



**CONFORME SOLICITAÇÃO DO AUTOR, ESTA
PRODUÇÃO INTELECTUAL POSSUI RESTRIÇÃO
DE ACESSO**

**CAXIAS DO SUL
2024**

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

EXTRATOS DE *HYLOCEREUS LEMAIREI* (HOOK.) BRITTON &
ROSE: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
EFEITOS BIOLÓGICOS EM MODELO DE HIPERGLICEMIA *IN VITRO*

KARINA ZANELLA LODI

CAXIAS DO SUL

2022

KARINA ZANELLA LODI

EXTRATOS DE *HYLOCEREUS LEMAIREI* (HOOK.) BRITTON
& *ROSE*: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E EFEITOS BIOLÓGICOS EM MODELO
DE HIPERGLICEMIA *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre
em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cátia dos Santos Branco
Co-orientadora: Profa. Dra. Mirian Salvador

CAXIAS DO SUL
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

L823e Lodi, Karina Zanella

Extratos de *Hylocereus Lemairei* (Hook.) Britton & Rose [recurso eletrônico] : composição química, atividade antioxidante e efeitos biológicos em modelo de hiperglicemia *in vitro* / Karina Zanella Lodi. – 2022.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022.

Orientação: Cátia dos Santos Branco.

Coorientação: Mirian Salvador.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Pitaya. 2. Fenóis. 3. Diabetes. 4. Células endoteliais. I. Branco, Cátia dos Santos, orient. II. Salvador, Mirian, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 582.661.56

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

**EXTRATOS DE *HYLOCEREUS LEMAIREI* (HOOK.) BRITTON
& *ROSE*: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E EFEITOS BIOLÓGICOS EM MODELO
DE HIPERGLICEMIA *IN VITRO***

KARINA ZANELLA LODI

Dissertação submetida a banca examinadora designada pela coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em ____ de _____ de 2022

Banca Examinadora

Cátia dos Santos Branco

Orientador: Prof. Dr
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Liliane de Freitas Bauermann

Prof. Dr
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Francine Cadoná

Prof. Dr
Universidade Franciscana - UFN

Joséli Schwambach

Prof. Dr
Universidade de Caxias do Sul - UCS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a Deus por ter me permitido viver tudo isso, um sonho.

Aos meus pais que são os melhores pais que eu poderia ter, e que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Eu amo vocês.

Ao amor da minha vida Ivair que sempre me apoiou e esteve do meu lado na minha trajetória, e que me ensina a cada dia como ser uma pessoa melhor.

A minha irmã Carla que sempre cuidou tão bem do meu Pulguinha e sempre resolveu tudo pra mim para que eu pudesse ir a Caxias aliviada.

Um agradecimento mais do que especial a minha orientadora Professora Dr. Cátia dos Santos Branco e co-orientadora Professora Dr. Mirian Salvador pelos ensinamentos passados, por me abrirem as portas para esse mundo mágico e desafiador que é a pesquisa, e por me mostrarem todos os dias que eu sou capaz sim. Minha eterna gratidão a vocês.

A Lu nossa técnica que sempre esteve ali para me ajudar a resolver aquele probleminha que pra mim era o fim e ela como sempre tirava de letra! Obrigada.

A minha amiga e colega de profissão Lorena Lizot que viveu tudo isso comigo e que sempre está ali para o que der e vier, e para tomar um cafézinho comigo nas idas acompanhada até a UCS. E por ter me dado um dos maiores presentes da minha vida, minha afilhada Aurora.

As minhas amigas da vida Andréia Fraron e Patricia Giaboinski pela amizade, pelo companherismo, e por serem sempre as ``minhas amigas``. Nossa vida tomou rumos tão diferentes, mas mesmo assim vocês estão sempre presentes. Contem comigo sempre!

A Universidade de Caxias do Sul, pela oportunidade de evoluir como profissional e por ter colaborado com a minha pesquisa e formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de fazer parte desta equipe e aprender com excelentes professores e funcionários.

Ao LEOA e a todos os meus colegas do Lab, todos os que passaram por mim neste período, não vou citar nomes pra não esquecer de ninguém, obrigado pelo acolhimento, pelas trocas e por todos os momentos vividos. Levo a amizade de vocês no meu coração.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram com a minha jornada e com a minha educação profissional, vocês foram fundamentais.

Gratidão!!

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 DIBETES MELLITUS (DM).....	16
2.1.2 INFLAMAÇÃO NO DIABETES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	19
2.1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES	20
2.2 PITAYA DA POLPA VERMELHA (<i>HYLOCEREUS LEMAIREI</i>).....	21
2.2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA	21
2.2.2 PRODUÇÃO COMERCIAL.....	23
2.2.3 COMPOSIÇÃO FÍSICA, NUTRICIONAL E QUÍMICA.....	24
3. OBJETIVOS	26
4. RESULTADOS.....	27
ARTIGO 1.	28
ARTIGO 2.	44
5. DISCUSSÃO GERAL.....	84
6. CONCLUSÕES.....	91
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	93
8. REFERÊNCIAS.	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS•+	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGEs	Produtos finais da glicação avançada
ATP	Trifosfato de adenosina
CACO-2	Células de adenocarcinoma colorretal humano
CAT	Catalase
CI	Complexo I da cadeia de transporte de elétrons
CII	Complexo II da cadeia de transporte de elétrons
CU	Colite ulcerativa
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CoQ	Coenzima Q
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTE	Cadeia de Transporte de Elétrons
DC	Doença de Crohn
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DE	Disfunção endotelial
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DMT2	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EA.hy926	Células do endotélio vascular humano
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EN	Estresse nitrosativo
EO	Estresse oxidativo
ER	Espécies Reativas
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ON·	Óxido nítrico

O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{·-}	Ânion superóxido
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
IL1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
TNF- α	Fator de necrose tumoral
GLUT-4	Transportador de glicose 4
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
pHi	pH intracelular
NFk- β	Fator nuclear kappa B
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
FADH	Dinucleótido de flavina e adenina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LDH	Lactato desidrogenase
NOS	Óxido nítrico sintase
ADP-ribose	Poli APD ribose
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSSG	Glutationa oxidada
MDA	Malondialdeído
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
AMPK	Papel da proteína quinase ativada por AMP
P53	Proteína de tumor

LISTA DE TABELAS

Tabela S1. Quantificação de compostos.....	35
Tabela S2. Compostos fenólicos identificados.....	35
Tabela S3. Atividade antioxidante da Pitaya comparada a outros antioxidantes.	35
Tabela S4. Capacidade de inibição enzimática dos extratos.	35
Tabela 1. Marcadores de EO e defesas antioxidantes.....	54
Tabela 2. Atividade mitocondrial dos Complexos I e II e níveis de ATP	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A 1B e 1C. Vista externa, interna, e características da planta	12
Figura S1. Cromatogramas casca e polpa da Pitaya	36
Figura S2. Viabilidade celular em células CACO-2 em diferentes concentrações dos extratos por 24hs.....	36
Figura S3. Evolução da morfologia de células CACO-2 por 24hs.....	37
Figura S4. Viabilidade celular, níveis de ROS e ON.	38
Figura 1A 1B. Definição da concentração de glicose e metformina em 24hs.....	52
Figura 2A. Diferentes concentrações de extrato da polpa tratados em 24, 48 e 72hs.....	52
Figura 2B. Diferentes concentrações de extrato da casca tratados em 24, 48 e 72hs.....	52
Figura 3A 3B 3C. Efeitos na viabilidade, proliferação celular, níveis de LDH.....	53
Figura 4 A 4B 4C 4D. Potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS intracelular, níveis de acidose intracelular e apoptose tardia.....	57
Figura 5A 5B 5C 5D. Expressão celular COX-2, NFk- β , ON e NLRP3	59
Figura 6. Histogramas de citometria.....	69
Figura 8. Análise de componente principal.....	59
Figura 9. Modulação da hiperglicemia pela Pitaya em combinação com a metformina..	65

RESUMO

A pitaya da polpa vermelha (*Hylocereus lemairei* (Hook.) Britton & Rose) é uma fruta exótica que está despertando cada vez mais a atenção da comunidade científica devido sua ação antioxidante e anti-inflamatória. Os antioxidantes contribuem para a manutenção do equilíbrio entre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e a capacidade de defesa celular, prevenindo o desencadeamento do estresse oxidativo, o qual está associado com diversas doenças, incluindo o Diabetes Mellitus (DM). Essa é uma doença inflamatória e de curso crônico e sabe-se que, mesmo em pacientes medicados, o estresse oxidativo persiste, e pode colaborar para a progressão da doença (comorbidades). Esse projeto teve como objetivo produzir e caracterizar extratos de casca e polpa da pitaya vermelha (*H. lemairei*), investigando seus efeitos biológicos em células intestinais CACO-2 diferenciadas em enterócitos e em células endoteliais EA.hy926 expostas à alta concentração de glicose (35 mM). A capacidade dos extratos de inibir enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (α -amilase e α -glicosidase) e de lipídeos (lipase pancreática) foi também avaliada, e os resultados foram comparados a Ascarbose e Orlistat, respectivamente. A metformina, medicamento de primeira linha usado no tratamento farmacológico do DM tipo 2 (DM2), foi utilizada para fins de comparação. Os extratos de casca e polpa de pitaya exibiram atividade antioxidante superior à da vitamina C e do ácido clorogênico, dois reconhecidos antioxidantes. A atividade antioxidante do extrato da casca foi cerca de 2 x superior à da polpa. Ambos os extratos exibiram significativo conteúdo antocianínico e fenólico, sendo o ácido clorogênico (12.705 mg/100g para a casca e 8.352 mg/100g para a polpa) e o flavonoide naringina (12.010 mg/100g para a casca e 7.177 mg/100g para a polpa), os mais abundantes. Hesperidina, ácido ferúlico e catequinas foram encontradas apenas no extrato da casca. Os extratos exibiram um melhor desempenho frente a inibição da enzima α -glicosidase (> 60% inibição) quando comparados ao fármaco Ascarbose, além de uma inibição similar ao fármaco Orlistate frente à lipase pancreática (> 90% inibição), indicando uma ação direcionada ao intestino. Observou-se, ainda, uma discreta inibição na atividade da α -amilase (< 10% inibição) pelos extratos. Ambos foram eficazes na atenuação do estresse oxidativo (níveis de ERO), inflamação (ON) e redução da viabilidade (MTT) causada pela hiperglicemia, tanto em enterócitos, quanto em células endoteliais. Especificamente em células endoteliais observou-se alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), pH intracelular (pHi), apoptose e atividade mitocondrial (CI, CII e ATP sintase), bem como aumento nos níveis de lactato e lipoperoxidação. Paralelamente, níveis de expressão de COX-2, Nfk- β e NLRP3 foram aumentados no grupo hiperglicêmico. Além disso, enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e conteúdo de proteína sulfidrilada foram depletados. Ambos os extratos foram capazes de reverter essas alterações, todavia, seus efeitos

quando comparados à metformina *per se* e quando utilizados em associação, foram mais expressivos. Dados de uma análise de componentes principais (PCA) indicaram que o extrato da casca exibiu melhor efeito frente aos distúrbios oxidativo-inflamatórios causados pela hiperglicemia em endotélio. Esses achados contribuirão para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas coadjuvantes no tratamento do DM2 e suas complicações.

Palavras-chave: Pitaya, compostos fenólicos, diabetes, células intestinais, células endoteliais.

ABSTRACT

Red-fleshed Pitaya (*Hylocereus lemairei* (Hook.) Britton & Rose) is an exotic fruit that is increasingly attracting the scientific community's attention due to its antioxidant and anti-inflammatory action. Antioxidants contribute to maintaining the balance between the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and cellular defense capacity, preventing oxidative stress, which is associated with several diseases, including Diabetes Mellitus (DM). DM is an inflammatory and chronic disease and it is known that, even in medicated patients, oxidative stress persists and could collaborate for disease progression (comorbidities). This study aimed to produce and characterize peel and pulp extracts of red pitaya (*H. lemairei*) and to investigate their biological effects on intestinal (CACO-2) and endothelial (EA.hy926) cells exposed to high glucose concentration (35mM). Extracts capacity from inhibiting enzymes involved in carbohydrate metabolism (α -amylase and α -glucosidase) and lipids (pancreatic lipase) were also evaluated. The results were compared to Ascarbose and Orlistat, respectively. Metformin, the main drug used in the pharmacological treatment of DM type 2 (DM2), was used for comparison. Both extracts showed antioxidant activity superior to vitamin C and chlorogenic acid, two recognized antioxidants. The antioxidant activity of pitaya peel extract was about two times higher than pulp. Both exhibited significant anthocyanin and phenolic content, chlorogenic acid (12,705mg/100g for the peel and 8,352 mg/100g for the pulp) and naringin flavonoid (12,010 mg/100g for the peel and 7,177 mg/100g for the pulp) the most abundant. Hesperidin, ferulic acid, and catechins were found only in peel extract. Extracts exhibited a better performance against α -glucosidase enzyme inhibition (> 60% inhibition) when compared to Ascarbose, in addition to a similar inhibition to the Orlistat against lipase pancreatic activity (>90% inhibition), indicating an action directed to the gut. It was observed a slight inhibition of α -amylase activity (< 10% inhibition) by the extracts. Both were effective in attenuating oxidative stress (ROS levels), inflammation (ON), and viability reducing (MTT) caused by hyperglycemia, both in enterocytes and endothelial cells. Specifically, in endothelial cells, it was observed alterations in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), intracellular pH (pHi), apoptosis, and mitochondrial activity (CI, CII, and ATP synthase), as well as increased levels of lactate and lipoperoxidation. At the same time, COX-2, Nfk- β , and NLRP3 expression levels were increased in the hyperglycemic group. In addition, antioxidant enzymes (SOD and CAT) and sulfhydryl protein content were depleted. Both extracts were able to reverse these changes, however, their effects when compared to metformin *per se* and when used in combination, were more expressive. Data from a principal component analysis (PCA) indicate that peel extract showed a better effect against oxidative-inflammatory alterations

caused by endothelium hyperglycemia. These findings will contribute to the development of new supporting therapeutic approaches in the treatment of DM2 and complications.

Keywords: Pitaya, phenolic compounds, diabetes, intestinal cells, endothelial cells.