vitro Anti-Hyperglycemic Potency of *Eucalyptus tereticornis* Bark. **Indian J Nutri.**, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2014.
- NEWELL, A. M. B. et al. Comparative in vitro bioactivities of tea extracts from six species of *Ardisia* and their effect on growth inhibition of HepG2 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 3, p. 536–544, 2010.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.
- O'ROURKE, R. W. Adipose tissue and the physiologic underpinnings of metabolic disease. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 14, n. 11, p. 1755–1763, 2018.
- OLIVEIRA, G. R. B. DE et al. Stem bark extracts of *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec: Inhibition of pancreatic lipase and antioxidant activity. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, n. 30, p. 472–479, 2017a.

- OLIVEIRA, G. A. L. et al. Bergenin from *Peltophorum dubium*: Isolation, Characterization, and Antioxidant Activities in Non-Biological Systems and Erythrocytes. **Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 592–603, 2017b.
- PATEL, D. K. et al. Pharmacological and analytical aspects of bergenin: A concise report. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 2, p. 163–167, 2012.
- PAVAN KUMAR, P. et al. Synthesis and biological evaluation of bergenin-1,2,3-triazole hybrids as novel class of anti-mitotic agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 91, p. 103–161, 2019.
- PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Exercise as medicine - Evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 25, n. 3, p. 1–72, 2015.
- POLYZOS, S. A. et al. of non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetes, obesity and Metabolism**, v. 12, n. 5, p. 365–383, 2010.
- POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 8, p. 1062–1079, 2016.
- POLYZOS, S.; KOUNTOURAS, J.; ZAVOS, C. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Pathogenetic Roles of Insulin Resistance and Adipocytokines. **Current Molecular Medicine**, v. 9, n. 3, p. 299–314, 2009.
- PONZIANI, F. R. et al. Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism. **Expert Review of Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 8, p. 1055–1067, 2015.
- QIAO, S. et al. Bergenin impedes the generation of extracellular matrix in glomerular mesangial cells and ameliorates diabetic nephropathy in mice by inhibiting oxidative stress via the mTOR/ $\beta$ -TrcP/Nrf2 pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 145, n. 15, p. 118–135, 2019.
- QIN, N. et al. Anti-obesity and anti-diabetic effects of flavonoid derivative (Fla-CN) via microRNA in high fat diet induced obesity mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, p. 52–63, 2016.
- RAMKUMAR, S.; RAGHUNATH, A.; RAGHUNATH, S. Statin therapy: Review of safety and potential side effects. **Acta Cardiologica Sinica**, v. 32, n. 6, p. 631–639, 2016.
- REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595–1607, 1988.
- REN, X. et al. Comparative effects of dexamethasone and bergenin on chronic bronchitis and their anti-inflammatory mechanisms based on NMR metabolomics. **Molecular Bio Systems**, v. 12, n. 16, p. 1938–1947, 2016.
- ROSELLI, M.; LENTINI, G.; HABTEMARIAM, S. Phytochemical, antioxidant and anti- $\alpha$ -glucosidase activity evaluations of *Bergenia cordifolia*. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 6, p. 908–914, 2012.
- RUIZ, H. H.; RAMASAMY, R.; SCHMIDT, A. M. Advanced glycation end products: Building on the concept of the “common soil” in metabolic disease. **Endocrinology (United States)**, v. 161, n. 1, p. 1–10, 2020.
- RUNPANICHLERT, J. A. et al. Azaphilone and Isocoumarin Derivatives from the Endophytic Fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n.

August, p. 1033–1036, 2010.

S.GÓMEZ-ZORITA et al. Resveratrol attenuates steatosis in obese Zucker rats by decreasing fatty acid availability and reducing oxidative stress. **British Journal of Nutrition**, v. 107, p. 202–210, 2012.

SAADATI, S. et al. The effects of curcumin supplementation on liver enzymes, lipid profile, glucose homeostasis, and hepatic steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 3, p. 441–449, 2019.

SAEEDI, P. et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 157, p. 107843, 2019.

SAHEBKAR, A. Why it is necessary to translate curcumin into clinical practice for the prevention and treatment of metabolic syndrome? **BioFactors**, v. 39, n. 2, p. 197–208, 2013.

SAKELLARIOU, G. K. et al. Long-Term administration of the mitochondria-Targeted antioxidant mitoquinone mesylate fails to attenuate age-related oxidative damage or rescue the loss of muscle mass and function associated with aging of skeletal muscle. **FASEB Journal**, v. 30, n. 11, p. 3771–3785, 2016.

SAN, H. T. et al. Bergenin from *Cissus javana* DC. (Vitaceae) root extract enhances glucose uptake by rat L6 myotubes. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 5, p. 1081–1086, 2020.

SANJEEV, S. et al. Isolation, characterization, and therapeutic activity of bergenin from marlberry (*Ardisia colorata* Roxb.) leaf on diabetic testicular complications in Wistar albino rats. **Environmental science and pollution research**, v. 26, n. 296, p. 7082–7101, 2019.

SEGERSTROM, S. C. Stress, Energy, and Immunity. **Biodiversity**, v. 3, n. 2, p. 39–41, 2002.

SHANG, J. et al. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-. **Acta Pharmacol Sin**, v. 29, n. 6, p. 698–706, 2008.

SHARMA, A. M.; STAELS, B. Review: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and adipose tissue - Understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 2, p. 386–395, 2007.

SHEN, M. et al. Preparation of bergenin - Poly (lactic acid) polymers and in vitro controlled release studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 354–363, 2018.

SHI, X. et al. Anticancer activity of bergenin against cervical cancer cells involves apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and the STAT3 signalling pathway. **Journal Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 18, n. 4, p. 3525–3529, 2019.

SHIKOV, A. N. et al. Effect of *Bergenia crassifolia* L. extracts on weight gain and feeding behavior of rats with high-caloric diet-induced obesity. **Phytomedicine**, v. 19, n. 14, p. 1250–1255, 2012.

SHULMAN, G. I. et al. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **The New English Journal of medicine**, v. 323, n. 16, p. 1120–1123, 1990.

- SIK, K. et al. Bergenin increases osteogenic differentiation and prevents methylglyoxal-induced cytotoxicity in MC3T3-E1 osteoblasts. **Journal Cytotechnology**, v. 70, n. 1, p. 215–224, 2018.
- SILVA, L. R.; TEIXEIRA, R. Phenolic profile and biological potential of *Endopleura uchi* extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 11, p. 889–897, 2015.
- SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 739–746, 1999.
- SINGH, J.; KUMAR, A.; SHARMA, A. Antianxiety activity guided isolation and characterization of bergenin from *Caesalpinia digyna* Rottler roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p. 182–187, 2017.
- SINGH, U. et al. Differential free radical scavenging activity and radioprotection of *Caesalpinia Digyna* extracts and its active constituent. **Journal of Radiation Research**, v. 50, n. 5, p. 425–433, 2009.
- SINGH, U.; BARIK, A.; PRIYADARSINI, K. I. Reactions of hydroxyl radical with bergenin, a natural poly phenol studied by pulse radiolysis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 16, p. 6008–6014, 2009.
- SLANC, P. et al. Screening of Selected Food and Medicinal Plant Extracts for Pancreatic Lipase Inhibition. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 4, p. 544–549, 2008.
- SLYPER, A. H. A paradigm shift for the prevention and treatment of individual and global obesity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 11, p. 855–861, 2018.
- SMITH, C. E.; ORDOVÁS, J. M. Update on perilipin polymorphisms and obesity. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 10, p. 611–621, 2012.
- SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 411–417, 2004.
- SRIKANTHAN, K. et al. Systematic review of metabolic syndrome biomarkers: A panel for early detection, management, and risk stratification in the West Virginian population. **International Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 25–38, 2016.
- SRINIVASAN, R. et al. Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 284–291, 2007.
- SRIVASTAVA, G.; APOVIAN, C. M. Current pharmacotherapy for obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 12–24, 2018.
- SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A. In vitro  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, n. 2, p. 391–398, 2008.
- SUN, Y. et al. Berberine attenuates hepatic steatosis and enhances energy expenditure in mice by inducing autophagy and fibroblast growth factor 21. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 2, p. 374–387, 2018.
- TADERA, K. et al. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 52, n. 2, p. 149–153, 2006.
- TANDON, P.; WAFER, R.; MINCHIN, J. E. N. Adipose morphology and metabolic disease.

**Journal of Experimental Biology**, v. 121, n. 1, 2018.

TIANPANICH, K. et al. Radical scavenging and antioxidant activities of isocoumarins and a phthalide from the endophytic fungus *Colletotrichum* sp. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 1, p. 79–81, 2011.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772–783, 2006.

VALOIS, N. et al. Effect of Uxi (*Endopleura uchi*) tea in hepatic steatosis. **Revista Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 16, n. 92, p. 25–29, 2018.

VEILLEUX, A. et al. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. **Diabetes**, v. 60, n. 5, p. 1504–1511, 2011.

VIJAYA KUMAR, T. et al. Synthesis and antiglycation potentials of bergenin derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 16, p. 4928–4931, 2011.

WAHYUNINGRUM, R. et al. Screening of potential free radicals scavenger and antibacterial activities of purwoceng (*Pimpinella alpina* molk). **Tropical Life Sciences Research**, v. 27, p. 161–166, 2016.

WANG, C. H. et al. Mitochondrial dysfunction leads to impairment of insulin sensitivity and adiponectin secretion in adipocytes. **FEBS Journal**, v. 280, n. 4, p. 1039–1050, 2013.

WANG, G. S.; HOYTE, C. Review of Biguanide (Metformin) Toxicity. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 34, n. 11–12, p. 863–876, 2019.

WANG, K. et al. Bergenin, Acting as an Agonist of PPAR  $\gamma$ , Ameliorates Experimental Colitis in Mice through Improving Expression of SIRT1, and Therefore Inhibiting NF- $\kappa$ B-Mediated Macrophage Activation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 8, p. 1–20, 2018.

WHITING, D. R. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 94, n. 3, p. 311–321, 2011.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8896–8907, 2007.

XIA, X. et al. Berberine improves glucose metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2011.

XIANG, S. et al. Bergenin exerts hepatoprotective effects by inhibiting the release of inflammatory factors, apoptosis and autophagy via the PPAR- $\gamma$  pathway. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 129–143, 2020.

XU, L. et al. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms. **Pharmacological Research**, v. 130, p. 451–465, 2018.

XU, X. et al. Therapeutic effect of berberine on metabolic diseases: Both pharmacological data and clinical evidence. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 133, n. 2020, p. 110984, 2021.

XUE, Y. et al. Chemical constituents from *Astilbe chinensis*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, n. 2, p. 188–191, 2011.

YANG, J.; KAN, M.; WU, G. Y. Bergenin ameliorates diabetic nephropathy in rats via

- suppressing renal inflammation and TGF- $\beta$  1- Smads pathway. **Journal Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 38, n. 2, p. 145–152, 2016.
- YANG, S. et al. The natural product bergenin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting NF-kappaB activation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 200, n. 6, p. 147–155, 2017.
- YAO, H. et al. Herbal medicines and nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 30, p. 6890–6905, 2016.
- YE, R.; SCHERER, P. E. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? **Molecular Metabolism**, v. 2, n. 3, p. 133–141, 2013.
- YOSHIMOTO, S. et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. **Nature**, v. 499, n. 7456, p. 97–101, 2013.
- YU, K. Y. et al. A new compound, methylbergenin along with eight known compounds with cytotoxicity and anti-inflammatory activity from *Ardisia japonica*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 22, p. 2581–2586, 2017.
- YUAN, X. et al. Berberine ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by a global modulation of hepatic mRNA and lncRNA expression profiles. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2015.
- YUN, J. et al. Bergenin decreases the morphine-induced physical dependence via antioxidative activity in mice. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 6, p. 1248–1254, 2015.
- ZHANG, C. et al. Mechanisms of bergenin treatment on chronic bronchitis analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on metabolomics. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. 6, p. 2270–2277, 2019.
- ZHANG, J. et al. Pancreatic lipase inhibitory activity of taraxacum officinale in vitro and in vivo. **Nutrition Research and Practice**, v. 2, n. 4, p. 200, 2008.
- ZHENG, T. et al. Beneficial Effects of Rhodiola and Salidroside in Diabetes: Potential Role of AMP-Activated Protein Kinase. **Molecular Diagnosis and Therapy**, v. 23, n. 4, p. 489–498, 2019.