

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**RAQUEL OLIVEIRA PEREIRA**

**EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTIADIPOGÊNICO DO EXTRATO AQUOSO DE  
ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.) EM CÉLULAS HEPG2 E 3T3-L1**

**SÃO CRISTÓVÃO/SE**

**2020**

**RAQUEL OLIVEIRA PEREIRA**

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Mara de Oliveira e Silva

**EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTIADIPOGÊNICO DO EXTRATO AQUOSO DE  
ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.) EM CÉLULAS HEPG2 E 3T3-L1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde.

SÃO CRISTÓVÃO/SE

2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

P436e Pereira, Raquel Oliveira  
Efeito antioxidante e antiadipogênico do extrato aquoso de  
alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em células HepG2 e 3T3-L1 /  
Raquel Oliveira Pereira ; orientadora Ana Mara de Oliveira e Silva.  
– São Cristóvão, SE, 2020.  
65 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade  
Federal de Sergipe, 2020.

1. Obesidade. 2. Stress oxidativo. 3. Alecrim. I. Silva, Ana Mara  
de Oliveira e, orient. II. Título.

CDU 616-056.257-085:633.812

**RAQUEL OLIVEIRA PEREIRA**

**EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTIADIPOGÊNICO DO EXTRATO AQUOSO DE  
ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.) EM CÉLULAS HEPG2 E 3T3-L1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe  
como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em  
Ciências da Saúde.

Aprovada em 27/02/2020

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Mara de Oliveira e Silva  
PPGCS/UFS

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Luana Heimfarth  
1º. Examinador/ PPGCS/UFS

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Izabela Maria Montezano de Carvalho  
2º. Examinador/ PPGCNUT/UFS

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha mãe, Adriana, por ser meu maior exemplo de força e garra, por ser minha maior incentivadora e por ter apoiado todas as minhas escolhas para que eu chegasse até aqui.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar muito mais do que eu mereço e por ser sempre a minha rocha firme nessa vida.

À minha família, por serem meus maiores incentivadores. Amo vocês!

Ao meu esposo, Rafael, pela paciência, apoio e por carregar todos os fardos junto comigo desde sempre, te amo!

À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Ana Mara, pela oportunidade de aprender cada vez mais sobre esse mundo dos alimentos, pelas experiências proporcionadas desde a graduação e por toda a paciência, carinho e cuidado para com seus alunos. Muito Obrigada!

À minha amiga Anne, por ser uma benção em minha vida, desde o início dessa trajetória, por compartilhar as dificuldades para execução deste trabalho e pela amizade em tantos outros momentos além da UFS. Essa jornada se tornou mais leve por compartilhá-la com você, serei eternamente grata por sua amizade e companheirismo.

À Dr.<sup>a</sup> Luciana Yoshime, a pessoa mais generosa que tive o prazer de conhecer durante o mestrado. Obrigada por toda contribuição e disponibilidade para ajudar no desenvolvimento deste trabalho, e pela experiência única de aprender tanto sobre cultura celular, foi extremamente prazeroso trabalhar com você!

Ao professor Dr. Jorge Mancini, que abriu as portas do laboratório de Lípidos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP para que eu vivenciasse a mobilidade acadêmica da melhor forma possível, trazendo de volta uma experiência enriquecedora como estudante.

À Elias, pela análise cromatográfica do extrato de alecrim.

À professora Cristiane Bani, seu aluno William e o técnico Gileno, pela disponibilidade em me receber em seu laboratório e pelos ensinamentos com o trabalho em cultura celular.

À minha amiga Layanne, por ter me recebido tão carinhosamente em São Paulo, pelos momentos de alegria e por ter acompanhado parte desta jornada.

À minha amiga Andreza, por toda a disponibilidade em me ajudar, por todo carinho e amizade. Aos meus demais colegas de laboratório, Daniel, Erivan e Washington que foram essenciais para meu crescimento profissional nesse período de aprendizado.

Às professoras Jullyana Quintans, Luana Heimfarth, Elma Wartha e Izabela Montezano pelas valiosas contribuições para enriquecimento deste trabalho durante a qualificação e defesa.

À Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade de concluir mais uma etapa profissional em uma instituição pública com ensino de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e todos os professores que o compõe,  
pela oportunidade de aprender e me especializar nesse campo do conhecimento.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa.

## RESUMO

Efeito antioxidante e antiadipogênico do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em células HepG2 e 3T3-L1. Raquel Oliveira Pereira. São Cristóvão, 2020.

A espécie *Rosmarinus officinalis* L., também conhecida como alecrim, é uma erva aromática caracterizada como uma fonte promissora de compostos fenólicos. Dentre os efeitos biológicos conhecidos, destacam-se: atividade antioxidante, anti-inflamatória e melhora do perfil lipídico. O extrato aquoso de alecrim (EAA), constituído principalmente pelo ácido rosmarínico e apigenina, diferentemente dos extratos mais apolares, ainda não foi explorado no contexto da obesidade e seus agravos. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a participação dos compostos bioativos do EAA na prevenção de alterações do metabolismo lipídico e estresse oxidativo em cultura de hepatócitos (HepG2) e adipócitos (3T3-L1). Para isso, células HepG2 foram expostas à diferentes concentrações de EAA (5-2000 µg/mL) na presença ou ausência do ácido palmítico, para avaliação da viabilidade celular, determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e determinação da incorporação de lipídios. Células 3T3-L1 também foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular após incubação durante 48 horas. Essas células foram estimuladas a se diferenciarem em adipócitos maduros, na presença ou ausência do EAA. Após 7 dias de diferenciação, células 3T3-L1 foram submetidas as mesmas determinações empregadas para os ensaios com as células HepG2. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de *Tukey*, adotando diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre as médias. Os resultados mostram que o EAA não alterou a viabilidade celular em células HepG2 quando comparado ao controle, bem como a presença do ácido palmítico não alterou essa condição. Entretanto, uma redução da viabilidade foi observada na linhagem 3T3-L1 quando exposta ao EAA em todas as concentrações. No entanto, a dose de 5µg/mL não apresentou citotoxicidade. Foi observado também uma redução na produção de ERO em células HepG2 expostas ao ácido palmítico e tratadas com o EAA ( $p < 0,05$ ). Essa redução também aconteceu em células 3T3-L1 diferenciadas ( $p < 0,05$ ), mas a redução das ERO não alterou a incorporação de lipídios nos hepatócitos. Em contrapartida, foi observada uma atividade inibitória na dose de 10µg/mL do EAA na diferenciação das células 3T3-L1 ( $p < 0,05$ ), quantificada através de uma menor presença de gotículas lipídicas nessas células. Os principais achados desse estudo mostram que o EAA foi capaz de alterar o estado redox em cultura de HepG2 e 3T3-L1, bem como inibiu, a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros. Essa atividade pode estar associada a uma menor disponibilidade de ERO e menor ativação de vias de adipogênese. Contudo, o mecanismo de redução de estresse oxidativo observado nas células HepG2 não está associado a uma redução na incorporação de lipídios nas HepG2, portanto outras vias precisam investigadas.

**Descritores:** *Rosmarinus Officinalis*; obesidade; estresse oxidativo; adipogênese; alecrim.

## ABSTRACT

Antioxidant and antiadipogenic effect of the aqueous extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) On HepG2 and 3T3-L1 cells. Raquel Oliveira Pereira. São Cristóvão, 2020.

The species *Rosmarinus officinalis* L., also known as rosemary, is an aromatic herb characterized as a promising source of phenolic compounds. Among the known biological effects, the following stand out: antioxidant, anti-inflammatory and improved lipid profile. Despite biological activities already well described, the aqueous extract of rosemary (RAE), which has rosmarinic acid and apigenin as its main components, unlike the more nonpolar extracts, has not yet been explored in the context of obesity and its problems. In this sense, the objective of the present study was to evaluate the participation of EAA bioactive compounds in the prevention of alterations in lipid metabolism and oxidative stress in culture of hepatocytes (HepG2) and adipocytes (3T3-L1). For this, HepG2 cells were exposed to different concentrations of EAA (5-2000  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) in the presence or absence of palmitic acid, to assess cell viability, determine reactive oxygen species (ROS) and determine lipid incorporation. 3T3-L1 cells were also subjected to the cell viability assay after incubation for 48 hours. These cells were stimulated to differentiate into mature adipocytes, in the presence or absence of EAA. After 7 days of differentiation, 3T3-L1 cells were subjected to the same determinations used for assays with HepG2 cells. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test, adopting statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the means. The results show that EAA did not alter cell viability in HepG2 cells when compared to control, and the presence of palmitic acid did not change this condition. However, a reduction in viability was observed in the 3T3-L1 strain when exposed to EAA in all concentrations. However, the dose of 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  did not show cytotoxicity. A reduction in ROS production was also observed in HepG2 cells exposed to palmitic acid and treated with EAA ( $p < 0.05$ ). This reduction also occurred in differentiated 3T3-L1 cells ( $p < 0.05$ ), but the reduction in ROS did not alter the incorporation of lipids in hepatocytes. On the other hand, an inhibitory activity was observed at the dose of 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  of EAA in the differentiation of 3T3-L1 cells ( $p < 0.05$ ), quantified through a lower presence of lipid droplets in these cells. The main findings of this study show that EAA was able to change the redox state in HepG2 and 3T3-L1 culture, as well as inhibiting the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes into mature adipocytes. This activity may be associated with a lower availability of ROS and less activation of adipogenesis pathways. However, the oxidative stress reduction mechanism observed in HepG2 cells is not associated with a reduction in the incorporation of lipids in HepG2, so other pathways need to be investigated.

**Descriptors:** *Rosmarinus Officinalis*; obesity; oxidative stress, adipogenesis, rosemary.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPC:** adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- ATCC:** American Type Culture Collection
- CAT:** catalase
- CCAT:** proteína de ligação de intensificador- $\alpha$
- CLAE:** cromatografia líquida de alta eficiência
- COX-2:** ciclooxigenase 2
- DCFA-DA:** 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato
- DEXA:** dexametasona
- DHGNA:** doença hepática gordurosa não-alcóolica
- DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- DPPH:** Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
- EAA:** extrato aquoso de alecrim
- EAG:** equivalente de ácido gálico
- ECM:** expansão clonal mitótica
- ECQ:** equivalente de catequina
- EDTA:** ácido etilenodiamino tetra-acético
- ERO:** espécies reativas de oxigênio
- GSH:** glutationa
- GSH-px:** glutationa peroxidase
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio
- IBMX:** isobutil-1-metilxantina
- IFN- $\gamma$ :** interferon gama
- IGF-1:** fator de crescimento semelhante a insulina
- IL-1 $\beta$ :** interleucina 1 beta
- IL-6:** interleucina 6
- IL-8:** interleucina 8
- IMC:** índice de massa corporal
- iNOS:** óxido nítrico sintase induzível
- Keap1-Nrf2-ARE:** Kelch-like ECH-associated protein 1 - nuclear factor erythroid 2-related factor 2 - antioxidant response element
- LPS:** lipopolissacarídeo

**MAPKs:** proteínas quinases ativadas por mitógenos

**MCP-1/CCL2:** proteína quimioatrativa de macrófagos

**MSCs:** células-tronco mesenquimais

**MTT:** 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)- 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

**NF- $\kappa$ B:** fator nuclear kappa beta

**NO:** Óxido nítrico

**O<sup>2•-</sup>:** ânion superóxido

**ONOO<sup>-</sup>:** peroxinitrito

**PAI-1:** inibidor 1 de ativador de plasminogênio

**PPAR- $\alpha$ :** receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa

**PPAR- $\gamma$ :** receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

**SOD:** enzima superóxido dismutase TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**SREBP1:** proteína de ligação de elemento regulador de esterol-1

**STZ:** estreptozotocina

**TAB:** tecido adiposo branco

**TAG:** triacilglicerol

**TAM:** tecido adiposo marrom

**TLR:** receptor do tipo toll-like

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral alfa

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Integração entre tecido adiposo e fígado durante a obesidade.....	19
<b>Figura 2.</b> Folha de Alecrim.....	22
<b>Figura 3.</b> Estrutura de alguns polifenóis encontrados em extratos de alecrim. ....	23
<b>Figura 4.</b> Fibroblastos 3T3-L1.....	25
<b>Figura 5.</b> Células HepG2 .....	26
<b>Figura 6.</b> Processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros .....	34
<b>Figura 7.</b> Processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros .....	35
<b>Figura 8.</b> Cromatograma do extrato aquoso de alecrim obtido pela técnica de CLAE. ....	38
<b>Figura 9.</b> Atividade antioxidante do EAA pela captura do radical livre DPPH. ....	40
<b>Figura 10.</b> Efeito do tratamento por 24 horas do EAA na ausência ou presença do ácido palmítico (AP) sob a viabilidade celular de células HepG2 avaliado pelo método de MTT. ..	40
<b>Figura 11.</b> Efeito do tratamento por 24 horas com EAA e com o solvente DMSO nas mesmas concentrações sob a viabilidade celular de células HepG2 avaliada pelo método de MTT.....	41
<b>Figura 12.</b> Produção intracelular de ERO em células HepG2, quando expostas ao ácido palmítico (AP) e na presença ou ausência de tratamento com EAA.. ....	42
<b>Figura 13.</b> Acúmulo de lipídios quantificado pelo valor de absorbância do corante Oil Red extraído a 510 nm. ....	42
<b>Figura 14.</b> Efeito do tratamento por 48 horas do EAA sob a viabilidade de células 3T3-L1 avaliada pelo método de MTT.....	43
<b>Figura 15.</b> Determinação da incorporação de lipídio intracelular em células 3T3-L1 diferenciadas em adipócitos. ....	44
<b>Figura 16.</b> Produção intracelular de ERO, por células 3T3-L1 após processo de diferenciação de 7 dias, na presença ou ausência de tratamento com EAA.. ....	45

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
<b>2.1 Obesidade: definição e dados epidemiológicos</b> .....	15
<b>2.2 Fisiopatologia da obesidade</b> .....	16
2.2.1 O tecido adiposo como um órgão dinâmico .....	16
2.2.2 Repercussões metabólicas da obesidade: o fígado como um tecido alvo.....	18
2.2.3 Papel do estresse oxidativo na obesidade: vias de sinalização .....	19
<b>2.3 Polifenóis e sua atuação no estresse oxidativo associado à obesidade</b> .....	21
2.3.1 <i>Rosmarinus officinalis L.</i> e suas propriedades biológicas: relevância para a saúde ....	22
<b>2.4 Métodos <i>in vitro</i> para estudo da adipogênese e DHGNA</b> .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3.1 Geral:</b> .....	27
<b>3.2 Específicos:</b> .....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
<b>4.1 Obtenção do extrato aquoso de alecrim</b> .....	28
<b>4.2 Identificação e quantificação dos componentes do extrato aquoso de alecrim:</b> .....	28
4.2.1 Determinação de fenólicos totais .....	28
4.2.2 Determinação de flavonoides totais .....	28
4.2.3 Cromatografia .....	29
<b>4.3 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato aquoso de alecrim</b> .....	29
4.3.1 Preparo das doses de EAA.....	29
4.3.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do EAA pelo método de varredura do radical DPPH• .....	30
<b>4.4 Cultura de células</b> .....	30
4.4.1 Preparo do tratamento com extrato aquoso de alecrim para cultura de células .....	30
4.4.2 Cultivo Celular.....	30
<b>4.5 Células HepG2</b> .....	31
4.5.1 Preparo da solução de ácido palmítico .....	31
4.5.2. Viabilidade celular .....	31
4.5.3 Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) .....	32
4.5.4 Coloração dos corpúsculos lipídicos por Oil Red.....	32
<b>4.6 Células 3T3-L1</b> .....	33

4.6.1 Viabilidade Celular .....	33
4.6.2 Diferenciação de fibroblastos 3T3-L1 em adipócitos .....	33
4.6.3 Determinação de ERO .....	35
4.6.4 Coloração dos corpúsculos lipídicos por Oil Red .....	35
<b>4.7 Análise estatística .....</b>	<b>36</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1 Análise química: identificação, quantificação dos componentes do extrato aquoso de alecrim e atividade antioxidante.....</b>	<b>37</b>
5.1.1 Quantificação de fenólicos e flavonoides totais: .....	37
5.1.2 Cromatografia .....	37
<b>5.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato aquoso de alecrim pelo método de DPPH .....</b>	<b>39</b>
<b>5.3 Linhagem HepG2.....</b>	<b>40</b>
5.3.1 Viabilidade Celular .....	40
5.3.2 Produção de ERO.....	41
5.3.3 Incorporação de lipídio intracelular .....	42
<b>5.4 Linhagem 3T3-L1 .....</b>	<b>43</b>
5.4.1 Viabilidade celular .....	43
5.4.2 Atividade inibitória na diferenciação de adipócitos.....	43
5.4.3 Produção de ERO.....	44
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença multifatorial, resultado de um desbalanço energético crônico onde a ingestão calórica supera o gasto energético (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019). No cenário global, é considerado um grave problema de saúde pública em função de sua associação com aumento do risco para desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como diabetes tipo II, hipertensão, doenças cardiovasculares, esteatose hepática e alguns tipos de câncer (KIM; DESPRÉS; KOH, 2016; PARK; MUN, 2013; STEFAN et al., 2013).

A dieta hiperlipídica, rica em ácidos graxos saturados, associada ao sedentarismo, é um dos fatores responsáveis pelo desequilíbrio energético e ganho de peso, levando a hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo branco. O aumento expressivo desse tecido, por sua vez, causa distúrbios metabólicos, como dislipidemias, resistência à insulina, inflamação crônica de baixo grau, estresse oxidativo, entre outras desordens metabólicas (ALI et al., 2013; MASI et al., 2012; WANG et al., 2013).

Dentre as alterações metabólicas encontradas na obesidade, destaca-se o acúmulo de lipídios no tecido hepático. Três fatores correlacionam-se com essa condição, a saber: aumento de ácidos graxos livres no plasma, proveniente da lipólise do tecido adiposo; lipogênese *de novo*, relacionada ao excesso de carboidratos e resistência à insulina e ácidos graxos livres provenientes da dieta. A associação desses fatores de forma crônica pode resultar na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), conhecida como esteatose hepática, tornando o fígado um tecido acometido pela obesidade (NI et al., 2019; POLYZOS; KOUNTOURAS; MANTZOROS, 2017).

As estratégias utilizadas para controlar e prevenir a obesidade e algumas alterações, tal como a esteatose hepática, consistem em modificações no padrão alimentar, aumento da atividade física, e em casos específicos, uso de medicamentos e intervenções cirúrgicas (BRAY et al., 2018; RINELLA, 2015). Por outro lado, a inserção de compostos bioativos na dieta, como os compostos fenólicos, surge como alternativa promissora, com baixo custo e menos efeitos colaterais, na redução dos riscos associados às doenças crônicas (DEL RIO et al., 2013; HASSANI; SHIRANI; HOSSEINZADEH, 2016; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que extratos ricos em compostos fenólicos atenuam o estresse oxidativo, acúmulo de lipídios intracelular, além de modular a transcrição de genes relacionados à inflamação e atenuar a disfunção mitocondrial, condições que são encontradas na obesidade (ZHANG et al., 2015; ZHONG et al., 2016; ZHOU et al., 2018). Nesse contexto,

espécies vegetais fontes desses compostos podem contribuir para a prevenção e tratamento da obesidade e suas comorbidades.

Dentre as espécies fonte de compostos fenólicos, destaca-se o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), uma erva aromática que nos últimos anos, tem sido amplamente utilizada na indústria de alimentos, sendo apreciada principalmente por suas propriedades aromatizantes, conservantes e antimicrobianas (COLICA et al., 2018; CUI et al., 2012), além de efeitos biológicos como a redução da inflamação, estresse oxidativo, resistência à insulina e melhora do perfil lipídico (AFONSO et al., 2013; BORGES et al., 2018; SILVA et al., 2011; PARK; MUN, 2013; TSAI et al., 2014).

No contexto da obesidade, estudos *in vivo* e *in vitro* avaliaram os efeitos de diferentes extratos de alecrim, bem como os principais componentes dessa erva, o carnosol e ácido carnósico (HASSANI; SHIRANI; HOSSEINZADEH, 2016). Os resultados encontrados mostram o potencial efeito dessa especiaria em reduzir ganho de peso, adipogênese, parâmetros de estresse oxidativo e inflamação, além da redução da incorporação de lipídios (GAYA et al., 2013; IBARRA et al., 2011; PARK; SUNG, 2015; ZHAO et al., 2015).

O extrato aquoso de alecrim, cujos componentes majoritários são o ácido rosmarínico e a apigenina, diferentemente dos extratos mais apolares (SILVA et al., 2015), aproxima-se de uma das formas de uso do alecrim como erva medicinal pela população, que é através do consumo de chás, seja fresco ou seco (ACHOUR et al., 2018). Assim, o estudo desse extrato pode ser útil na fitoterapia e pode ser aplicado como uma estratégia nutricional auxiliando no tratamento da obesidade e suas comorbidades, uma vez que existem fortes evidências de que a combinação de componentes bioativos pode superar o efeito dos constituintes isolados (KOWALSKA et al., 2017).

Nesse sentido, a hipótese desse estudo é que o extrato aquoso de alecrim atenua o estresse oxidativo e modula o metabolismo lipídico em cultura de células que mimetizam os tecidos alvos da obesidade, tais como tecido adiposo e fígado.

Para isso, foram utilizadas as linhagens de hepatócitos humanos HepG2, bem reconhecido como um modelo *in vitro* de DHGNA, além da linhagem de fibroblastos 3T3-L1, células de camundongos que se diferenciam em adipócitos maduros, sendo este o modelo mais utilizado para estudo da adipogênese e outras condições encontradas na obesidade (MÜLLER; STURLA, 2019; RUIZ-OJEDA et al., 2016; WANG et al., 2013).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Obesidade: definição e dados epidemiológicos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018) a obesidade pode ser definida como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta risco à saúde. Em adultos, é classificada por meio do Índice de Massa Corporal (IMC), que considera o peso de uma pessoa em quilogramas dividido pelo quadrado de sua altura, sendo os valores expressos em  $\text{kg/m}^2$ . Valores de  $\text{IMC} \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$  indicam sobrepeso, enquanto valores  $\geq 30,0 \text{ kg/m}^2$  evidenciam a obesidade em seus diferentes graus (WHO, 1995).

A prevalência de sobrepeso e obesidade vem atingindo grandes proporções em vários países, incluindo os de média e baixa renda (FERREIRA; SZWARCOWALD; DAMACENA, 2019). O número de indivíduos no mundo com excesso de peso quase dobrou desde a década de 80, de modo que quase um terço da população mundial apresenta IMC acima de  $25,0 \text{ kg/m}^2$ . A expectativa é que essa tendência permaneça nos próximos anos devido a propagação da dieta ocidental (rica em açúcares e ácidos graxos saturados) associada a um estilo de vida sedentário (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019; SONG, 2019).

Nos Estados Unidos, mais de 100 milhões dos americanos estão com sobrepeso ou obesidade, o que representa 68,5% da população adulta. Em relação à obesidade, os dados americanos de 2013 a 2014 mostram que esta afeta 35% dos homens e 40,4% das mulheres (BRAY et al., 2018). No Brasil, as estimativas de prevalência de excesso de peso e obesidade realizada pelo Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) mostraram um aumento de 13,1% e 8% na prevalência de sobrepeso e obesidade, respectivamente, no período de 2006 a 2018 (BRASIL, 2018).

Esses dados de expansão global da obesidade são preocupantes, uma vez que essa condição está ligada ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas como: diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, diversos tipos de cânceres, distúrbios osteomusculares e outros problemas que afetam a produtividade e qualidade de vida das pessoas, acarretando em altos custos com a saúde (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019; SONG, 2019).

Estima-se que os Estados Unidos tenham gastado US\$ 1.901 por indivíduo obeso no ano de 2014, e em nível nacional o valor extrapolou os US\$ 149,4 bilhões (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019). Já no Brasil, no ano de 2011, cerca de 1,86% de todas as despesas com

assistência médica de média e alta complexidade foram atribuídas à obesidade (DE OLIVEIRA; SANTOS; SILVADA, 2015).

## **2.2 Fisiopatologia da obesidade**

### **2.2.1 O tecido adiposo como um órgão dinâmico**

O tecido adiposo é o principal regulador da homeostase de ácidos graxos do organismo (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010). Em períodos de abundância energética, os ácidos graxos livres são armazenados na forma de triacilglicerol (TAG), durante o jejum prolongado são liberados na sua forma livre, isso torna o tecido adiposo o principal responsável pela reserva energética do corpo (FASSHauer; BLÜHER, 2015; FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Em mamíferos, são encontrados dois tipos de tecido adiposo: o branco (TAB) e o marrom (TAM) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; QUEIROZ et al., 2009). Apesar de ambos estarem envolvidos no balanço energético, esses tecidos se diferenciam estruturalmente e funcionalmente (MANNA; JAIN, 2015). Enquanto os adipócitos brancos têm o papel de estocar grande quantidade de triacilgliceróis em um única gotícula lipídica citoplasmática, os adipócitos marrons possuem gotículas lipídicas menores e em maior quantidade, sendo estes responsáveis pela dissipação de energia na forma de calor, processo conhecido como termogênese (HEEREN; SCHEJA, 2018; RUIZ-OJEDA et al., 2016).

No entanto, apesar de ter sua função elucidada durante muitos anos, a visão do tecido adiposo como um órgão responsável apenas pelo controle energético foi contestada no início da década de 1990. A descoberta da molécula de leptina, no ano de 1994, mudou essa compreensão e estabeleceu o tecido adiposo como um órgão não somente responsável pela homeostase energética, mas também um órgão endócrino (QUEIROZ et al., 2009; RAKOTOARIVELO et al., 2018).

Outras moléculas foram descobertas desde então, a exemplo da adiponectina em 1995, e atualmente sabe-se que o tecido adiposo é responsável pela liberação de diversas moléculas sinalizadoras conhecidas como “adipocinas”, essas moléculas regulam processos biológicos através de mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos (BOOTH et al., 2016; FASSHAUER; BLÜHER, 2015).

Além dos adipócitos, uma variedade de células encontradas no tecido adiposo, como os macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, células precursoras adiposas, células-tronco mesenquimais (MSCs) e outras, contribuem para a liberação de adipocinas por esse tecido

(FASSHauer; Blüher, 2015; RUIZ-OJEDA et al., 2016). Dentre as adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, destacam-se a leptina, adiponectina, resistina, adpsina, fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), o inibidor 1 de ativador de plasminogênio (PAI-1), as interleucinas 1 $\beta$ , 6 e 8 (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8), o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), proteína quimioatrativa de macrófagos (MCP-1/CCL2) e visfatina (FASSHauer; Blüher, 2015; GRIGORAŞ et al., 2018; QUEIROZ et al., 2009).

A leptina e a adiponectina foram as primeiras adipocinas a serem identificadas e têm sido as mais estudadas por estarem envolvidas tanto no metabolismo quanto na homeostase energética, representando papel importante no processo inflamatório associado à obesidade (CALDAS *et al.*, 2019).

A leptina tem função importante na regulação da homeostase metabólica e controle da saciedade. Essa adipocina atua no hipotálamo, onde aumenta a síntese de peptídeos anorexígenos concomitante a redução dos peptídeos orexígenos, resultando na inibição do apetite (FASSHauer; Blüher, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2009).

No entanto, apesar da massa de tecido adiposo branco estar relacionado à quantidade de leptina, o processo de obesidade parece impor uma condição de resistência à ação dessa adipocina em seu receptor, causada por alteração no seu sítio de ligação. Esse processo gera aumento nas concentrações de leptina, caracterizando um quadro de hiperleptinemia que parece estimular a produção de citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$  por células do sistema imune (BOOTH et al., 2016; OUCHI *et al.*, 2011).

A adiponectina, por outro lado, apresenta propriedades anti-inflamatórias e protetoras contra diversas disfunções metabólicas associadas à obesidade. Concentrações plasmáticas dessa adipocina estão relacionadas com o aumento da sensibilidade à insulina e expansão saudável do tecido adiposo, contudo, na obesidade, a expressão de adiponectina encontra-se reduzida (OUCHI *et al.*, 2011; STERN; RUTKOWSKI; SCHERER, 2016).

A expressão das adipocinas, como mencionado anteriormente, pode ser afetada pelo aumento do tecido adiposo. A expansão desse tecido ocorre em função do aumento no volume do adipócito (hipertrofia) em combinação com a multiplicação do número dessas células, processo denominado de hiperplasia (RUIZ-OJEDA et al., 2016).

O processo de hipertrofia do tecido adiposo está associado a alterações metabólicas típicas, como a lipogênese. Por outro lado, a hiperplasia é atribuída ao processo de diferenciação de adipócitos maduros a partir de células precursoras residentes no estroma do tecido adiposo. Esse processo é denominado adipogênese, e assim como o processo de hipertrofia, pode ocorrer durante toda a vida do indivíduo (QUEIROZ *et al.*, 2009).

O processo de diferenciação de adipócitos é complexo e resumidamente envolve quatro etapas, que são: prisão por crescimento, expansão clonal mitótica (ECM), diferenciação precoce e diferenciação terminal (MOSETI; REGASSA; KIM, 2016). Além disso, um conjunto de fatores de transcrição e proteínas chaves estão envolvidos no processo da adipogênese, tais como o receptor- $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ), a proteína de ligação de elemento regulador de esterol-1 (SREBP1) e CCAAT / proteína de ligação de intensificador- $\alpha$  (C / EBP $\alpha$ ) (PARK; SUNG, 2015; QUEIROZ et al., 2009).

Apesar do processo de diferenciação ocorrer principalmente logo após o nascimento, sabe-se que assim como na maioria das espécies, em seres humanos esse processo de diferenciação pode ocorrer durante toda a vida em resposta a um balanço energético positivo (QUEIROZ *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2005).

### 2.2.2 Repercussões metabólicas da obesidade: o fígado como um tecido alvo

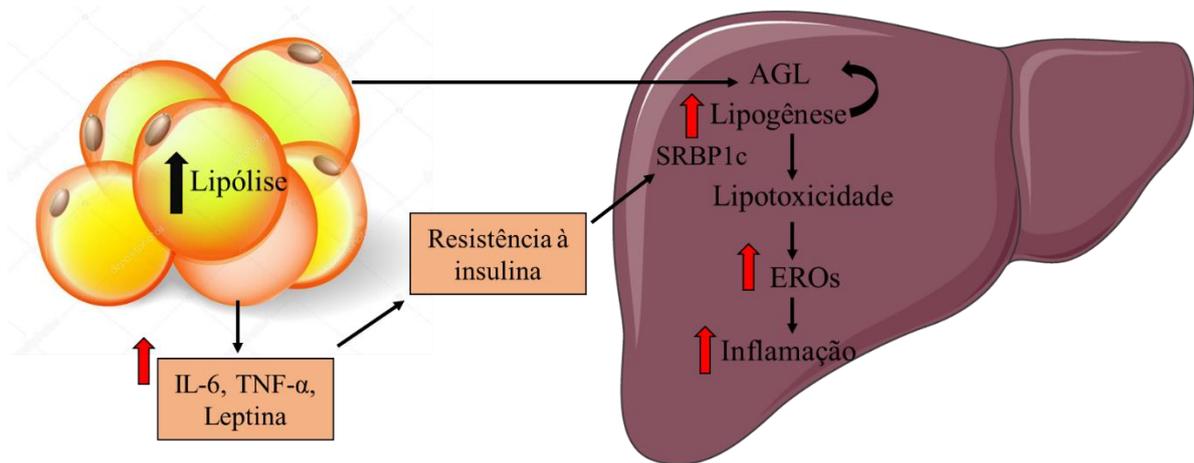
Outro aspecto relevante, no contexto da obesidade, diz respeito à incorporação de ácidos graxos nos hepatócitos. Esse processo crônico, pode levar ao desenvolvimento DHGNA, mais conhecida como esteatose hepática. Tal condição, que tem relação com a resistência à insulina e acúmulo de gordura visceral, tem sido documentada como uma das doenças mais prevalentes na população ocidental, atingindo taxas de 20 a 30%. Valores que podem ser associados aos atuais padrões alimentares desses indivíduos, ou a fatores de risco como etnia, gênero, fatores genéticos e imunológicos (SOLER et al., 2008; LISBOA; COSTA; COUTO, 2016).

O DHGNA está fortemente ligado à obesidade, apresentando uma prevalência de aproximadamente 80% em pacientes obesos e apenas 16% em indivíduos com IMC normal e sem fatores de risco metabólico. Essa relação surge de um desequilíbrio metabólico, onde os ácidos graxos derivados da dieta e do tecido adiposo são captados pelo fígado, o que pode prejudicar a via da sinalização da insulina nesse tecido (MILIĆ; LULIĆ; ŠTIMAC, 2014).

O quadro de resistência à insulina, aumenta a expressão da proteína 1c de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1c), o principal regulador da lipogênese, e reduz a  $\beta$ -oxidação, promovendo ainda mais o acúmulo de lipídios hepáticos (ZHANG et al., 2018).

Além disso, atuais evidências indicam que mudanças na estrutura e funcionalidade das mitocôndrias exercem papel crucial no desenvolvimento da esteatose hepática. Essas alterações levam a uma diminuição nos níveis de adenosina trifosfato (ATP), escape de ERO e aumento

da deposição de gordura (TER HORST; SERLIE, 2017). A figura 1 mostra resumidamente essa interligação entre tecido adiposo e fígado.



**Figura 1.** Integração entre tecido adiposo e fígado durante a obesidade. Adaptado de Zhang et al., 2018.

### 2.2.3 Papel do estresse oxidativo na obesidade: vias de sinalização

O estresse oxidativo, uma condição relevante na patogênese de várias doenças, é classicamente definido como um desequilíbrio no estado redox, onde há um aumento nas espécies reativas ao passo em que as defesas antioxidantes são reduzidas. Em síntese, é caracterizado como qualquer distúrbio no estado redox que pode gerar alterações em biomoléculas e levar à expressão alterada de genes envolvidos desde a proliferação até o processo de morte celular (HALLIWELL, 2011; JONES, 2006).

Para manter a homeostase redox, um sistema de defesa antioxidante endógena enzimática, formada por enzimas como catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD) e glutaciona peroxidase (GSH-Px) e a não enzimática, como a glutaciona (GSH), atuam sistematicamente (LI et al., 2015). Contudo, no contexto da obesidade e suas alterações metabólicas, a atividade dessas proteínas está reduzida, o que leva ao aumento dos níveis de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (PETTINEL; OBREGÓN; VIDELA, 2011).

Estudos demonstraram que a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) na obesidade pode levar à disfunção mitocondrial nos adipócitos, resultando no maior acúmulo de TAG e redução concomitante do gasto energético, bem como o aumento do processo de

adipogênese, que também está relacionado ao aumento do tecido adiposo (LEE et al., 2009; WANG; HAI, 2015).

A produção de ERO parece ser crucial para a ECM durante o processo de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros (LEE et al., 2009). Além disso, o estresse oxidativo pode levar à ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Uma vez acionadas, essas proteínas ativam o fator de transcrição PPAR $\gamma$ , essencial para dar sequência ao processo de adipogênese (CHOI et al., 2016).

O processo de hipertrofia do tecido adiposo também relaciona-se com o aumento do estresse oxidativo, uma vez que esse processo pode levar à hipóxia nos adipócitos, gerando uma necrose dessas células e acarretando em um processo de fagocitose que aumenta a inflamação e estresse oxidativo em função da liberação de óxido nítrico (NO) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (FRANCISQUETI et al., 2017; NETZER et al., 2015). Uma vez liberado, o NO regula o balanço redox intracelular, visto que essa molécula tem a capacidade de reagir com o ânion superóxido (O<sup>2•-</sup>) formando um oxidante celular, o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (MORAES; ROGERO; SOUZA, 2011).

Sabe-se que o estresse oxidativo vem sempre acompanhado do processo inflamatório, ou vice-versa, haja vista que estas são condições indissociáveis em diversas doenças (CALDAS et al., 2019). Assim, além de aumentar os marcadores de estresse oxidativo, o acúmulo excessivo de lipídios no tecido adiposo, leva a produção alterada de adipocinas, incluindo adiponectina e leptina, PAI-1, IL-6 e MCP-1/CCL2 (FURUKAWA et al., 2004).

A disfunção metabólica nos adipócitos leva ao aumento na síntese de citocinas e quimiocinas por essas células. Esse processo é intensificado, posteriormente, por células do sistema imune, como os macrófagos residentes no tecido adiposo (ENGIN; ENGIN, 2017). Essa condição leva a um quadro de inflamação crônica e de baixo grau com liberação de mediadores inflamatórios, tais como o TNF- $\alpha$  e IL-6 que contribuem para a resistência à insulina (MANNA; JAIN, 2015; ROGERO; CALDER, 2018).

A depender do estímulo, os macrófagos no tecido adiposo se diferenciam em macrófagos tipo M1 e M2. Enquanto o fenótipo M2 está relacionado a mecanismos anti-inflamatórios através da secreção de citocinas como IL-4 e IL-10, o fenótipo M1 é resultado da exposição à interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e/ou ligantes dos receptores do tipo Toll-like receptors (TLR) e secreta citocinas pró-inflamatórias como IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1/CCL2 (CALDAS et al., 2019).

Os receptores TLR fazem parte de uma grande família de receptores transmembrana que estão envolvidos com a resposta imunológica. Dentre os 10 já identificados, o TLR-4 tem sido destaque por estar envolvido na amplificação da resposta inflamatória em células do sistema

imunes inatas, incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas, bem como em outros tipos de células, como enterócitos, hepatócitos e adipócitos (POULAIN-GODEFROY et al., 2010; ROGERO; CALDER, 2018).

O TLR-4 é sensível ao lipopolissacarídeo (LPS), encontrado na membrana de bactérias gram-negativas, e mais recentemente foi descoberto que alguns nutrientes, como os ácidos graxos saturados, tal como o ácido palmítico, também podem se ligar a esse receptor. Isso implica dizer que a ingestão elevada de gorduras, bem como o aumento de ácidos graxos livres circulantes, podem ativar esses receptores, mesmo na ausência de patógenos (HUANG et al., 2012; POULAIN-GODEFROY et al., 2010).

Uma vez que o ácido graxo saturado ou o LPS se liga à ao TLR-4, uma cascata de reações acontecem de modo a ativar a via de sinalização do fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), um fator de transcrição que uma vez desligado do seu inibidor (I $\kappa$ B) no citoplasma, migra para o núcleo e modula a expressão de genes capazes de codificar enzimas e citocinas com ação pró-inflamatória, como IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e as enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a ciclooxigenase 2 (COX-2), contribuindo assim para o quadro de inflamação sistêmica observado na obesidade (ROGERO; CALDER, 2018).

### **2.3 Polifenóis e sua atuação no estresse oxidativo associado à obesidade**

Os polifenóis ou compostos fenólicos são metabólitos secundários encontrados em uma enorme variedade de alimentos de origem vegetal, como frutas, hortaliças e cereais. Estruturalmente possuem um anel aromático com uma ou mais grupos hidroxilas e podem variar de moléculas simples a polímeros de alto peso molecular. São classificados em diferentes grandes classes: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e taninos (DEL RIO et al., 2013; HASSIMOTO; LAJOLO, 2017).

Os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante e podem atuar de forma direta na eliminação de ERO e radicais livres, ou indireta, ativando vias endógenas de defesa antioxidante, como a via Nrf2 (CARDOZO et al., 2013). A via Keap1-Nrf2-ARE consiste em um sistema regulador que desempenha papel fundamental na manutenção da homeostase celular sob condições de estresse oxidativo (MOHAN; GUPTA, 2018).

Em condições basais, o fator de transcrição fator 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) permanece inativado no citoplasma ligado à proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch (Keap1), que detecta a presença de espécies reativas de oxigênio e eletrófilos. O Keap1 também está

ligado à culina 3 (Cul3), formando um complexo Nrf2-Keap1-Cul3 que sofre constante ubiquitinação e subsequente degradação no proteossoma (REINISALO et al., 2015).

Uma vez alterado o estado redox, o fator de transcrição Nrf2 se dissocia do complexo Nrf2-Keap1-Cul3 e transloca-se para o núcleo, formando um heterodímero com a pequena proteína Maf (sMaf), que parece ser essencial para a ligação subsequente à resposta antioxidante elemento (ARE), culminando na expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes da fase II (MAGESH, CHEN, HU; 2012).

Mecanismos envolvidos na resposta anti-inflamatória também podem estar relacionados à redução do estresse oxidativo, uma vez que são processos coexistentes. No que concerne à resposta anti-inflamatória, os polifenóis parecem regular a via de sinalização do fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), ativada pelo receptor TLR-4 e por citocinas inflamatórias. Essa regulação ocorre através da inibição de proteína quinases ativada por mitógenos (MAPK), cuja ativação está aumentada na presença da resistência à insulina. (HASSIMOTO & LAJOLO, 2017).

### 2.3.1 *Rosmarinus officinalis* L. e suas propriedades biológicas: relevância para a saúde

A espécie *Rosmarinus officinalis* L., conhecida como alecrim, alecrim-do-reino, alecrim-do-sul ou alecrim-verdadeiro, é uma erva pertencente à família Lamiaceae (Labiatae), a qual engloba cerca de 3500 espécies nativas da região do mediterrâneo (CARDOSO et al., 2005; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007), mas que podem ser encontradas em regiões com clima temperado, tais como Portugal e Austrália (LORENZI & MATOS, 2006). É formada por flores pequenas e azuladas, e toda a planta emite cheiro forte e agradável (Figura 2) (HASSANI; SHIRANI; HOSSEINZADEH, 2016).



**Figura 2.** Folha de Alecrim

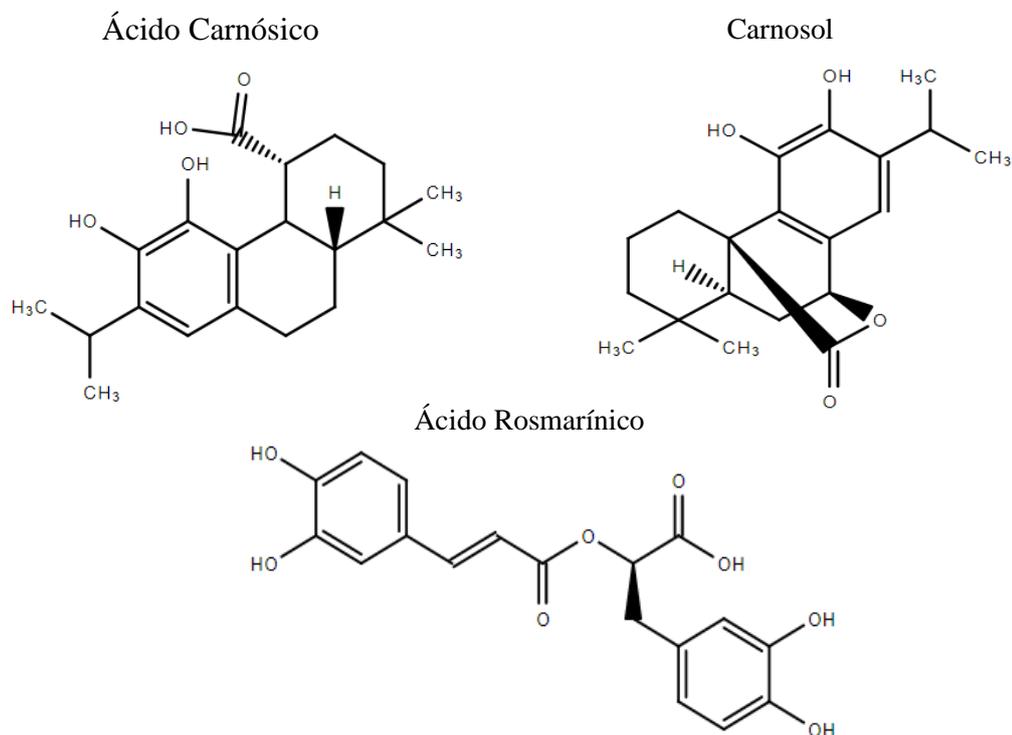
Fonte: próprio autor

O uso das ervas e especiarias, além de contribuir para redução do consumo de sal, por conferir aroma e sabor aos alimentos, têm sido utilizadas na conservação de alimentos e no tratamento de enfermidades, proporcionando benefícios à saúde (EMBUSCADO, 2015). O

uso de ervas e especiarias para fins medicinais é considerada uma prática milenar, e nos últimos anos, o progresso técnico e científico, que vêm identificando novas moléculas e seus respectivos mecanismo de ação, tem contribuído para que muitas espécies vegetais sejam utilizadas no tratamento de doenças (COLALTO, 2018).

No Brasil, por exemplo, o Sistema Único de Saúde (SUS) já fornece para a população 12 medicamentos fitoterápicos para uso ginecológico, tratamento de queimaduras, auxiliares terapêuticos de gastrite e úlcera, além de medicamentos com indicação para artrite e osteoartrite. Essa ação integra um dos objetivos da Política e do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2016). Assim, é válido o estudo de plantas medicinais que possam auxiliar no tratamento de diversas doenças, dentre elas a obesidade.

As propriedades biológicas dessas plantas medicinais, que vem sendo cada vez mais exploradas na ciência, deve-se principalmente à presença de fitoquímicos com atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, entre outras (GOTTARDI et al., 2016). O alecrim é rico em fitoquímicos, nos quais destacam-se os compostos fenólicos, sendo encontrados nos extratos três grupos principais: diterpenos, flavonóides e ácidos fenólicos, tais como o ácido carnósico, carnosol e ácido rosmarínico (BORRÁS-LINARES et al., 2014) (Figura 3).



**Figura 3.** Estrutura de alguns polifenóis encontrados em extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.).

A presença de compostos fenólicos no alecrim é responsável por suas atividades biológicas. Na literatura há dados sobre o efeito do alecrim nos distúrbios encontrados na síndrome metabólica, condição que envolve alterações metabólicas importantes e de relevância nas doenças crônicas. Dentre as mais estudadas, estão as alterações no metabolismo dos carboidratos (HASSANI; SHIRANI; HOSSEINZADEH, 2016).

Jayanthi e Subramanian (2014) avaliaram o efeito do ácido rosmarínico (100mg/kg), um dos fenólicos presentes no alecrim, em um modelo animal de ratos diabéticos induzido por estreptozotocina (STZ). Os resultados encontrados foram a redução da glicemia, glicosúria e níveis de hemoglobina glicada, tais efeitos foram associados a modulação da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos como a hexoquinase, piruvato quinase, glicose-6-fosfatase e 1,6-bifosfatase pelo ácido rosmarínico.

Silva e colaboradores (2011) reportaram efeito do extrato aquoso do alecrim (EAA) em ratos diabéticos induzido por estreptozotocina. O EAA na concentração de 50mg/kg reduziu o percentual de hemoglobina glicada e aumentou a atividade das enzimas catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e superóxido desmutase (SOD), o que indica um potencial antioxidante do alecrim. Tais efeitos foram atribuídos à presença dos compostos fenólicos presentes no extrato.

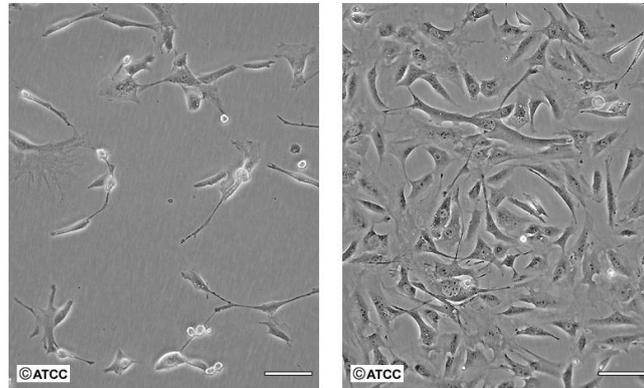
#### **2.4 Métodos *in vitro* para estudo da adipogênese e DHGNA**

Diversas limitações dificultam o estudo da adipogênese *in vivo*. Dentre elas, a quantidade e fonte do material, a dificuldade em diferenciar adipoblastos (células comprometidas com a linhagem adipocitária) de fibroblastos, e a obtenção de adipoblastos em estágios de desenvolvimento semelhantes (OLIVEIRA, 2005).

Por essa razão, nos últimos anos, diferentes modelos e protocolos de cultura celular tornaram-se disponíveis para estudar a biologia dos adipócitos. Dentre eles, estudos com células isoladas de camundongos, como: 3T3-F442A, OP9, C3H10T1/2, 3T3-L1, entre outros. Contudo, o estudo com a linhagem secundária 3T3-L1 tem sido o mais bem caracterizado para estudo da adipogênese *ex vivo*. Uma revisão que avaliou estudos com adipogênese, encontraram que quase um terço dos artigos publicados entre 2011 e 2016 descreveram o uso de células 3T3-L1 no estudo da adipogênese e características relacionadas à obesidade (KURI-HARCUCH et al., 2019; RUIZ-OJEDA et al., 2016).

A Linhagem 3T3-L1 é proveniente do tecido embrionário de camundongos *Swiss* (17-19 dias), essas células apresentam morfologia semelhante a fibroblastos (Figura 4) e sob

condições adequadas se diferenciam em adipócitos. Dentre as vantagens para o uso dessa linhagem, estão o baixo custo, homogeneidade em termos de população de células e tolerância a um alto número de passagens (QUEIROZ et al., 2009; RUIZ-OJEDA et al., 2016).



**Figura 4.** Fibroblastos 3T3-L1.

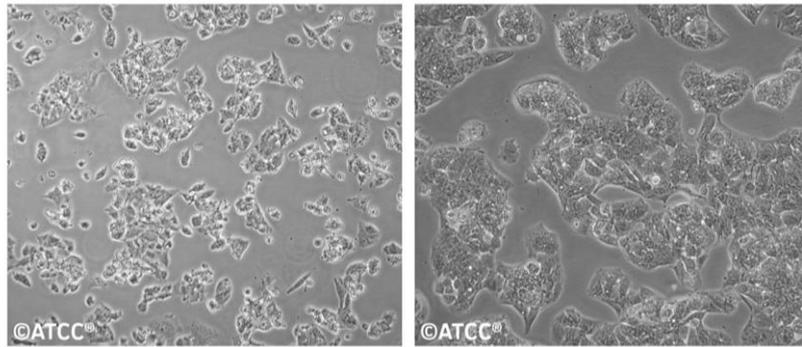
Fonte: ATCC

As condições para que células 3T3-L1 se diferenciem em adipócitos, envolve o uso de um coquetel de diferenciação, que inclui: Insulina, dexametasona (DEXA) e isobutil-1-metilxantina (IBMX). A exposição de uma placa confluenta de pré-adipócitos 3T3-L1 a esse coquetel ativa receptores de glicocorticoides (pela DEXA), receptor de IGF-1 (pela insulina), e a via de sinalização da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), pelo IBMX, que é um inibidor de enzimas fosfodiesterases que leva ao aumento nos níveis de AMPc. Essas condições induzidas pelo coquetel de diferenciação culminam na expressão de proteínas que dão início ao processo de diferenciação celular que pode chegar a duas semanas para ser concluído (QUEIROZ *et al.*, 2009; RUIZ-OJEDA et al., 2016; WANG; HAI, 2015).

Já para o estudo *in vitro* da DHGNA, uma das condições associadas à obesidade, destaca-se o uso da cultura de hepatócitos humanos HepG2 (Figura 5). Trata-se de uma linhagem derivada de um carcinoma hepatocelular que tem sido amplamente explorada para examinar compostos que podem atenuar a esteatose hepática e resistência à insulina, além de explorar propriedades citoprotetoras, antioxidantes, hepatoprotetoras e hipocolesterolêmica de espécies vegetais e constituintes bioativos (KAUR et al., 2018).

Para simular a condição de esteatose em cultura de hepatócitos HepG2, os estudos têm utilizado a exposição dessas células ao ácido palmítico, um ácido graxo saturado de alto grau comumente utilizado para estabelecer modelos lipotóxicos *in vitro* e *in vivo* (LU et al., 2019). A exposição de células HepG2 à ácidos graxos livres, tal como o ácido palmítico, apresentam um aumento dependente da dose na acumulação lipídica com uma produção elevada de TNF- $\alpha$  (MÜLLER; STURLA, 2019).

Assim, as células HepG2 fornecem uma excelente ferramenta a serem empregadas em modelos de estresse oxidativo, haja vista que essas células preservam funções endógenas e expressão de diversas substâncias antioxidantes, sendo possível avaliar os mecanismos pelos quais os compostos bioativos atenuam o estresse oxidativo (KAUR et al., 2018).



**Figura 5.** Células HepG2

Fonte: ATCC

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral:

Avaliar o efeito do extrato aquoso do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) no controle das alterações do metabolismo lipídico e estresse oxidativo em cultura de hepatócitos e adipócitos.

#### 3.2 Específicos:

- Identificar e quantificar os compostos presentes no extrato aquoso de alecrim;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* da amostra;
- Avaliar o efeito do extrato aquoso de alecrim sobre a viabilidade de hepatócitos (HepG2) e pré-adipócitos (3T3-L1);
- Avaliar o efeito antioxidante do extrato aquoso de alecrim em cultura de hepatócitos (HepG2) sob condição hiperlipídica;
- Avaliar o efeito do extrato aquoso de alecrim na incorporação de ácidos graxos em cultura de hepatócitos (HepG2) sob condição hiperlipídica.
- Avaliar o efeito antiadipogênico e antioxidante do extrato aquoso de alecrim em cultura de células 3T3-L1 diferenciadas em adipócitos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do extrato aquoso de alecrim

As folhas desidratadas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) foram obtidas de uma mesma marca comercial (lote: 19BRRPP03 3). Estas passaram por processo de desintegração em moinho analítico (modelo IKA A11 basic, Wilmington, USA) antes do preparo do extrato. Para aquisição do EAA adicionaram-se 350 mL de água destilada a 60,0373g de folhas de alecrim trituradas. A solução foi homogeneizada com auxílio de agitador magnético durante 24 horas a temperatura ambiente. Após essa etapa, a mistura foi centrifugada a 15.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em bomba à vácuo. O volume filtrado foi liofilizado e mantido em frascos âmbar em freezer à -20°C.

### 4.2 Identificação e quantificação dos componentes do extrato aquoso de alecrim:

#### 4.2.1 Determinação de fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais do EAA foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Swain e Hillis (1959) com adaptações para microplacas. Foram pipetados 12,5µL da amostra junto a 200µL de água destilada com posterior agitação. Em seguida, foram adicionados 12,5µL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, adicionou-se 25 µL de solução saturada de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e a mistura foi agitada novamente. O controle negativo foi constituído da adição de todos os reagentes, com exceção da amostra, que foi substituída por 12,5µL de água, condicionados aos mesmos processos experimentais.

Após repouso de 1 hora ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, as absorvâncias foram mensuradas em um leitor de microplacas (Sinergy Mx, Biotek, EUA) a 720 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), determinados por uma curva (12,5 a 200 µg/mL) realizada nas mesmas condições.

#### 4.2.2 Determinação de flavonoides totais

A determinação de flavonoides foi realizada segundo a metodologia descrita por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999) com adaptações para microplacas. Na placa foram

pipetados 25µL da amostra com 100µL de água destilada e 7,5µL de NaNO<sub>2</sub> (5%), após 6 minutos, foram pipetados 7,5µL AlCl<sub>3</sub> (10%) e após mais 6 minutos foram pipetados 100µL de NaOH (4%) e 10µL de água destilada. O mesmo procedimento experimental foi realizado com água destilada, sendo utilizada como controle negativo em substituição a amostra. Após 15 minutos foi realizada a leitura em leitor de placas (Sinergy Mx, Biotek, EUA) na absorvância de 510 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de catequina (ECQ) numa curva de 12,5-200µg/mL.

#### 4.2.3 Cromatografia

Inicialmente, os principais flavonoides e ácidos fenólicos foram separados, identificados e quantificados de acordo com Arabbi, Genovese e Lajolo (2004) através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa em um sistema Hewlett-Packard 1100 equipado com um amostrador automático e uma bomba quaternária acoplada a um detector de matriz de diodos controlado com o software Chemstation.

A coluna utilizada foi uma C18 de fase reversa Prodigy ODS3 (250 × 4,6 mm, 5µm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA) e os solventes de eluição foram A: água; tetra-hidrofurano: ácido trifluoroacético (98: 2: 0,1) e B: acetonitrila. O gradiente de solvente estava na proporção de 17% B por 2 minutos, aumentando para 25% B após 5 minutos, para 35% B após mais 8 minutos e para 50% B após 5 minutos.

A calibração foi realizada injetando os padrões três vezes em cinco concentrações diferentes ( $R^2 > 0,999$ ). A identificação do pico foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e das características espectrais da matriz de diodos com os padrões e os espectros da biblioteca.

### 4.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato aquoso de alecrim

#### 4.3.1 Preparo das doses de EAA

Para a análise antioxidante *in vitro*, 10mg do EAA foi reconstituído em 10ml de água destilada gerando uma solução estoque de 1mg/mL. A partir da solução estoque, foram preparadas diluições seriadas que variaram de 5µg/mL a 100µg/mL.

#### 4.3.2 Atividade antioxidante *in vitro* do EAA pelo método de varredura do radical DPPH•

Para confirmar a atividade antioxidante do EAA, já documentada na literatura (DORMAN et al., 2003; SILVA et al., 2011). A metodologia empregada foi adaptada de Brand-Williams, Cuvelier e Brest (1995). Frações de 50µL de amostra dos extratos nas concentrações de 5, 10, 40, 80 e 100µg/mL foram adicionadas a 150µL de solução metanólica de DPPH• (0,06 M). Os testes foram acompanhados por um controle sem antioxidante e um padrão, contendo 50µL de água destilada e 50µL de trolox (100µg/mL), respectivamente. A redução do radical DPPH• foi medida a 515 nm em leitor de placas (Sinergy Mx, Biotek) após 30 minutos de repouso em ambiente escuro. Foram realizados três ensaios independentes. A redução nos valores de absorbância das amostras foi correlacionada com a do controle e foi estabelecido o percentual de varredura do radical DPPH• expresso pela equação:

$$\% \text{ de varredura} = [(\text{Abscontrole} - \text{Absamostra}) / \text{Abscontrole}] \times 100$$

### 4.4 Cultura de células

#### 4.4.1 Preparo do tratamento com extrato aquoso de alecrim para cultura de células

Para os ensaios em cultura de células foi preparada uma solução estoque de EAA (60 mg/mL) em dimetilsulfóxido (DMSO). Essa solução foi previamente filtrada com auxílio de seringa sob pressão por um filtro de 22 µM que impede a passagem de partículas grandes e de microrganismos. A partir dessa solução foram preparadas diluições seriadas (5, 10, 50, 100, 500, 1500 e 2000 µg/mL) de modo que a maior concentração do EAA não ultrapassou o valor de 3,3% de DMSO (v/v).

#### 4.4.2 Cultivo Celular

As células HepG2 (Espécie: *Homo Sapiens*; Tecido: fígado; Tipo de célula: Epitelial) e 3T3-L1 (Espécie: *Mus musculus*; Tecido: embionário; Tipo de célula: Fibroblasto) foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro e todo o manejo celular seguiu as recomendações da ATCC (American Type Culture Collection).

As células foram cultivadas em meio DMEM (Vitrocell) com alta concentração de glicose (4,5 g/L), com antibióticos e suplementado com 10 % de soro fetal bovino. O cultivo celular foi realizado em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> com filtro. A troca de meio era realizada a cada 48

horas, e as células eram mantidas em estufa sob temperatura de 37 °C, atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e 90 % de umidade relativa.

O subcultivo era realizado quando a cultura atingia, no mínimo, 80% de confluência, cerca de 2 a 4 dias após o cultivo. O meio de cultivo era cuidadosamente aspirado e descartado, e as células aderidas à parede da garrafa eram isoladas com 5 mL de solução de Tripsina (0,025% tripsina e 0,01% EDTA diluídos em PBS) e incubadas a 37 °C por 5 minutos. Logo após, era adicionado 10 mL de meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) (10%) e as células eram colocadas em tubo falcon para serem centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos. Após esse período, o meio era cuidadosamente retirado e as células eram ressuspensas em meio DMEM suplementado com SFB (10%) e redistribuídas na proporção 1:4 em novas garrafas.

O número de passagens das células HepG2 variou de 99p. a 104p., enquanto as células 3T3-L1 variou de 9p. a 12p. Vale ressaltar que para realização dos experimentos as células não ultrapassaram 2 passagens, já considerando o descongelamento.

## **4.5 Células HepG2**

### **4.5.1 Preparo da solução de ácido palmítico**

Para obter uma solução de ácido palmítico (0,2 mM) pesou-se 1mg de ácido palmítico (Sigma-Aldrich, ≥99%) e diluiu-se em 20mL de DMEM livre de soro. A solução foi filtrada em filtros de 22 µm e estocada em tubo falcom a -20°C para posteriores análises. A dose de ácido palmítico utilizada foi baseada em estudos anteriores, onde a dose de ácido palmítico não alterou a viabilidade de células HepG2 (AHN et al., 2018; IZDEBSKA et al., 2017),

### **4.5.2. Viabilidade celular**

O teste colorimétrico com MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] foi usado para determinar a viabilidade das células. Esse método avalia a capacidade da célula em reduzir o MTT por meio da atividade metabólica mitocondrial, observada apenas em células que estão viáveis (CARMICHAEL et al., 1985). Foi avaliado o percentual de sobrevivência celular após a exposição celular ao EAA na presença ou ausência do ácido palmítico. Após o cultivo celular e contagem em contador automático (modelo TC20, Bio-Rad, EUA), as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de  $2 \times 10^5$  com DMEM sem soro e incubadas por 24 horas a 37°C.

Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado 100µL de EAA diluído em DMEM (50-1500µg/mL) na presença ou ausência do ácido palmítico (0,2mM). O mesmo procedimento foi realizado com o solvente DMSO (nas mesmas concentrações e sem a presença do extrato). As placas foram novamente incubadas por 24 horas, e após esse período, o sobrenadante foi retirado e adicionados 100 µL da solução MTT (0,5 mg/mL diluída em DMEM sem soro). Foi utilizado um controle contendo apenas as células e meio de cultura.

Após duas horas de incubação, o meio foi retirado e foram adicionados 100 µL de DMSO (Sigma-Aldrich, ≥99,5%) para dissolver os cristais formados. A microplaca foi levada ao leitor de placas (modelo: Sinergy H1, Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA), e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 570 nm. Foram realizados quatro ensaios independentes em duplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de sobrevivência relativa das células ao grupo controle sem tratamento.

#### 4.5.3 Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

A medida das ERO intracelulares foi realizada utilizando um probe fluorescente, DCFH-DA (2',7'-Diclorofluoresceína diacetato) (WANG; JOSEPH, 1999). As células HepG2 foram cultivadas em placas de 96 poços (7x10<sup>3</sup>) em diferentes concentrações do EAA (5 a 500µg/mL) na ausência ou presença de ácido palmítico (0,02 mM). As células foram submetidas à incubação por 24 horas. Depois do período de incubação, o meio foi descartado e as células foram cuidadosamente lavadas duas vezes com PBS. Então, foram adicionados 100 µL do probe DCFH-DA (40 µM) dissolvido em PBS e após 60 minutos de incubação a 37°C a intensidade da fluorescência foi mensurada na excitação de 485 nm e emissão 535 nm. Foram realizados três ensaios independentes em duplicata e os resultados foram expressos em percentual de ERO intracelular em relação ao controle.

#### 4.5.4 Coloração dos corpúsculos lipídicos por Oil Red

O ensaio foi realizado conforme descrito por Huang e colaboradores (2018). As células foram cultivadas em placas de 6 poços com 4x10<sup>5</sup> células/mL com diferentes concentrações de EAA (5 - 50 µg/mL) por 24 horas. Em seguida, as células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e fixadas com 4 % de formalina por 40 minutos. Então, o corante Oil-Red-O (Sigma-Aldrich) (5 mg/mL em isopropanol:água, 2:1) foi adicionado diretamente às células fixadas e incubadas por uma hora. A fluorescência foi medida em um leitor de placas (modelo:

Sinergy H1, Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) em um comprimento de onda de excitação e de emissão de 510 nm. Foram realizados três ensaios independentes em duplicata e os resultados foram expressos em valores de absorbância.

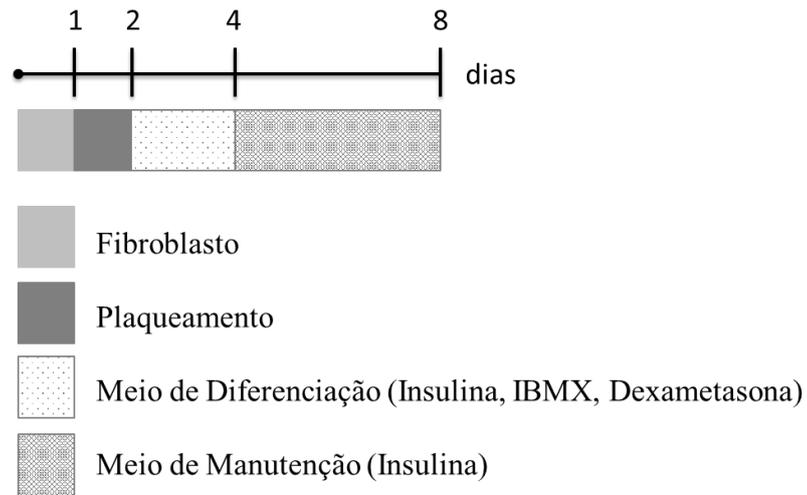
## **4.6 Células 3T3-L1**

### **4.6.1 Viabilidade Celular**

O mesmo ensaio com MTT foi utilizado para determinar a viabilidade dos fibroblastos 3T3-L1. No entanto, foi avaliado o percentual de sobrevivência celular após a exposição das células ao EAA e durante o período de 48 horas. Após o cultivo celular e contagem em contador automático (modelo TC20, Bio-Rad, EUA), as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de  $1 \times 10^5$  e incubadas por 24 horas a 37°C. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado 100µL de EAA diluído em DMEM sem soro (5-2000µg/mL). As placas foram novamente incubadas, dessa vez por 48 horas, e todas as etapas posteriores seguiram conforme descrito no item 4.5.1.

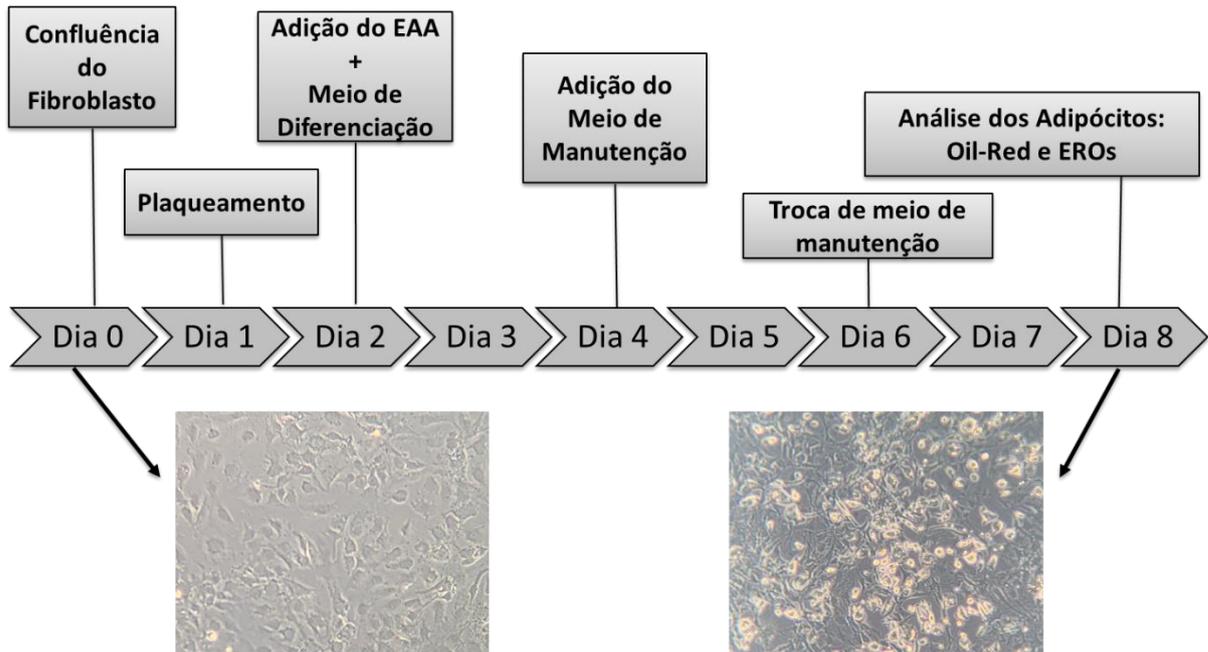
### **4.6.2 Diferenciação de fibroblastos 3T3-L1 em adipócitos**

Para a diferenciação em adipócitos, células 3T3-L1 confluentes foram plaqueadas e após a aderência (24 horas), estas foram estimuladas a se diferenciarem mediante o tratamento com meio de diferenciação composto por 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 1 µM de Dexametasona e 1,67 µM de insulina em DMEM, contendo 10% de soro fetal bovino, conforme recomendação da ATCC. Após 48 horas sob estímulo do meio de diferenciação, as células foram mantidas com meio de manutenção, contendo apenas o hormônio insulina, conforme descrito na figura 6.



**Figura 6.** Processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros mediante estímulo com Kit de diferenciação.

Para avaliar o possível efeito inibitório do EAA na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, o estímulo para diferenciação das células 3T3-L1 foi realizado na presença ou ausência do EAA, nas doses de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  durante 48 horas. Essas doses foram selecionadas após o ensaio de viabilidade celular. O efeito inibitório na diferenciação foi avaliado através de mudanças na morfologia das células que passam de células com prolongamentos citoplasmáticos e formato fusiforme, característica de fibroblastos, para células de formato esférico com presença de gotículas lipídicas. Além da determinação de Oil-Red que identifica as células com maior presença de lipídios, sugerindo maior ou menor presença de células diferenciadas (Figura 7).



**Figura 7.** Processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros mediante estímulo com Kit de diferenciação na presença ou ausência do EAA.

#### 4.6.3 Determinação de ERO

A medida das ERO intracelulares foi realizada utilizando a mesma metodologia aplicada nas células HepG2 (item 4.5.2), com algumas modificações. Após 7 dias de diferenciação, foi retirado o meio das células 3T3-L1 diferenciadas e cultivadas em placas de 96 poços ( $5 \times 10^3$ ), e em diferentes concentrações do EAA (5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ).

As células foram cuidadosamente lavadas duas vezes com PBS, e então, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do probe DCFH-DA (40  $\mu\text{M}$ ) dissolvido em PBS e após 60 minutos de incubação a 37°C a intensidade da fluorescência foi mensurada em leitor de placas (modelo: Synergy H1, Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) na excitação de 485 nm e emissão 535 nm. Os resultados foram expressos em percentual de ERO intracelular em relação ao controle.

#### 4.6.4 Coloração dos corpúsculos lipídicos por Oil Red

A determinação de lipídios intracelulares foi realizada utilizando a mesma metodologia aplicada nas células HepG2 (item 4.4.3), com algumas modificações. Após 7 dias de diferenciação, foi retirado o meio das células 3T3-L1 já diferenciadas e cultivadas em placas de 6 poços ( $3 \times 10^5$ ) nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ . Em seguida, as células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e fixadas com 4 % de formalina por 40 minutos. Então, o

corante Oil Red (Sigma-Aldrich) (5 mg/mL em isopropanol:água, 2:1) foi adicionado diretamente às células fixadas e incubadas por uma hora. A fluorescência foi medida em um leitor de placas (modelo: Sinergy H1, Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA) em um comprimento de onda de 510 nm, e foram realizados três ensaios independentes em duplicata.

#### **4.7 Análise estatística**

Para análise estatística, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) unifatorial, para verificação das diferenças entre os grupos de interesse. E em seguida, o teste de Tukey foi aplicado para observar diferenças estatísticas entre as médias, considerando um valor de  $p < 0,05$ . O software utilizado foi o GraphPad Prism 7.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise química: identificação, quantificação dos componentes do extrato aquoso de alecrim e atividade antioxidante.

#### 5.1.1 Quantificação de fenólicos e flavonoides totais:

Como etapa prévia e com o objetivo de conhecer a composição química e atividade do extrato a ser avaliado, foi realizada a identificação e quantificação dos principais compostos presentes no EAA. Os resultados encontrados no EAA para fenólicos e flavonoides totais foram de  $149,55 \pm 0,37$  mg/g e  $110,92 \pm 0,59$  mg/g de extrato seco, respectivamente (Tabela 1).

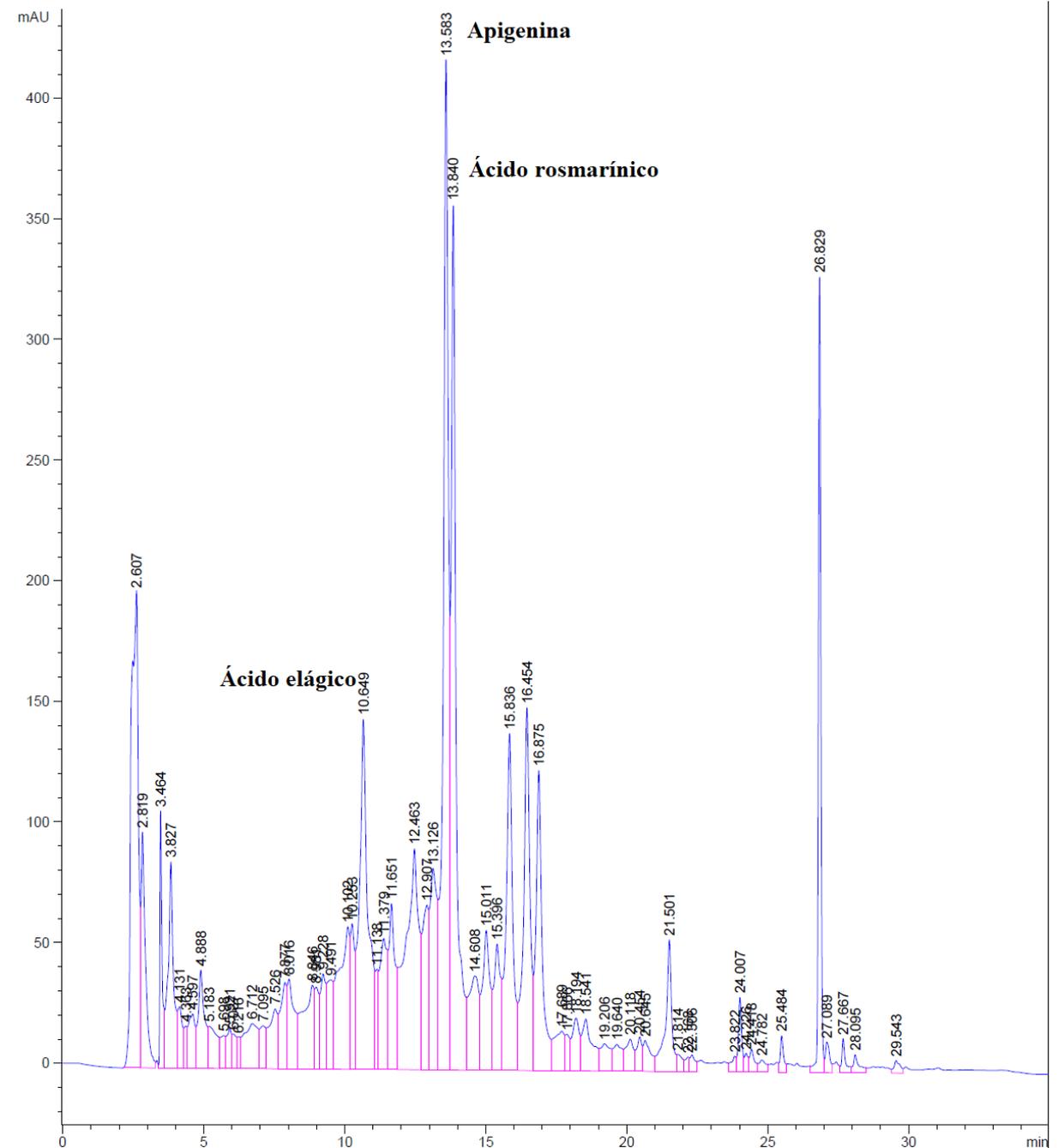
**Tabela 1.** Fenólicos totais e flavonoides EAA obtido das folhas desidratadas de alecrim.

Extrato aquoso de alecrim (EAA)	mg/g de extrato
Fenólicos totais	$149,55 \pm 0,37$
Flavonoides totais	$110,92 \pm 0,59$

Os resultados estão expressos em média de equivalentes de ácido gálico (fenólicos totais) ou equivalentes de catequina (flavonoides totais)  $\pm$  desvio padrão de três ensaios independentes.

#### 5.1.2 Cromatografia

A cromatografia realizada pela técnica de CLAE, permitiu a identificação dos principais compostos fenólicos presentes no EAA. Três componentes majoritários foram identificados, dentre eles estão: o ácido rosmarínico (RT: 13,840 min), ácido elágico (RT:10,649 min), ambos ácidos fenólicos, e o flavonoide apigenina (RT:13,583 min). Contudo, não foi possível identificar o componente em um dos picos relevantes (RT:26,829 min) emitido pela cromatografia (Figura 8).



**Figura 8.** Cromatograma do extrato aquoso de alecrim obtido pela técnica de CLAE.

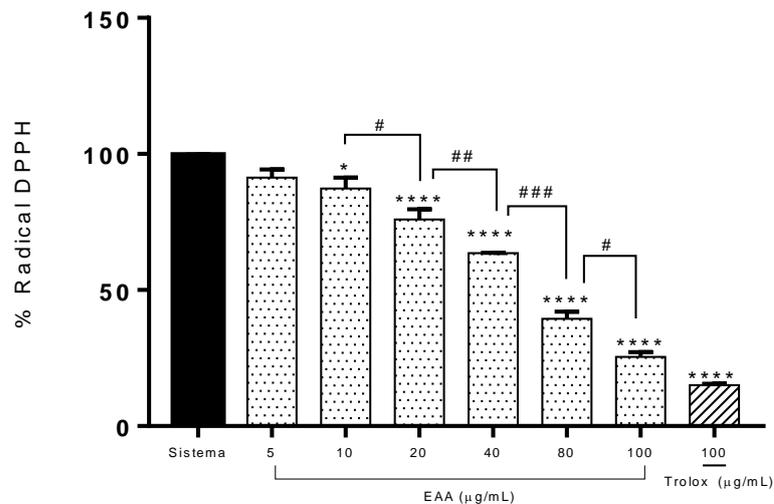
Em relação a quantificação dos componentes identificados no EAA, o ácido rosmarínico é o composto que está presente em maior quantidade no extrato (24,40 mg/g de extrato), seguido do flavonoide apigenina (8,37 mg/g de extrato) e o ácido elágico (5,07 mg/g de extrato), conforme apresentado na tabela 2.

**Tabela 2. Quantificação dos compostos fenólicos identificados no EAA**

<b>Tempo de retenção</b>	<b>Composto identificado</b>	<b>Quantidade (mg/g de extrato)</b>
10,649 min	Ácido elágico	5,07
13,583 min	Apigenina	8,37
13,840 min	Ácido rosmarínico	24,40

## **5.2 Atividade antioxidante *in vitro* do extrato aquoso de alecrim pelo método de DPPH**

No que concerne à atividade antioxidante *in vitro* do EAA avaliado pelo método de varredura do radical DPPH, observa-se que todas as doses do EAA, com exceção da dose de 5µg/mL, apresentaram atividade antioxidante quando comparado ao sistema. No entanto, o destaque é para a dose de 100µg/mL do EAA que apresentou um percentual de radical remanescente de  $25,43 \pm 1,82\%$  ( $p < 0,001$ ), o que indica um percentual de varredura do radical DPPH de 74,57%. A atividade antioxidante do EAA observada nesse estudo apresentou uma relação de dose dependência a partir da concentração de 10µg/mL. O padrão antioxidante Trolox, análogo da vitamina E, foi usado como controle positivo (Figura 9).

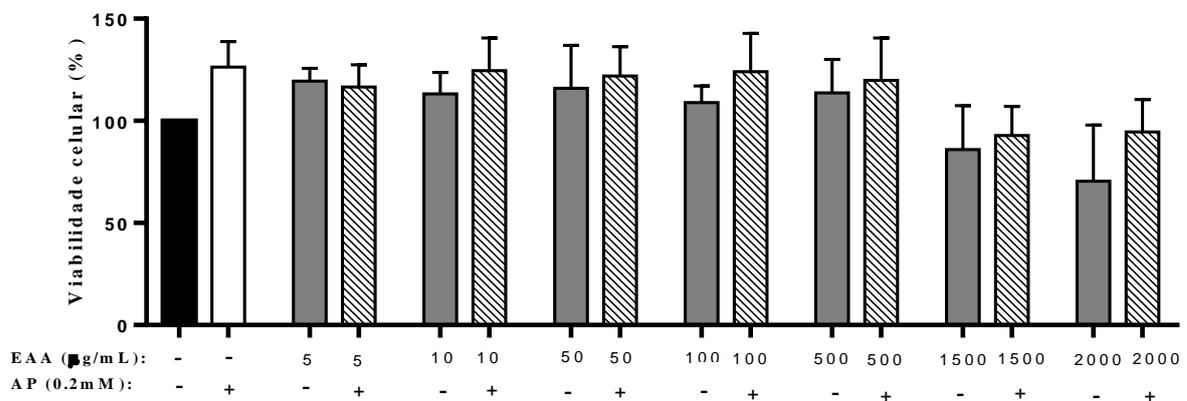


**Figura 9.** Atividade antioxidante do EAA pela captura do radical livre DPPH. EAA = Extrato aquoso de alecrim. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão dos valores de varredura in vitro de três ensaios independentes; \* $p < 0,05$  ou \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs sistema (meio reacional sem o antioxidante); # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  ou #### $p < 0,0001$  entre concentrações do EAA. ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

## 5.3 Linhagem HepG2

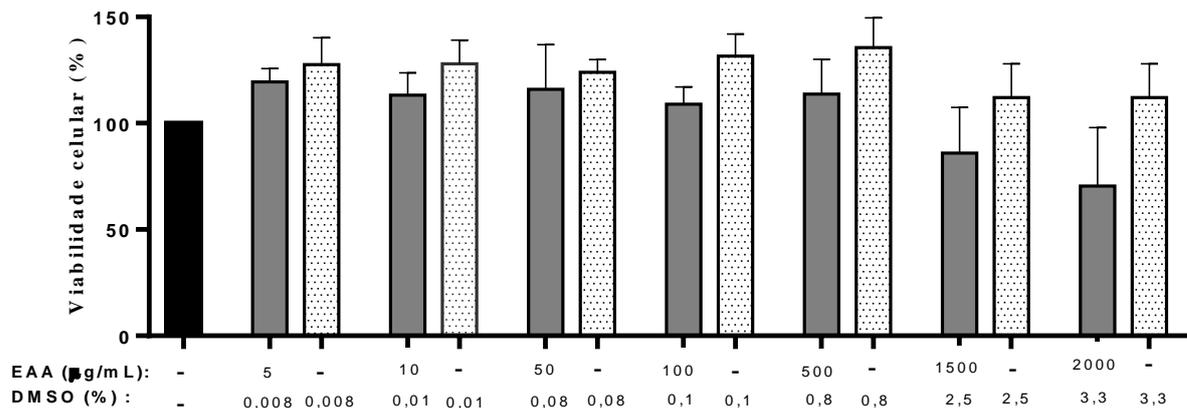
### 5.3.1 Viabilidade Celular

Para avaliar o efeito do EAA e do ácido palmítico sob a viabilidade de células HepG2, foi realizado o teste de MTT 24 horas. Observou-se que as nenhuma das concentrações do EAA (5-2000 $\mu\text{g/mL}$ ) alteraram a viabilidade celular quando comparada ao sistema, bem como a presença do ácido palmítico não alterou essa condição. (Figura 10).



**Figura 10.** Efeito do tratamento por 24 horas do EAA na ausência ou presença do ácido palmítico (AP) sob a viabilidade celular de células HepG2 avaliado pelo método de MTT. (-) = ausência; (+) = presença. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro ensaios independentes em duplicata. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

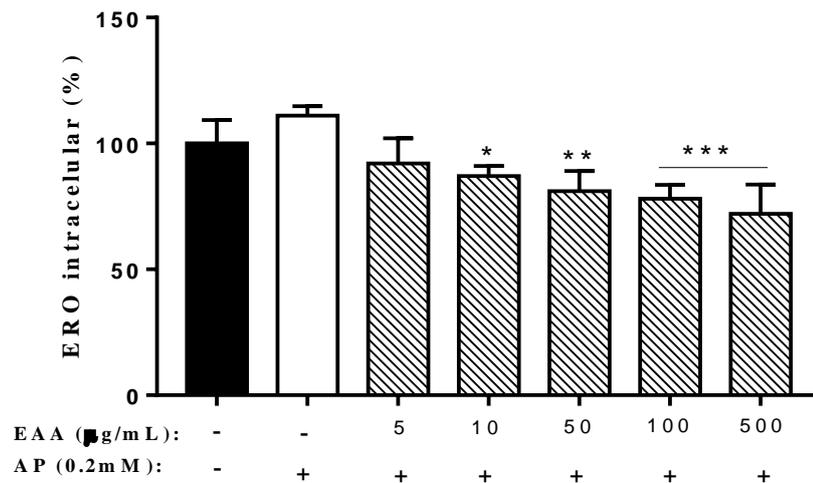
Em relação à exposição ao solvente utilizado no meio celular, foi observado que o DMSO, nas doses utilizadas nesse estudo, também não comprometeu a viabilidade celular quando comparado ao controle (Figura 11).



**Figura 11.** Efeito do tratamento por 24 horas com EAA e com o solvente DMSO nas mesmas concentrações sob a viabilidade celular de células HepG2 avaliada pelo método de MTT. (-) = ausência; (+) = presença. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro ensaios independentes em duplicata. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.2 Produção de ERO

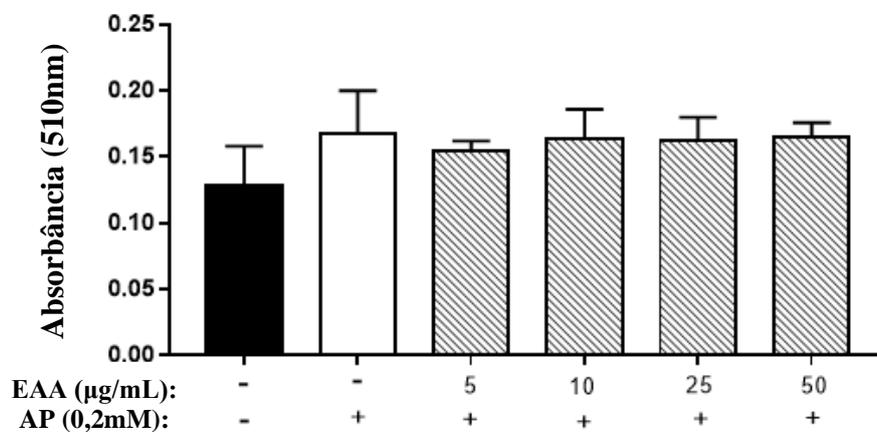
A produção de ERO em cultura de células HepG2 foi avaliada para observar o efeito do tratamento com o EAA em diferentes concentrações (5 - 500 µg/mL) sobre o estado redox intracelular, na presença ou ausência do ácido palmítico (0,2mM). De acordo com os resultados apresentados na figura 12, a produção de ERO não foi aumentada com o estímulo do ácido palmítico, quando comparado ao estado basal (controle sem ácido palmítico) ( $p > 0,05$ ). Entretanto, as células expostas ao ácido palmítico na presença do EAA, tiveram a produção de ERO reduzida nas doses de 10-500 µg/mL, quando comparado ao ácido palmítico sem o EAA (Figura 12).



**Figura 12.** Produção intracelular de ERO em células HepG2, quando expostas ao ácido palmítico (AP) e na presença ou ausência de tratamento com EAA. (-) = ausência; (+) = presença. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três ensaios independentes em duplicata. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  ou \*\*\* $p < 0,001$  vs AP. ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

### 5.3.3 Incorporação de lipídio intracelular

A avaliação do conteúdo lipídico em hepatócitos estimulados com ácido palmítico (0,2mM) foi avaliada utilizando o corante Oil-Red. O EAA foi utilizado como tratamento em quatro doses (5, 10, 25 e 50µg/mL). Contudo, nesse estudo não foi observado aumento significativo na incorporação de lipídios nas células HepG2 que receberam o ácido palmítico, como era esperado. Além disso, o tratamento com o EAA na presença do ácido palmítico também não alterou o acúmulo de lipídios nas células HepG2 (Figura 13).

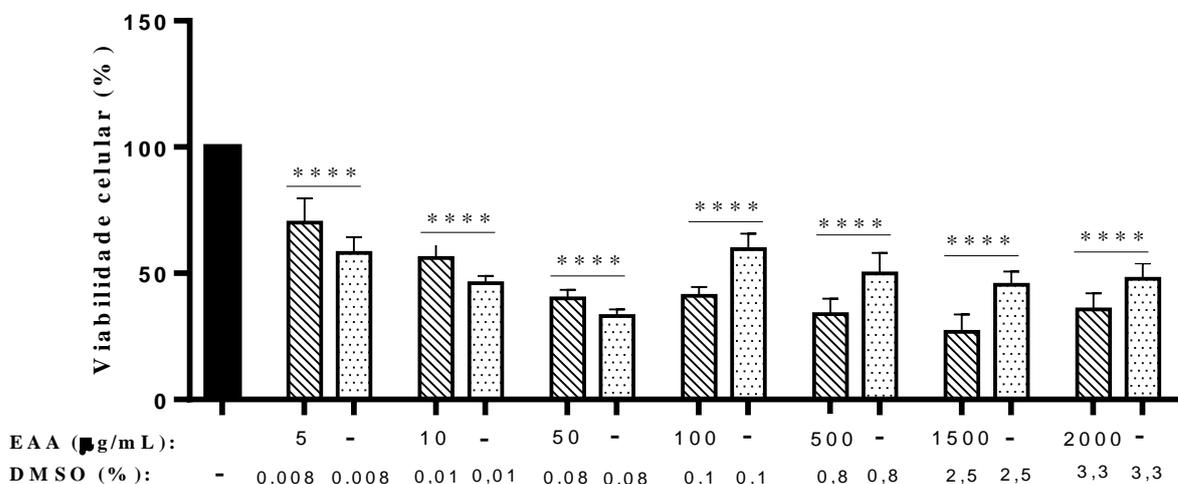


**Figura 13.** Acúmulo de lipídios quantificado pelo valor de absorbância do corante Oil Red extraído a 510 nm.

## 5.4 Linhagem 3T3-L1

### 5.4.1 Viabilidade celular

Na linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1, o ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT foi realizado após 48 horas de incubação com o EAA. A viabilidade celular das células 3T3-L1 após 48 horas na presença do EAA em diferentes concentrações (5-2000 $\mu\text{g/mL}$ ) foi reduzida em todas as concentrações ( $p < 0,0001$ ). A dose de 5 $\mu\text{g/mL}$  que foi a que menos afetou a viabilidade das células, mantendo um percentual de  $70 \pm 6,14\%$  de células metabolicamente viáveis. Efeito semelhante foi observado no DMSO (Figura 14).

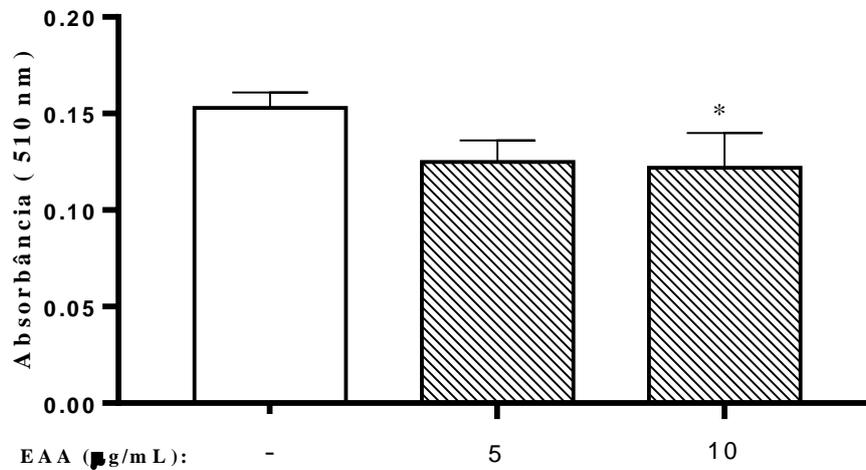


**Figura 14.** Efeito do tratamento por 48 horas do EAA sob a viabilidade de células 3T3-L1 avaliada pelo método de MTT. (-) = ausência; (+) = presença. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão dos valores percentuais de viabilidade celular das células 3T3-L1 em relação ao controle, quando expostas ao tratamento com EAA (5-2000 $\mu\text{g/mL}$ ) ou DMSO (0,008-3,3%). Foram realizados quatro ensaios independentes em duplicata. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

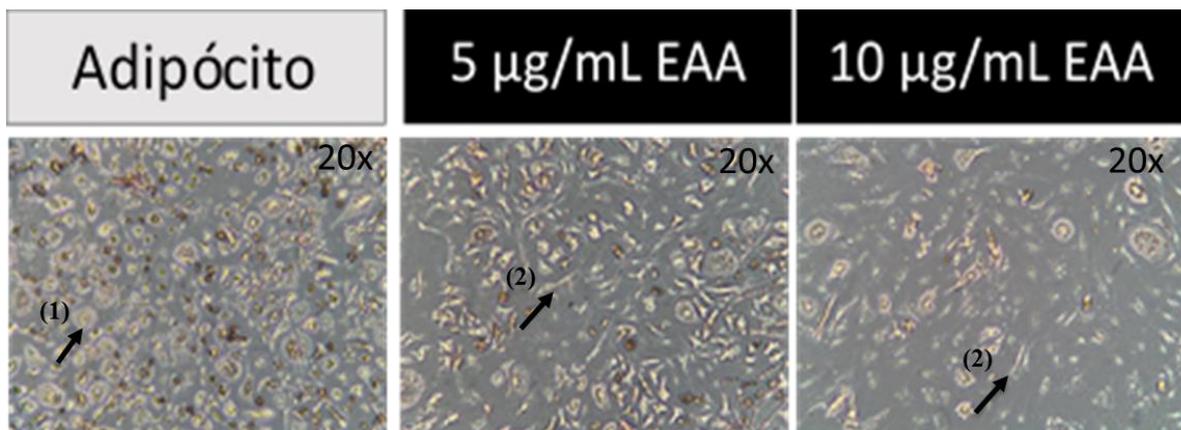
### 5.4.2 Atividade inibitória na diferenciação de adipócitos

Ao avaliar o efeito do extrato aquoso na diferenciação de fibroblastos 3T3-L1 em adipócitos maduros, observa-se através dos dados na redução de absorbância obtidas depois da coloração com Oil-Red (Figura 15A), que o extrato aquoso de alecrim reduziu a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, constatado através da menor presença de gotículas lipídicas, presentes apenas em adipócitos maduros, bem como a predominância de células com morfologia alongada, característica dos fibroblastos, no grupo tratado com 10 $\mu\text{g/mL}$  de EAA (Figura 15B)

(A)



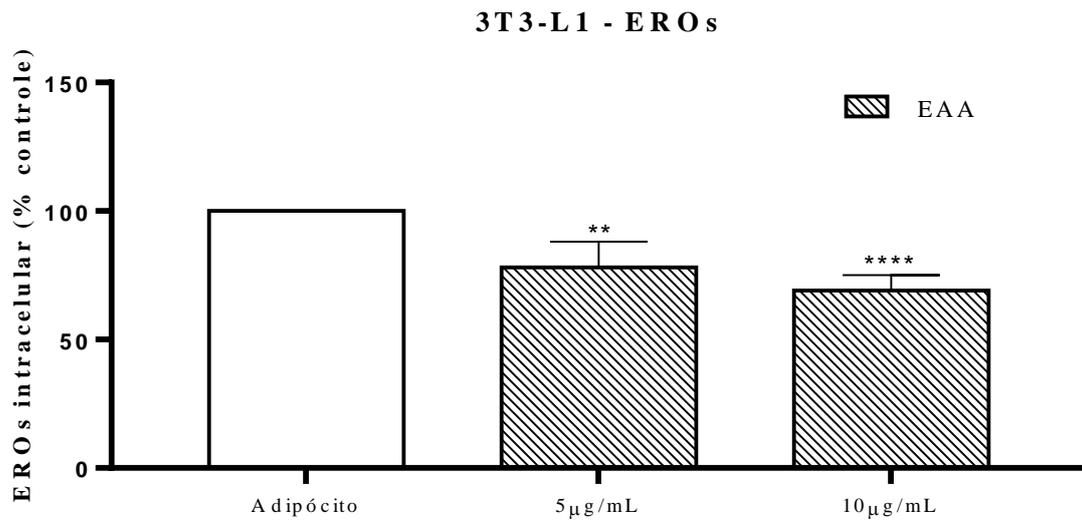
(B)



**Figura 15.** Determinação da incorporação de lipídio intracelular em células 3T3-L1 diferenciadas em adipócitos. (A) O acúmulo de lipídios foi detectado com coloração com Oil Red e quantificado pelo valor de absorbância do Oil Red extraído a 510 nm. (-) = ausência; (+) = presença. (B) Imagens obtidas por microscópio invertido (modelo Primo Vert, Zeiss, Alemanha), lente 20x, da linhagem 3T3-L1 após 7 dias sob processo de diferenciação na presença e ausência do EAA, onde: (1) adipócito maduro com gotícula lipídica preenchendo o citoplasma, representa uma célula 3T3-L1 diferenciada; (2) célula com morfologia de fibroblasto, logo representa uma célula 3T3-L1 indiferenciada. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três ensaios independentes em duplicata. \* $p < 0,05$  vs controle sem tratamento (adipócito). ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

#### 5.4.3 Produção de ERO

A produção de espécies reativas também foi avaliada nas células 3T3-L1 após 7 dias de diferenciação, os resultados demonstraram uma redução significativa na produção intracelular de ERO nas células que receberam o EAA. O efeito foi observado em ambas as concentrações avaliadas, mas não manteve uma relação de dose dependência (Figura 16).



**Figura 16.** Produção intracelular de ERO, por células 3T3-L1 após processo de diferenciação de 7 dias, na presença ou ausência de tratamento com EAA. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de três ensaios independentes em duplicata. \*\* $p < 0,001$  ou \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs controle adipócito sem tratamento. ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey.

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo buscou avaliar o efeito do extrato aquoso de alecrim (EAA) em cultura de células HepG2 e 3T3-L1 mimetizando a condição de obesidade associada ao quadro de esteatose hepática e investigando seus efeitos sobre essas culturas celulares e possíveis repercussões metabólicas. Sendo assim, o EAA atenuou o estresse oxidativo em células HepG2 expostas a uma condição hiperlipídica, bem como em células 3T3-L1 diferenciadas em adipócitos nas condições estudadas, além de interferir no processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1, sugerindo uma possível modulação no processo de adipogênese.

O potencial do alecrim tem sido explorado em diversos estudos, que mostraram que este apresenta propriedades antioxidante (AFONSO et al., 2013; BAKIREL et al., 2008; HEGAZY et al., 2018), anti-inflamatória (PARK; MUN, 2014; TSAI et al., 2014), hipolipemiante (AFONSO et al., 2013; HEGAZY et al., 2018), antiadipogênica (PARK; SUNG, 2015) e seu potencial terapêutico no contexto da obesidade e suas comorbidades (HASSANI; SHIRANI; HOSSEINZADEH, 2016).

Entretanto, a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura avaliou extratos ricos em compostos apolares, tais como o ácido carnósico e carnosol, bem como avaliaram o efeito isolado desses compostos bioativos (IBARRA et al., 2011; PARK; SUNG, 2015; PARK; MUN, 2013; TONG et al., 2017; ZHAO et al., 2015). Diferentemente dos extratos mais apolares, o extrato aquoso de alecrim apresenta majoritariamente em sua composição fitoquímica, a presença do ácido rosmarínico e o flavonoide apigenina (SILVA et al., 2015).

No que diz respeito à composição fitoquímica do extrato, o presente trabalho reproduziu os resultados encontrados por Silva e colaboradores (2015), uma vez que dentre os compostos identificados através da CLAE, o ácido rosmarínico e a apigenina foram os principais componentes do extrato aquoso de alecrim, além do ácido elágico, um dímero formado a partir da condensação do ácido gálico (SHAKERI; ZIRAK; SAHEBKAR, 2018).

Um pico não foi identificado (RT:26,829 min), e representa a presença de um composto mais polar que os anteriormente identificados, dentre os quais pode ser um dos componentes já mencionados ligados à uma molécula de açúcar, por exemplo.

Em relação ao conteúdo total de polifenóis, os resultados encontrados no EAA foram de  $149,55 \pm 0,37$  e  $110,92 \pm 0,59$  mg/g de fenólicos e flavonoides totais, respectivamente. Um estudo que avaliou o teor de fenólicos e flavonoides totais no extrato aquoso de algumas ervas, dentre elas, o alecrim, encontrou resultados semelhantes ao presente estudo. O valor obtido para fenólicos e flavonoides totais foram de  $185 \pm 4,99$  mg/g e  $141 \pm 2,85$  mg/g (CHEN; LIN;

HSIEH, 2007). Estes resultados reforçam o papel do alecrim como uma fonte potencial de compostos fenólicos (HASSANI; SHIRANI; HOSSEINZADEH, 2016; SÁNCHEZ-CAMARGO; HERRERO, 2017).

Sabe-se que fatores como temperatura, umidade relativa, luminosidade, sazonalidade, estágio de desenvolvimento da planta, tipo de extração e outros, podem afetar consideravelmente a quantidade e o tipo composto fenólico presente na espécie. Assim, é comum encontrar variações no teor de compostos fenólicos e flavonoides dentro da mesma espécie (JOHN; NATARAJAN; LUTHRIA, 2016).

O conteúdo de ácido rosmarínico, por exemplo, variou entre 3,4 a 12,7 mg/100g de folha seca em um estudo que avaliou a composição de 16 amostras de alecrim obtido no mesmo período, mas em regiões diferentes (MEZIANE-ASSAMI et al., 2013). Vale ressaltar que o conteúdo de ácido rosmarínico encontrado no presente estudo (24,4 mg/g) foi superior ao estudo supracitado, uma vez que o máximo encontrado no estudo foi o valor correspondente a 12,7 mg/g de extrato seco.

A quantidade e o tipo de composto fenólico presente na amostra podem estar associados à sua capacidade antioxidante. Assim, a presença de grupos hidroxilas e ligações duplas no anel aromático desses compostos podem justificar a relação estrutura-atividade atribuída aos mesmos (CRAFT et al., 2012). A atividade antioxidante *in vitro* pode ser determinada através de diferentes métodos que avaliam mecanismos distintos, dentre eles, métodos de sequestro de radicais orgânicos, como DPPH e ABTS, capacidade redutora (FRAP) e outros (ALVES et al., 2010; CRAFT et al., 2012).

O método de DPPH, por exemplo, consiste em uma reação de oxidação e redução entre o radical DPPH• e o composto antioxidante. O elétron desemparelhado do nitrogênio presente na molécula do DPPH se emparelha com o elétron viabilizado por um radical hidrogênio, proveniente do composto antioxidante. Desse modo, observa-se a descoloração da solução de DPPH, que antes de receber o átomo de hidrogênio do composto antioxidante, apresenta uma coloração púrpura. O mecanismo de ação predominante nesse método é o de transferência de átomo de hidrogênio (HAT) (BOROSKI et al., 2015; CRAFT et al., 2012).

A capacidade antioxidante pelo método de varredura do radical DPPH foi realizada neste estudo, e os resultados encontrados mostram que o EAA apresenta atividade antioxidante através da transferência de átomos de hidrogênio para o radical. O resultado foi observado em todas as concentrações, com destaque para as concentrações de 80 e 100µg/mL, apresentando percentual de varredura acima de 50%.

Apesar dos testes antioxidantes *in vitro* muitas vezes não reproduzirem os resultados *in vivo*, em função principalmente do metabolismo e biodisponibilidade desses compostos (HALLIWELL, 2003), tais análises funcionam como uma triagem que pode determinar se a amostra interage com radicais livres e/ou ERO. Assim, foram realizadas as análises em cultura de células HepG2 e 3T3-L1 para avaliar possíveis efeitos biológicos do EAA nas repercussões metabólicas da obesidade.

O efeito isolado dos compostos encontrados no EAA sobre a obesidade e condições de estresse oxidativo e inflamação já tem sido demonstrado na literatura (EBRAHIMI et al., 2019; LU et al., 2019; RUI et al., 2017), assim, a presença desses compostos no EAA pode refletir nas atividades biológicas encontradas neste extrato.

Inicialmente, foi realizado o ensaio de viabilidade celular a fim de definir as doses do EAA a serem trabalhadas nos ensaios posteriores. Na linhagem HepG2, o ensaio de MTT foi realizado após 24 horas de incubação na presença e/ou ausência do ácido palmítico com o objetivo de identificar possíveis interações entre extrato e esse ácido graxo.

No que diz respeito aos resultados encontrados, foi observado que o extrato na presença ou ausência do ácido palmítico não alterou a viabilidade celular de células HepG2 em nenhuma das concentrações avaliadas, bem como o solvente utilizado apresentou efeito semelhante. Esses achados mostram que o extrato não apresenta efeito citotóxico na linhagem HepG2 nas condições avaliadas.

Cui e colaboradores (2012) avaliaram a viabilidade de um dos compostos do alecrim, o carnosol (0-40 $\mu$ M), e também não observaram efeito citotóxico desse composto em células HepG2 (CUI et al., 2012). No entanto, um outro estudo que avaliou a combinação de um extrato rico em carnosol (12,4%) e ácido carnósico (23,2%) sob a viabilidade celular de células HepG2, demonstrou efeito citotóxico a partir da dose de 20 $\mu$ g/mL (TONG et al., 2017). Diferentemente deste estudo, o EAA não comprometeu a viabilidade celular de células HepG2 por apresentar outros componentes majoritários.

Vale ressaltar que o uso de um solvente que não altere o metabolismo celular é de extrema importância para a interpretação dos resultados *in vitro*. Em um estudo que avaliou três solventes orgânicos (DMSO, etanol e  $\beta$ -ciclodextrina) em 5 linhagens celulares, os solventes apresentaram diferentes efeitos imunomoduladores a depender da dose e da linhagem celular utilizada, constatando que esses efeitos devem ser cuidadosamente avaliados, mesmo quando o solvente estiver presente em baixas concentrações (TIMM et al., 2013).

O ensaio de viabilidade celular também foi realizado na linhagem de células 3T3-L1, contudo, estas passaram por um período de incubação de 48 horas. Tal procedimento foi

realizado visando mimetizar as condições na qual as células 3T3-L1 foram expostas durante o estímulo à diferenciação em adipócitos na presença ou ausência do EAA.

Todas as concentrações de EAA avaliadas reduziram de forma significativa a viabilidade celular quando comparada ao controle, sugerindo que o EAA afetou a viabilidade das células 3T3-L1, sendo que a dose de 5µg/mL a única que não apresentou efeito citotóxico, pois de acordo com a Organização Internacional de Padronização 10993-5 (ISO), a amostra só apresenta potencial citotóxico quando a viabilidade é menor que 70% comparado ao controle (ISO, 2009). No entanto, é importante salientar que o ensaio de viabilidade celular não foi realizado na presença do coquetel de diferenciação, o que pode ser uma limitação nesse estudo, uma vez que a interação entre coquetel e EAA podem alterar as condições do meio e consequentemente, a viabilidade celular.

Como mencionado anteriormente, o solvente utilizado no extrato não deve interferir na viabilidade celular. No entanto, no tratamento com as células 3T3-L1, o DMSO apresentou efeitos semelhantes ao tratamento com EAA, sugerindo que o solvente utilizado contribuiu para a redução significativa da viabilidade celular encontrada nesse estudo.

O DMSO, apesar de ser um solvente bastante utilizado em ensaios de cultura celular, apresenta grande potencial citotóxico a depender da concentração e linhagem celular utilizada. Um estudo que avaliou o efeito do DMSO em diferentes concentrações em células 3T3-L1 mostraram que percentuais deste solvente acima de 1% causam alteração na viabilidade celular quando comparado ao controle, bem como, um efeito citotóxico (viabilidade <70%) desse solvente na linhagem celular 3T3-L1 foi observado quando utilizado percentual  $\geq 10\%$  (DLUDLA et al., 2018).

Vale ressaltar que no presente estudo, a maior dose do EAA (2000µg/mL) não ultrapassou a concentração de 3,3% de DMSO (v/v), de modo que na menor dose do EAA o percentual de DMSO presente foi inferior a 0,1%. Contudo, por alterar a viabilidade de forma semelhante aos resultados encontrados com o EAA, sugere-se que nesse estudo a presença do DMSO influenciou na viabilidade celular de células 3T3-L1.

Além do possível efeito do DMSO, a redução significativa da viabilidade celular em fibroblastos 3T3-L1 expostas ao tratamento com EAA, pode estar relacionada a um efeito sinérgico entre o DMSO e o flavonoide apigenina, um dos componentes majoritários identificados no EAA.

A apigenina tem sido associada à redução de viabilidade e proliferação celular em fibroblastos provenientes de diferentes tecidos. Estudos mostram redução no percentual de viabilidade celular a partir da dose de 10µM de apigenina. Dentre os mecanismos de ação

destacados, estão a regulação do fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e o bloqueio da progressão do ciclo celular dos fibroblastos da fase G1 para fase S (JIAO et al., 2019; WANG et al., 2019).

Ademais, um estudo realizado com um flavonoide do mesmo subgrupo da apigenina, a 7,8-di-hidroxiavona (7,8-DHF), mostrou efeito citotóxico desse fenólico em células 3T3-L1 tratadas com doses acima de 50 $\mu$ M. A citotoxicidade observada foi atribuída à ação da 7,8-DHF em ativar fatores pró-apoptóticos, como proteínas da família das caspases, sugerindo que esse flavonoide reduziu o número de células adiposas no tecido adiposo, inibindo a proliferação das células pré-adipócitas (CHOI et al., 2016). Esses achados, em parte, podem justificar o efeito citotóxico do EAA em fibroblastos 3T3-L1, encontrado no presente estudo. No entanto, seria necessário a realização de testes complementares para sustentar essas hipóteses.

Uma vez considerada a viabilidade das células HepG2 e 3T3-L1 na presença do tratamento com EAA, foram selecionadas as doses para avaliação do efeito do extrato na produção de espécies reativas e incorporação de lipídios nessas células, buscando mimetizar as condições encontradas na obesidade e suas repercussões em tecidos alvos, como o fígado e tecido adiposo.

Sabe-se que a obesidade e suas alterações metabólicas, como a resistência à insulina, tornam o tecido adiposo extremamente lipolítico, o que leva ao aumento de ácidos graxos livres circulantes com posterior captação pelos hepatócitos. O excesso de lipídios no tecido hepático acarreta na disfunção mitocondrial, ativação de vias de estresse oxidativo e inflamação que contribuem para a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica DHGNA (MILIĆ; LULIĆ; ŠTIMAC, 2014).

O ácido palmítico (16:0) é o ácido graxo livre mais liberado pelo tecido adiposo e o mais presente na dieta, cujas principais fontes alimentares são a gordura animal, como carnes, queijos, leite e derivados, bem como o óleo de palma (CALDAS et al., 2019). Estudos anteriores mostram que o ácido palmítico induz o aumento do acúmulo de lipídios concomitante à redução da lipólise em células HepG2, bem como aumento da produção de ERO e lipotoxicidade (HU et al., 2018; ZHAO et al., 2017).

Por essa razão, o ácido palmítico foi utilizado neste estudo para induzir o aumento da incorporação de lipídios, bem como a maior geração de ERO em hepatócitos. As células foram expostas à dose de 0,2mM de ácido palmítico, na presença ou ausência do EAA. A dose utilizada foi baseada em estudos prévios que observaram que doses de ácido palmítico de até 250 $\mu$ M aumentavam a incorporação de lipídios em hepatócitos sem apresentar citotoxicidade (IZDEBSKA et al., 2017; ZHAO et al., 2017).

Entretanto, a dose do ácido palmítico (0,2mM) utilizada no presente estudo, não aumentou a produção de ERO, sugerindo-se que a dose não foi suficiente para alterar de forma estatística o estado redox da célula na presença do ácido palmítico. Outra possibilidade para estes achados pode estar associada à condição da própria célula. O processo de cultivo celular, mesmo em condições adequadas, pode impor estresse oxidativo celular, favorecendo a geração de ERO e impedindo a regulação adaptativa por meio dos antioxidantes celulares. Este efeito pode ser resultado do número de replicações a qual as células foram submetidas, por exemplo (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Embora não tenha sido observado um aumento na produção de ERO pelas células HepG2 expostas ao ácido palmítico, a presença do EAA nestas células alterou o estado redox celular quando comparado às células expostas apenas ao ácido palmítico, o que indica uma atividade antioxidante desse extrato em cultura de hepatócitos. Essa atividade pode estar relacionada à mecanismos de ação antioxidante direta, com os polifenóis do EAA varrendo as ERO, como foi observado no teste antioxidante *in vitro* pelo método de DPPH, ou por mecanismo indireto, modulando vias de defesas antioxidantes endógenas, como a do Nrf2, observado em estudos anteriores (FENG et al., 2017; TONG et al., 2017).

A via de sinalização do Nrf2 é sensível à sinalização redox e pode regular aproximadamente 1 a 10% dos genes humanos (TKACHEV; MENSCHIKOVA; ZENKOV, 2011). Esse complexo, uma vez ativado, regula a expressão de genes envolvidos na resposta antioxidante endógena, tais como as enzimas SOD, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e glutathione reductase (GR), contribuindo para o equilíbrio no estado redox (CARBONARI, 2005; HASSIMOTO & LAJOLO, 2017).

No estudo de Tong e colaboradores (2017), o extrato de alecrim, rico em ácido carnósico (23,2%) e carnosol (12,4%) na dose de 50µg/mL, bem como esses compostos isolados, nas doses de 100µM foram eficazes em aumentar a quantidade da proteína Nrf2 em células HepG2, sugerindo ativação dessa proteína por esses compostos. No entanto, o presente estudo avaliou o efeito do EAA, cuja composição de polifenóis é diferenciada, destacando-se o ácido rosmarínico, a apigenina e o ácido elágico, aos quais podem ser atribuído o mesmo mecanismo de ação dos compostos descritos acima.

Estudo anterior mostrou que a apigenina foi eficaz em modular positivamente a via Keap1-Nrf2-ARE tanto *in vivo* quanto na cultura de células Hepa1-6 submetidas a um modelo de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). O mecanismo que envolveu essa modulação foi a translocação aumentada de Nrf2 do citoplasma para o núcleo, que culminou

em uma melhor resposta antioxidante endógena, demonstrada pelo aumento da expressão de genes de enzimas da fase II, tais como: Nqo1, Gclc, Gstm1, Gsta2 e Gsta4 (FENG et al., 2017).

Outro estudo avaliou o ácido elágico em modelo de estresse mediado por excesso de glicose em células HepG2. Dentre os resultados encontrados, destacam-se a redução da produção de ERO, produtos de peroxidação lipídica, como o malonaldeído (MDA), e aumento da atividade enzima superóxido desmutase (SOD), nas doses de 15 e 30 $\mu$ M. Tais resultados foram associados à redução dos níveis da proteína Keap-1 e aumento dos níveis proteicos de Nrf2, sugerindo que o ácido elágico modulou positivamente essa via (DING et al., 2019a).

O ácido rosmarínico, o composto presente em maior quantidade no EAA desse estudo, foi avaliado por Ding e colaboradores (2019) em hepatócitos humano L02 expostos ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (400 $\mu$ M). Os resultados demonstraram redução significativa na produção de espécies reativas em células expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tratadas com ácido rosmarínico (5 $\mu$ g/ml) efeitos atribuídos também à regulação da via do Nrf2 (DING et al., 2019b).

Contudo, apesar do EAA ter reduzido geração de ERO em células HepG2, o estresse oxidativo não foi associado ao aumento de lipídios nessas células, bem como o EAA não demonstrou efeito em modular o metabolismo lipídico, nas condições avaliadas, mostrando que o EAA não reduz a incorporação de lipídios em cultura de células HepG2, nestas condições.

Nesse contexto, um estudo que avaliou o extrato aquoso de amora (na sua forma digerida e não digerida), observou que os extratos avaliados aumentaram a incorporação de lipídios em células HepG2 tratadas com 0,4mM de ácido palmítico, ao passo em que reduziram a produção de ERO. Os autores justificaram que esse aumento na síntese de TAG foi uma resposta adaptativa precoce ao aumento da carga lipídica, funcionando como um mecanismo protetor para combater a sobrecarga de ácidos graxos livres, e que ainda é controverso que o acúmulo de TAG induzido por ácido palmítico esteja relacionado à lipotoxicidade (HU et al., 2018).

Assim, apesar do ácido palmítico estar associado ao aumento de TAG e consequente produção de ERO, esse efeito pode não ter relação com o aumento da beta oxidação, por exemplo. Uma vez que foi observado em células de hepatoma (H4IIEC3) que a geração de ERO independe deste processo (LEAMY et al., 2013). Assim, sabe-se que alguns polifenóis têm sido associados ao aumento da beta oxidação (RUPASINGHE et al., 2016), o que pode justificar que alguns compostos fenólicos atuem aumentando a captação de lipídios hepática ao invés de atuar na sua redução. Esse processo é um mecanismo de adaptação que acarreta o aumento da beta oxidação desses ácidos graxos de modo a reduzir a adiposidade. No entanto, esses dados ainda são controversos e necessitam de maior investigação.

É importante salientar que vias de redução do estresse oxidativo também podem ser moduladas em adipócitos, como avaliado em um estudo com ácido carnósico e carnosol, que demonstrou que ambos compostos fenólicos provenientes do alecrim, podem modular a via do Nrf2, aumentando a proteção antioxidante endógena e reduzindo o estresse oxidativo em células 3T3-L1 (TAKAHASHI et al., 2009).

A redução na produção de ERO foi observada também nos adipócitos expostos ao tratamento com EAA. Esse resultado pode estar associado aos dados obtidos através da coloração de células 3T3-L1 com Oil-Red, haja vista que a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros leva ao maior acúmulo de gotículas lipídicas, e este processo é dependente do estresse oxidativo (FURUKAWA et al., 2004). No entanto, esses resultados também podem estar relacionados a um menor número de células encontrados nas doses de 5 e 10 µg/mL, apesar de ser observado fibroblastos aderidos e não diferenciados nas doses tratadas, sugerindo que o EAA pode regular a adipogênese por vias de redução de estresse oxidativo.

O mecanismo de ação mediado pelas ERO pode estar envolvido com a ativação de proteínas MAPK e regulação de fatores de transcrição envolvidos na adipogênese, tal como o PPAR- $\gamma$  (BOST et al., 2005; LEE et al., 2009).

Estudo com componentes extraídos do alecrim também encontraram efeitos antiadipogênicos, mostrando que o carnosol e ácido carnósico inibiram a adipogênese em cultura de células 3T3-L1. O ácido carnósico teve destaque por apresentar esse efeito em baixa concentração (0,86 µM). Os resultados encontrados foram atribuídos a atividade antioxidante, uma vez que o ácido carnósico aumentou a expressão de enzimas de fase 2 e conseqüentemente o conteúdo intracelular de GSH (TAKAHASHI et al., 2009).

O extrato acetônico de alecrim, rico em ácido carnósico, também reduziu a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros na dose de 20 µg/mL, bem como inibiu completamente esse processo na dose de 30 µg/mL. O efeito antiadipogênico observado foi maior no primeiro dia de estímulo com o coquetel de diferenciação, mostrando que os compostos do alecrim podem atuar nas primeiras 24 horas de adipogênese regulando genes como o PPAR- $\gamma$  (GAYA et al., 2013).

Nos últimos anos, o processo de adipogênese tem sido designado como um processo crítico no que diz respeito ao aumento do tecido adiposo. Os adipócitos são células que têm papel significativo na liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas. A expansão dessas células, seja por hipertrofia ou hiperplasia, acarreta no aumento da liberação de citocinas e ERO a nível sistêmico, levando a alterações metabólicas em outros tecidos (RUIZ-OJEDA et al., 2016; TAKAHASHI et al., 2009).

Adipócitos maduros produzem níveis elevados de ERO quando comparados com outros tecidos, incluindo fígado, músculo esquelético e aorta. Neste sentido, na obesidade, os adipócitos são uma importante fonte de ERO, que por sua vez podem estar acelerando o processo de adipogênese em células adjacentes, tais como os fibroblastos. Assim, torna-se um ciclo vicioso onde o processo de hipertrofia dos adipócitos aumenta o processo de hiperplasia local (LEE et al., 2009). Portanto, compostos que possam regular o processo de adipogênese podem ser úteis no tratamento da obesidade.

Os resultados encontrados neste estudo mostraram que o EAA modulou o estresse oxidativo em células HepG2 e 3T3-L1, sendo que nesta última, o acúmulo de lipídios associado ao processo de adipogênese, que também foi reduzido.

## 7 CONCLUSÃO

Os principais achados deste estudo demonstram que o EAA é uma fonte de compostos fenólicos, cujos principais componentes identificados incluem os ácidos fenólicos: ácido rosmarínico e ácido elágico, e o flavonoide apigenina. A presença destes compostos resultou em uma atividade antioxidante *in vitro* observado também em cultura celular. O EAA alterou o estado redox de células HepG2 e 3T3-L1, mesmo na presença de um ácido graxo saturado, como o palmítico, bem como interferiu na diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos maduros, observada por meio da menor deposição de gotículas lipídicas nestas células. Essa atividade deve estar associada à menor disponibilidade de ERO necessárias para ativação de vias de adipogênese. Contudo, a redução de estresse oxidativo em células HepG2 não foi acompanhada pela redução na incorporação de lipídios. Sugere-se, portanto outras condições envolvidas, tais como as doses do EAA avaliadas, o tipo de extração utilizada ou a participação de outros mecanismos biológicos.

## **8 PERSPECTIVAS**

- Contribuir para o desenvolvimento de novos trabalhos nessa área;
- Gerar avanço da pesquisa básica para pesquisa em seres humanos, buscando avaliar os potenciais do alecrim como uma erva a ser aplicada na fitoterapia ou como possível nutracêutico a ser utilizado como tratamento complementar na obesidade e doenças relacionadas.

## REFERÊNCIAS

- ACHOUR, M. et al. Bioavailability and metabolism of rosemary infusion polyphenols using Caco-2 and HepG2 cell model systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 10, p. 3741-3751, 2018.
- AFONSO, M. S. et al. Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. **Nutrition and Metabolism**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2013.
- AHN, S. B. et al. Fermented soymilk alleviates lipid accumulation by inhibition of SREBP-1 and activation of NRF-2 in the hepatocellular steatosis model. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 236–245, 2018.
- ALI, A. T. et al. Adipocyte and adipogenesis. **European Journal of Cell Biology**, v. 92, n. 6–7, p. 229–236, 2013.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ARABBI, Paola R.; GENOVESE, Maria Inés; LAJOLO, Franco M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1124-1131, 2004.
- BAKIREL, T. et al. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 64–73, 2008.
- BOOTH, A. et al. Adipose tissue: An endocrine organ playing a role in metabolic regulation. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 26, n. 1, p. 25–42, 2016.
- BORGES, R. S. et al. Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 183–195, 2018.
- BOROSKI et al. **Antioxidantes: Princípios e Métodos analíticos**. 1ª ed. Curitiba: [s.n.].
- BORRÁS-LINARES, I. et al. *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 20585–20606, 2014.
- BOST, F. et al. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. **Biochimie**, v. 87, n. 1 SPEC. ISS., p. 51–56, 2005.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2018: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefônico**.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Plantas Medicinais e fitoterápicos no SUS**. Disponível em <<https://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e->

fitoterapicos-ppnpmf/plantas-medicinais-e-fitoterapicos-no-sus> Acesso em: 15 de fevereiro de 2020.

BRAY, G. A. et al. The science of obesity management: An endocrine society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 39, n. 2, p. 79–132, 2018.

CALDAS, A.P.S. et al. Inflamação e estresse oxidativo no desenvolvimento de Doenças Crônicas não transmissíveis. In: HERMSDORFF, H.H.M.; BRESSAN, J. **Genômica Nutricional nas doenças Crônicas não transmissíveis**. Rio de Janeiro: Rubio, 2019. cap. 5, p.67-82.

CARDOSO, M. G. et al. Plantas aromáticas e condimentares (Boletim Técnico). v. 2013, n. 10 de agosto, p. 7–84, 2005.

CARDOZO, L. F. M. F. et al. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. **Biochimie**, v. 95, n. 8, p. 1525–1533, 2013.

CARMICHAEL, J; SHANKEL, S. W. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandins and renal function. **The American journal of medicine**, v. 78, n. 6, p. 992-1000, 1985.

CHEN, H.; LIN, Y.; HSIEH, C. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. **Food chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1418-1424, 2007.

CHOI, J. W. et al. 7,8-Dihydroxyflavone inhibits adipocyte differentiation via antioxidant activity and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocyte cells. **Life Sciences**, v. 144, p. 103–112, 2016.

CHOOI, Y. C.; DING, C.; MAGKOS, F. The epidemiology of obesity. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 92, p. 6–10, 2019.

COLALTO, C. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 3, p. 413–425, 2018.

COLICA, C. et al. Rosmarinic Acid as Potential Anti-Inflammatory Agent. p. 240–242, 2018.

CRAFT, B. D. et al. Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 148–173, 2012.

CUI, L. et al. Abietane diterpenoids of *Rosmarinus officinalis* and their diacylglycerol acyltransferase-inhibitory activity. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1775–1780, 2012.

DE OLIVEIRA, M. L.; SANTOS, L. M. P.; SILVADA, E. N. Direct healthcare cost of obesity in Brazil: An application of the cost-of-illness method from the perspective of the public health system in 2011. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–15, 2015.

DEL RIO, D. et al. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–1892, 2013.

DING, X. et al. Ellagic acid ameliorates oxidative stress and insulin resistance in high glucose-treated HepG2 cells via miR-223/keap1-Nrf2 pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, n. November 2018, p. 85–94, 2019a.

- DING, Y. et al. Rosmarinic Acid Ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in L02 Cells Through MAPK and Nrf2 Pathways. **Rejuvenation Research**, v. 22, n. 4, p. 289–298, 2019b.
- DLUDLA, P. V. et al. A dose-dependent effect of dimethyl sulfoxide on lipid content, cell viability and oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes. **Toxicology Reports**, v. 5, n. March, p. 1014–1020, 2018.
- DORMAN, H. J. D.; PELTOKETO A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M.J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, v.83, p. 255–262, 2003.
- EBRAHIMI, R. et al. Ellagic acid reduces methotrexate-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction via up-regulating Nrf2 expression and inhibiting the I $\kappa$ B $\alpha$ /NF $\kappa$ B in rats. **DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2019.
- EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - A mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811–819, 2015.
- ENGIN, A. B.; ENGIN, A. Obesity and Lipotoxicity. v. 960, 2017.
- FASSHAUER, M.; BLÜHER, M. Adipokines in health and disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 7, p. 461–470, 2015.
- FENG, X. et al. Apigenin, a modulator of PPAR $\gamma$ , attenuates HFD-induced NAFLD by regulating hepatocyte lipid metabolism and oxidative stress via Nrf2 activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 136, p. 136–149, 2017.
- FERREIRA, A. P. DE S.; SZWARCOWALD, C. L.; DAMACENA, G. N. Prevalência e fatores associados da obesidade na população brasileira: estudo com dados aferidos da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology**, v. 22, p. e190024, 2019.
- FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 50, n. 2, p. 216–229, 2006.
- FRANCISQUETI, F. V. et al. The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 1, p. 85–91, 2017.
- FURUKAWA, Shigetada et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2004.
- GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 129–139, 2010.
- GAYA, M. et al. Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in *Rosmarinus officinalis*, is exerted through the C/EBPs and PPAR $\gamma$  pathways at the onset of the differentiation program. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3796–3806, 2013.
- GOTTARDI, D. et al. Beneficial effects of spices in food preservation and safety. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. SEP, p. 1–20, 2016.
- GRIGORAŞ, A. et al. **Adipocytes spectrum — From homeostasia to obesity and its associated pathology**. [s.l: s.n.]. v. 219
- HALLIWELL, B. Oxidative stress in cell culture: An under-appreciated problem? **FEBS**

**Letters**, v. 540, n. 1–3, p. 3–6, 2003.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125–130, 2011.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.

HASSANI, F. V.; SHIRANI, K.; HOSSEINZADEH, H. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: a review. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 9, p. 931–949, 2016.

HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Polifenóis. In: COMINETTI, C.; ROGERO, M. M.; HORST M. A. **Genômica Nutricional: Dos fundamentos à nutrição molecular**. 1. ed. Manole, 2017. cap. 29, p. 231-242.

HEEREN, J.; SCHEJA, L. Brown adipose tissue and lipid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 29, n. 3, p. 180–185, 2018.

HEGAZY, A. M. et al. Hypolipidemic and hepatoprotective activities of rosemary and thyme in gentamicin-treated rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 420–430, 2018.

HU, D. et al. Systematic evaluation of phenolic compounds and protective capacity of a new mulberry cultivar J33 against palmitic acid-induced lipotoxicity using a simulated digestion method. **Food Chemistry**, v. 258, n. November 2017, p. 43–50, 2018.

HUANG, B. et al. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) Catalyzes Lipid Peroxidation of Oleic Acid-Induced HepG2 Cells. **Biochemistry (Moscow)**, v. 83, n. 5, p. 595–602, 2018.

HUANG, S. et al. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 9, p. 2002–2013, 2012.

IBARRA, A. et al. Carnosic acid-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract limits weight gain and improves cholesterol levels and glycaemia in mice on a high-fat diet. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 8, p. 1182–1189, 2011.

IZDEBSKA, M. et al. The beneficial effects of resveratrol on steatosis and mitochondrial oxidative stress in HepG2 cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 95, n. 12, p. 1442–1453, 2017.

JAYANTHY, G.; SUBRAMANIAN, S. Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet–STZ induced experimental diabetes mellitus. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 431-437, 2014.

JIAO, R. et al. Apigenin inhibits fibroblast proliferation and reduces epidural fibrosis by regulating Wnt3a/ $\beta$ -catenin signaling pathway. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2019.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 1–16, 2006.

- JOHN, K.M; NATARAJAN, S.; LUTHRIA, L. D. Metabolite changes in nine different soybean varieties grown under field and greenhouse conditions. **Food Chemistry**, v. 211, p. 347-355, 2016.
- KAUR, P. et al. Progression of conventional hepatic cell culture models to bioengineered HepG2 cells for evaluation of herbal bioactivities. **Biotechnology Letters**, v. 40, n. 6, p. 881–893, 2018.
- KIM, S. H.; DESPRÉS, J. P.; KOH, K. K. Obesity and cardiovascular disease: friend or foe? **European heart journal**, v. 37, n. 48, p. 3560–3568, 2016.
- KOWALSKA, K. et al. Inhibitory activity of chokeberry, bilberry, raspberry and cranberry polyphenol-rich extract towards adipogenesis and oxidative stress in differentiated 3T3-L1 adipose cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–15, 2017.
- KURI-HARCUCH, W. et al. A cellular perspective of adipogenesis transcriptional regulation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 2, p. 1111–1129, 2019.
- LEAMY, A. K.; EGNATCHIK, R.A.; YOUNG, J. D. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. **Progress in lipid research**, v. 52, n. 1, p. 165-174, 2013.
- LEE, H. et al. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 16, p. 10601–10609, 2009.
- LI, Sha et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 11, p. 26087-26124, 2015.
- LISBOA, Q. C.; COSTAZ, S. M.; COUTO, C. A. Current management of non-alcoholic fatty liver disease. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 9, p. 872-878, 2016.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J. In: MATOS, F.J.A. (Ed.). **Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. 1 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 512p.
- LU, J. et al. Apigenin reduces the excessive accumulation of lipids induced by palmitic acid via the AMPK signaling pathway in HepG2 cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, n. 15, p. 2965–2971, 2019.
- MAGESH, S; CHEN, Yu; HU, L. Small molecule modulators of K eap1-N rf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. **Medicinal research reviews**, v. 32, n. 4, p. 687-726, 2012.
- MANNA, P.; JAIN, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 13, n. 10, p. 423–444, 2015.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: antioxidantes naturais família Lamiaceae. Aplicação em produtos alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, p. 96–103, 2007.
- MASI, L. N. et al. Sunflower oil supplementation has proinflammatory effects and does not reverse insulin resistance in obesity induced by high-fat diet in C57BL/6 mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

- MEZIANE-ASSAMI, D. et al. Geographical Differentiation of Rosemary Based on GC/MS and Fast HPLC Analyses. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 1, p. 282–288, 2013.
- MILIĆ, S.; LULIĆ, D.; ŠTIMAC, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 28, p. 9330–9337, 2014.
- MOHAN, S.; GUPTA, D. Crosstalk of toll-like receptors signaling and Nrf2 pathway for regulation of inflammation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, n. July, p. 1866–1878, 2018.
- MORAES, J. C.; ROGERO, M. M.; SOUZA, C. T. DE. Sistema Nervoso Central e Inflamação: Descontrole nos mecanismos de fome e saciedade. In: CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R. **Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular**. São Paulo: Sarvier, 2011. cap. 8, p. 130-149.
- MOSETI, D.; REGASSA, A.; KIM, W. K. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, p. 1–24, 2016.
- MÜLLER, F. A.; STURLA, S. J. Human in vitro models of nonalcoholic fatty liver disease. **Current Opinion in Toxicology**, v. 16, p. 9–16, 2019.
- NETZER, N. et al. Hypoxia, oxidative stress and fat. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 1143–1150, 2015.
- NI, M. et al. Biological mechanisms and related natural modulators of liver X receptor in nonalcoholic fatty liver disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 113, n. 528, p. 108778, 2019.
- OLIVEIRA. Adipócitos. In: CARVALHO, Hernandes F. **Células: Uma abordagem multidisciplinar**. Manole, 2005. Cap. 1, p. 1-10.
- ORGANIZATION, W. H. **WHO - 1995.pdf**, 1995.
- OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v.11, n.2, p.85-97, 2011.
- PARK, M.-Y.; SUNG, M.-K. Carnosic Acid Inhibits Lipid Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes Through Attenuation of Fatty Acid Desaturation. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 1, p. 41–49, 2015.
- PARK, M. Y.; MUN, S. T. Dietary carnosic acid suppresses hepatic steatosis formation via regulation of hepatic fatty acid metabolism in high-fat diet-fed mice. **Nutrition Research and Practice**, v. 7, n. 4, p. 294–301, 2013.
- PARK, M. Y.; MUN, S. T. Carnosic acid inhibits TLR4-MyD88 signaling pathway in LPS-stimulated 3T3-L1 adipocytes. **Nutrition Research and Practice**, v. 8, n. 5, p. 516–520, 2014.
- PARK, M. Y.; SUNG, M. K. Carnosic acid attenuates obesity-induced glucose intolerance and hepatic fat accumulation by modulating genes of lipid metabolism in C57BL/6J-ob/ob mice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 4, p. 828–835, 2014.
- PETTINELLI, P.; OBREGÓN, A. M.; VIDELA, L. A. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. **Nutricion hospitalaria**, v. 26, n. 3, p. 441–450, 2011.

- POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; MANTZOROS, C. S. Adipose tissue, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. **Minerva Endocrinologica**, v. 42, n. 2, p. 92–108, 2017.
- POULAIN-GODEFROY, O. et al. Inflammatory role of toll-like receptors in human and murine adipose tissue. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 2010.
- QUEIROZ, ET AL. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. v. 53, n. n.5, p. 582–594, 2009.
- RAKOTOARIVELO, V. et al. Inflammation in human adipose tissues—Shades of gray, rather than white and brown. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 44, n. October, p. 28–37, 2018.
- REINISALO, M. et al. Polyphenol stilbenes: Molecular mechanisms of defence against oxidative stress and aging-related diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.
- RINELLA, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease a systematic review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 313, n. 22, p. 2263–2273, 2015.
- ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 1–19, 2018.
- RUI, Y. et al. Rosmarinic acid suppresses adipogenesis, lipolysis in 3T3-L1 adipocytes, lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion in macrophages, and inflammatory mediators in 3T3-L1 adipocytes. **Food & Nutrition Research**, v. 61, n. 1, p. 1330096, 2017.
- RUIZ-OJEDA, F. J. et al. Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1–26, 2016.
- RUPASINGHE, H. P. V. et al. Phytochemicals in regulating fatty acid  $\beta$ -oxidation: Potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 165, p. 153–163, 2016.
- SÁNCHEZ-CAMARGO, A; HERRERO, M. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) as a functional ingredient: recent scientific evidence. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 13-19, 2017.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.
- SHAKERI, A.; ZIRAK, M. R.; SAHEBKAR, A. Ellagic Acid: A Logical Lead for Drug Development? **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 2, p. 106–122, 2018.
- SIES, H. et al. in the Catalytic Assay Using Yeast Glutathione Reductase. **Febs Letters**, v. 103, n. 2, p. 287–290, 1979.
- SILVA, A. M.O. et al. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Revista de Nutricao**, v. 24, n. 1, p. 121–130, 2011.
- SILVA, A. M.O. et al. Aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* L. inhibits neutrophil influx and cytokine secretion. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 1, p. 125–133, 2015.

- SOLER, G. L. N.; SILVA, A. W. S. M.; SILVA, V. C. G.; TEIXEIRA, R. J. Doença hepática gordurosa não-alcoólica: associação com síndrome metabólica e fatores de risco cardiovascular. **Rev Socerj**, v. 21, n. 2, p. 94-100, 2008.
- SONG, M. Trajectory analysis in obesity epidemiology: A promising life course approach. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 4, p. 37–41, 2019.
- STEFAN, N. et al. Metabolically healthy obesity : epidemiology , mechanisms , and clinical implications. **Lancet Diabetes Endocrinology**, v. 1, n. 13, p. 152–62, 2013.
- STERN, J. H.; RUTKOWSKI, J. M.; SCHERER, P. E. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 770–784, 2016.
- SWAIN, T.; HILLS, W. E. Determinação de fenólicos totais. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 10, p. 63–68, 1959.
- TAKAHASHI, T. et al. Carnosic acid and carnosol inhibit adipocyte differentiation in mouse 3T3-L1 cells through induction of phase 2 enzymes and activation of glutathione metabolism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 382, n. 3, p. 549–554, 2009.
- TER HORST, K. W.; SERLIE, M. J. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1–20, 2017.
- TIMM, M. et al. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. **Cytotechnology**, v. 65, n. 5, p. 887–894, 2013.
- TKACHEV, V. O.; MENSCHIKOVA, E. B.; ZENKOV, N. K. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. **Biochemistry (Moscow)**, v. 76, n. 4, p. 407–422, 2011.
- TONG, X. P. et al. Rosemary Extracts Upregulate Nrf2, Sestrin2, and MRP2 Protein Level in Human Hepatoma HepG2 Cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- TSAI, C. W. et al. The mechanisms of carnosic acid attenuates tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated inflammation and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 58, n. 4, p. 654–664, 2014.
- WANG, H. et al. Apigenin inhibits growth and migration of fibroblasts by suppressing FAK signaling. **Ageing**, v. 11, n. 11, p. 3668–3678, 2019.
- WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 5, p. 612–616, 1999.
- WANG, Q. A. et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1338–1344, 2013.
- WANG, X.; HAI, C. Redox modulation of adipocyte differentiation: Hypothesis of “redox Chain” and novel insights into intervention of adipogenesis and obesity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 99–125, 2015.
- WORD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and Overweight**. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 06 out. 2018.
- ZHANG, X. et al. New insight into inter-organ crosstalk contributing to the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Protein and Cell**, v. 9, n. 2, p. 164–177, 2018.

ZHANG, Y.-J. et al. Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 21138–21156, 2015.

ZHAO, N. Q. et al. Palmitate induces fat accumulation by activating C/EBP $\beta$ -mediated G0S2 expression in HepG2 cells. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 43, p. 7705–7715, 2017.

ZHAO, Y. et al. Carnosic Acid as a Major Bioactive Component in Rosemary Extract Ameliorates High-Fat-Diet-Induced Obesity and Metabolic Syndrome in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 19, p. 4843–4852, 2015.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

ZHONG, W. et al. Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF- $\kappa$ B related signaling. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, p. 302–313, 2016.

ZHOU, Y. et al. Moringa oleifera stem extract protect skin keratinocytes against oxidative stress injury by enhancement of antioxidant defense systems and activation of PPAR $\alpha$ . **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, n. May, p. 44–53, 2018.