



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências
de Alimentos

**DESVENDANDO O POTENCIAL
HIPOLIPEMIANTE DE *GYMNEMA SYLVESTRE*:
ESTUDOS *IN VITRO*, *IN VIVO* e *IN SILICO***

THALITA FALEIROS DEMITO SANTOS

THALITA FALEIROS DEMITO SANTOS

**DESVENDANDO O POTENCIAL
HIPOLIPEMIANTE DE *GYMNEMA SYLVESTRE*:
ESTUDOS *IN VITRO*, *IN VIVO* e *IN SILICO***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título doutor em Ciência de Alimentos.

Maringá

2025

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi

Thalita Faleiros Demito Santos

**"DESVENDANDO O POTENCIAL HIPOLIPEMIANTE DE
GYMNEMA SYLVESTRE: ESTUDOS IN VITRO, IN
VIVO E IN SILICO".**

Tese apresentada a Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, para obtenção do grau de Doutor em Ciências de Alimentos.

Documento assinado digitalmente
 **GRASIELE SCARAMAL MADRONA**
Data: 12/08/2025 16:09:22-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Grasiela Scaramal Madrona

Documento assinado digitalmente
 **DOUGLAS LOPES DE ALMEIDA**
Data: 01/08/2025 15:42:18-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Douglas Lopes de Almeida

Documento assinado digitalmente
 **ANACHARIS BABETO DE SA NAKANISHI**
Data: 15/08/2025 10:49:49-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Anacharis Babeto Sa-Nakanishi
Orientador

Documento assinado digitalmente
 **ANA GABRIELA DA SILVA ANTHERO RISSATO**
Data: 01/08/2025 13:06:48-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Ana Gabriela Anthero

Documento assinado digitalmente
 **JURANDIR FERNANDO COMAR**
Data: 01/08/2025 15:21:33-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Jurandir Fernando Comar

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S237d Santos, Thalita Faleiros Demito
Desvendando o potencial hipolipemiante de *Gymnema Sylvestre* : estudos *in vitro*, *in vivo* e *in silico* / Thalita Faleiros Demito Santos. -- Maringá, PR, 2025.
87 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2025.

1. Inibição da lipase. 2. Absorção de gordura. 3. Mecanismos cinéticos. 4. Docking molecular. 5. Dinâmica molecular. I. Sá-Nakanishi, Anacharis Babeto de , orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDD 23.ed. 664

Marinalva Aparecida Spolon Almeida - 9/1094

BIOGRAFIA

Thalita Faleiros Demito Santos nasceu em Maringá, Paraná, Brasil, no dia 12 de novembro de 1980. Possui graduação em Farmácia - Bioquímica pela Universidade Estadual de Maringá e mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Atualmente é doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos na Universidade Estadual de Maringá – UEM, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi. Possui vasta experiência em farmácia comercial e atualmente é professora do curso de graduação em farmácia na Universidade Paranaense – UNIPAR.

Dedico este trabalho

Ao meu filho Henrique, por ser o meu combustível diário de ânimo e empolgação, que me ajuda a lutar e vencer todos os obstáculos da vida adulta. Filho é presente de Deus e o amor que sinto por ele é incondicional.

Ao meu esposo Sandro, amigo, parceiro de vida, compreensivo e incentivador dos meus estudos. Seu apoio foi sempre de extrema importância e és o meu maior exemplo para estudar cada dia mais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida, pela minha saúde, e por ter me mantido em pé por todos os momentos até aqui.

Aos meus pais Bernardino e Geni, que nunca mediram esforços para contribuir com os meus estudos e pela educação a qual me foi dada. Mesmo distante, sempre estiveram em meu coração e em meus pensamentos. Por terem me “aguentado” em seu lar durante “n” dias em que precisei estar em Maringá para a realização das aulas, pesquisas, apresentações e afins.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a Anacharis Babeto de Sá-Nakanischi, um agradecimento mais que especial, pois desde o primeiro dia que a conheci na universidade, sempre foi extremamente prestativa e competente. Além de orientadora, é uma grande amiga e um presente que a faculdade de Farmácia me deu. Que Deus te abençoe muito! Sem você este trabalho não existiria.

Aos outros alunos orientados da Prof^a. Dr^a. Anacharis Babeto de Sá-Nakanischi, em especial ao Gustavo Henrique Souza, por contribuir imensamente nos experimentos realizados no laboratório no decorrer desses anos.

Aos meus queridos alunos, que me incentivam a estudar cada dia mais e poder passar um conhecimento mais aprofundado a eles, fica o meu sincero agradecimento e homenagem.

A todos os envolvidos no Laboratório de Metabolismo Hepático, desde os professores até aos alunos, por todo o incentivo e liberação para a realização dos ensaios laboratoriais.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos desta universidade, por toda a colaboração durante esses anos, meus sinceros agradecimentos.

À minha amada vó Vitória (*in memoriam*), que sempre esteve presente desde o primeiro dia que ingressei na graduação até ser chamada pelo nosso Pai.

Aos meus familiares e amigos, que me ajudaram de alguma forma durante esses anos na conclusão de mais essa meta atingida em minha carreira acadêmica.

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado é apresentada na forma de dois artigos científicos, sendo um deles recentemente publicado:

- 1 Thalita Faleiros Demito Santos, Gustavo H. Souza, Beatriz Paes Silva, Gabriel Arcanjo Viana Neto, Milena Thais Francisco da Silva, Cristina Giatti Marques de Souza, Livia Bracht, Jurandir F. Comar, Rosane M. Peralta, Adelar Bracht, Anacharis B. Sá-Nakanishi. ***An in vitro, in vivo and in silico assessment of fat absorption inhibition by a gymnemic acid rich extract of *Gymnema sylvestre* leaves.*** Journal of Ethnopharmacology. Classificado com Qualis A1 na área de Ciência de Alimentos pela CAPES.

- 2 Thalita Faleiros Demito Santos, Gustavo H. Souza, Beatriz Paes Silva, Gabriel Arcanjo Viana Neto, Luiz A.N. Pessoa, Tiane C. Finimundy, Lilian Barros, Paulo C. de Freitas Mathias, Jurandir F. Comar, Livia Bracht, Rosane M. Peralta, Adelar Bracht, Anacharis B. Sá-Nakanishi. **Hipolipidemic mechanisms of *Gymnema sylvestre* in tiloxapol induced hyperlipidemia,** a ser submetido.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO: A hiperlipidemia, caracterizada por níveis elevados de triacilgliceróis e colesterol plasmáticos, é um fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, as quais permanecem como a principal causa de mortalidade global segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). As doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 17,9 milhões de mortes anuais (WHO, 2021). Evidências de ensaios clínicos demonstram que intervenções hipolipemiantes eficazes reduzem significativamente a mortalidade por doença coronariana. No entanto, tratamentos atuais, como fibratos, niacina, estatinas e sequestrantes de ácidos biliares, estão associados a uma série de efeitos colaterais, incluindo mialgias severas, distúrbios gastrointestinais, disfunções hepáticas e renais, além de prejuízos à neurotransmissão cerebral com o uso prolongado. Diante dessas limitações, cresce o interesse na busca por compostos bioativos naturais com capacidade de modular o metabolismo lipídico de forma pleiotrópica. *Gymnema sylvestre* é uma planta nativa tradicionalmente usada na medicina ayurvédica para tratar diabetes, além de mostrar efeitos promissores contra obesidade e dislipidemias. Suas folhas contêm cerca de 18 tipos de ácidos gimnêmicos, considerados os principais compostos ativos, especialmente em extratos concentrados como o “*G. sylvestre* 75”, com 75% desses ácidos. Embora não seja aprovado como medicamento na Europa, é amplamente utilizado como suplemento alimentar. Estudos em animais mostram que o extrato reduz glicose, colesterol e triglicerídeos, melhora a secreção de insulina e a regeneração das células pancreáticas, e inibe a absorção intestinal de glicose. No entanto, pesquisas anteriores avaliaram seus efeitos apenas em tratamentos prolongados e associados com doenças já instaladas como diabetes ou obesidade.

OBJETIVOS: O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de *G. sylvestre* sobre o controle hiperlipidêmico por meio de abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. O Artigo 1 teve como objetivo elucidar os mecanismos subjacentes à inibição da absorção de gorduras pelos animais. O artigo 2 teve como objetivo avaliar os efeitos preventivos do extrato de *G. sylvestre* 75 no metabolismo lipídico e no estado oxidativo de animais com hiperlipidemia aguda induzida por tiloxapol.

MATERIAL E MÉTODOS: O extrato concentrado rico em ácidos gimnêmicos obtido das folhas de *Gymnema sylvestre* (*Gymnema sylvestre* 75) foi adquirido de uma farmácia de manipulação local (Farmácia São Paulo – Maringá, PR), da empresa farmacêutica SM. No Artigo 1, os experimentos *in vivo* foram conduzidos com camundongos machos da linhagem Swiss (*Mus musculus*), com peso entre 28 e 32 g (aproximadamente 40 dias de idade), mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 horas e alimentados *ad libitum* com dieta padrão de laboratório (Nuvilab, Colombo, Brasil). Foram realizados testes de tolerância oral a triglicerídeos, amido, glicose e ácido oleico, e complementados por ensaios enzimáticos *in vitro* e simulações *in silico*. A atividade da lipase pancreática foi monitorada espectrofotometricamente, variando-se simultaneamente a concentração do extrato (50 a 1000 µg/mL) e do substrato p-nitrofenilpalmitato (até 600 µM). Estudos de acoplamento molecular (docking) e dinâmica molecular foram realizados entre a lipase pancreática e diferentes fitoquímicos presentes no extrato, com o objetivo de identificar os compostos bioativos responsáveis pela atividade inibitória da lipase.

No Artigo 2, avaliou-se o potencial antioxidante do extrato por meio de três ensaios químicos: capacidade quelar o cátion radical ABTS, DPPH e capacidade de reduzir o íon férrico (FRAP). O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado por ensaio colorimétrico com reagente de Folin-Ciocalteu, e o perfil fitoquímico detalhado foi obtido por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS). A predição das propriedades farmacocinéticas e similaridade com drogas dos compostos presentes no extrato foi realizada

com base em modelos computacionais da plataforma SwissADME. Para o modelo *in vivo* de hiperlipidemia, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (240 a 290 g; aproximadamente 80 dias), tratados com o extrato padronizado de *G. sylvestre* (400 mg/kg) por três dias consecutivos. No terceiro dia, os animais receberam uma única dose de tiloxapol (400 mg/kg, via intraperitoneal) e foram submetidos à eutanásia 24 horas após. Foram realizados testes de tolerância oral à glicose (1,5 g/kg) e ao piruvato (2 g/kg). Em outro grupo experimental, os animais em jejum de 18 horas foram anestesiados (xilazina e cetamina - 90 + 9 mg/kg), o sangue foi coletado com anticoagulante (EDTA) e o fígado removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. O plasma foi separado por centrifugação e utilizado para dosagens bioquímicas de glicose, perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos) e insulina. Com base nesses parâmetros, foram calculados os índices HOMA-IR e HOMA- β , bem como outros marcadores de resistência à insulina e risco cardiovascular, como o índice TyG, colesterol não-HDL e a razão triglicerídeos/HDL. O estado redox hepático e plasmático foi avaliado por marcadores de estresse oxidativo, incluindo peroxidação lipídica (TBARS), conteúdo de grupos carbonila em proteínas, e por sistemas antioxidantes enzimáticos (catalase e superóxido dismutase-SOD) e não enzimáticos (tióis reduzidos). Com o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos no potencial hipolipemiante do extrato, foram realizados estudos de docking molecular entre os principais fitoquímicos identificados e os receptores PPAR- γ e PPAR- α , utilizando os softwares AutoDock Vina e GOLD. Os resultados foram expressos por meio do escore médio relativo (MRS), calculado a partir dos escores obtidos em quatro simulações independentes em cada programa. A estabilidade e qualidade das interações moleculares foram posteriormente avaliadas por simulações de dinâmica molecular, realizadas com os softwares NAMD2/VMD nos servidores do CENAPAD/UNICAMP. Interpolação numérica foi utilizada para determinar concentração ou dose responsável por metade do máximo efeito observado pelo extrato, no programa Scientist®. O mesmo programa foi utilizado para ajuste das velocidades por meio de procedimentos de mínimos quadrados e análises estatísticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: No artigo 1, o extrato de *Gymnema sylvestre* inibiu de forma progressiva a atividade da lipase pancreática com o aumento da concentração, embora não tenha alcançado inibição total, mesmo em altas concentrações. A interpolação numérica determinou uma IC₅₀ de 484,6 µg/mL. A análise cinética, variando simultaneamente a concentração do extrato e do substrato, indicou que os dados experimentais ajustam-se melhor a uma equação de inibição do tipo parabólica incompleta, com um valor de K_{i1} aproximadamente 2,2 vezes menor que K_{i2}. Os resultados dos níveis de triglicerídeos sanguíneos, após administração de azeite em animais, indicam fortemente que o extrato foi capaz de inibir a absorção de gorduras pelas células intestinais. A sensibilidade da inibição foi elevada, com um ID₅₀ de 41,14 mg/kg. Testes de tolerância ao ácido oleico confirmaram a inibição da absorção desse ácido graxo nos animais. Dessa forma, a inibição da lipase pancreática não explica isoladamente a redução na absorção de triglicerídeos; o extrato também inibe o sistema de transporte de ácidos graxos pelas células intestinais, contribuindo para seu efeito hipolipemiante. Adicionalmente, o extrato não apresentou inibição da amilase pancreática, nem interferiu na absorção de amido e glicose em animais, ao menos em concentrações até 1000 µg/mL. Simulações de docking molecular, realizadas com fitoquímicos presentes no extrato conforme dados da literatura e análise química do extrato comercial, mostraram que a gymnemagenina, aglicona do ácido gimnêmico, apresentou potencial de interação com o sítio ativo da lipase superior ao inibidor referência orlistat. O extrato utilizado é um concentrado contendo mais de 75% de ácidos gimnêmicos, o que sugere que estes compostos, pela sua abundância, têm maior potencial para a inibição da absorção de gorduras do que os polifenóis presentes em menor quantidade.

No artigo 2, a caracterização química do extrato demonstrou significativa capacidade antioxidante, com IC₅₀ de 83,69 µg/mL e 217,99 µg/mL nos ensaios ABTS e DPPH, respectivamente. O extrato também apresentou constante de redução do íon Fe³⁺ (kFRAP) de

0,017 min⁻¹. O conteúdo fenólico total foi quantificado em 29 mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. O perfil fenólico revelou uma alta concentração de flavonoides (9,95 mg/g), principalmente derivados das agliconas kaempferol e quercetina, sendo o ácido protocatecuico o ácido fenólico mais abundante (0,79 mg/g). O tratamento com o extrato de *G. sylvestre* atenuou significativamente a hiperlipidemia induzida por tiloxapol, evidenciado pela redução nos níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total e VLDL. Também houve redução da glicemia de jejum, normalização da intolerância à glicose (oGTT) e resistência à insulina, demonstrada pela restauração do teste de tolerância ao piruvato, índice HOMA-IR e razão triglicerídeos/glicose. Embora o extrato não tenha aumentado a insulina sérica, promoveu a normalização da capacidade secretória das células β -pancreáticas, conforme indicado pelo índice HOMA- β . Além disso, o extrato reverteu o aumento de proteínas carboniladas no plasma e fígado para níveis semelhantes aos controles, normalizou a atividade das enzimas antioxidantes catalase e SOD no fígado, e restaurou os grupamentos tiólicos reduzidos no plasma de animais hiperlipidêmicos. Em estudos de docking molecular, gymnemagenina, kaempferol, quercetina e ácido protocatecuico apresentaram afinidade relativa baixa pelos PPAR γ e PPAR α . Entretanto, simulações de dinâmica molecular (50 ns) indicaram estabilidade estrutural e conformacional da gymnemagenina nos sítios ativos desses receptores, similar aos inibidores clássicos, sem causar desestabilização do complexo ligante-receptor. Por fim, o extrato *G. sylvestre* 75 demonstrou segurança e boa tolerabilidade em modelos murinos, indicando seu perfil seguro na dose administrada.

CONCLUSÕES: O extrato de *Gymnema sylvestre*, um produto de custo relativamente baixo, demonstrou efeitos pleiotrópicos promissores na redução da absorção de gorduras, da hiperlipidemia, da hiperglicemia e do estresse oxidativo, todos fatores intimamente relacionados à síndrome metabólica. Esses efeitos terapêuticos parecem resultar da atuação conjunta de múltiplos mecanismos, incluindo: (1) inibição da atividade da lipase pancreática, (2) bloqueio do transporte de ácidos graxos pelas células intestinais e (3) modulação do metabolismo celular, por meio da melhora da sensibilidade à insulina e ativação dos receptores nucleares PPAR α e PPAR γ . Diante disso, o extrato de *G. sylvestre* pode ser considerado uma preparação segura e de ação multifatorial, com potencial terapêutico complementar no controle da dislipidemia e na prevenção de doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: inibição da lipase; mecanismos cinéticos; dinâmica molecular; absorção de gordura; docking molecular.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION: Hyperlipidemia, characterized by elevated levels of plasma triacylglycerols and cholesterol, is a well-established risk factor for the development of cardiovascular diseases, which remains the leading cause of global mortality. According to the World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases are responsible for approximately 17.9 million deaths annually (WHO, 2021). Evidence from clinical trials shows that effective lipid-lowering interventions significantly reduce mortality from coronary heart disease. However, current treatments, such as fibrates, niacin, statins, and bile acid sequestrants, are associated with a number of side effects, including severe myalgia, gastrointestinal disorders, liver and kidney dysfunction, and damage to brain neurotransmission with prolonged use. Given these limitations, there is growing interest in the search for natural bioactive compounds capable of modulating lipid metabolism in a pleiotropic manner. *Gymnema sylvestre* is a native plant traditionally used in Ayurvedic medicine to treat diabetes, in addition to showing promising effects against obesity and dyslipidemia. Its leaves contain about 18 types of gymnemic acids, considered the main active compounds, especially in concentrated extracts such as “G. sylvestre 75,” which contains 75% of these acids. Although it is not approved as a medicine in Europe, it is widely used as a dietary supplement. Animal studies show that the extract reduces glucose, cholesterol, and triglycerides, improves insulin secretion and pancreatic cell regeneration, and inhibits intestinal glucose absorption. However, previous research has only evaluated its effects in prolonged treatments associated with established diseases such as diabetes or obesity.

OBJECTIVES: The objective of this study was to evaluate the effects of *G. sylvestre* on hyperlipidemic control through *in silic*, *in vitro*, and *in vivo* approaches. Article 1 aimed to elucidate the mechanisms underlying the inhibition of fat absorption by animals. Article 2 aimed to evaluate the preventive effects of G. sylvestre 75 extract on lipid metabolism and oxidative status in animals with acute hyperlipidemia induced by tiloxapol.

MATERIALS AND METHODS: The concentrated extract rich in gymnemic acids obtained from the leaves of *Gymnema sylvestre* (Gymnema sylvestre 75) was purchased from a local compounding pharmacy (Farmácia São Paulo – Maringá, PR), from the pharmaceutical company SM. In Article 1, *in vivo* experiments were conducted with male Swiss mice (*Mus musculus*) weighing between 28 and 32 g (approximately 40 days old), kept in a 12/12 hour light/dark cycle and fed ad libitum with a standard laboratory diet (Nuvilab, Colombo, Brazil). Oral tolerance tests were performed for triglycerides, starch, glucose, and oleic acid, and supplemented by *in vitro* enzymatic assays and *in silic* simulations. Pancreatic lipase activity was monitored spectrophotometrically, simultaneously varying the concentration of the extract (50 to 1000 µg/mL) and the substrate p-nitrophenylpalmitate (up to 600 µM). Molecular docking and molecular dynamics studies were performed between pancreatic lipase and different phytochemicals present in the extract, with the aim of identifying the bioactive compounds responsible for lipase inhibitory activity. In Article 2, the antioxidant potential of the extract was evaluated using three chemical assays: ability to chelate the radical cation ABTS, DPPH, and ability to reduce ferric ions (FRAP). The phenolic compound content was determined by colorimetric assay with Folin-Ciocalteu reagent, and the detailed phytochemical profile was obtained by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS). The prediction of

the pharmacokinetic properties and similarity to drugs of the compounds present in the extract was performed based on computational models from the SwissADME platform. For the in vivo model of hyperlipidemia, male Wistar rats (240 to 290 g; approximately 80 days old) were treated with the standardized extract of *G. sylvestre* (400 mg/kg) for three consecutive days. On the third day, the animals received a single dose of tyloxapol (400 mg/kg, intraperitoneally) and were euthanized 24 hours later. Oral glucose tolerance tests (1.5 g/kg) and pyruvate tolerance tests (2 g/kg) were performed. In another experimental group, animals fasted for 18 hours, were anesthetized (xylazine and ketamine - 90 + 9 mg/kg), blood was collected with anticoagulant (EDTA), and the liver was removed and immediately frozen in liquid nitrogen. The plasma was separated by centrifugation and used for biochemical measurements of glucose, lipid profile (total cholesterol, HDL, LDL, VLDL, and triglycerides), and insulin. Based on these parameters, HOMA-IR and HOMA- β indices were calculated, as well as other markers of insulin resistance and cardiovascular risk, such as the TyG index, non-HDL cholesterol, and the triglycerides/HDL ratio. Hepatic and plasma redox status was assessed by markers of oxidative stress, including lipid peroxidation (TBARS), carbonyl group content in proteins, and by enzymatic (catalase and superoxide dismutase-SOD) and non-enzymatic (thiols) antioxidant systems. In order to elucidate the molecular mechanisms involved in the extract's lipid-lowering potential, molecular docking studies were performed between the main phytochemicals identified and the PPAR γ and PPAR α receptors, using AutoDock Vina and GOLD software. The results were expressed using the mean relative score (MRS), calculated from the scores obtained in four independent simulations in each program. The stability and quality of molecular interactions were subsequently evaluated by molecular dynamics simulations, performed with NAMD2/VMD software on CENAPAD/UNICAMP servers. Numerical interpolation was used to determine the concentration or dose responsible for half of the maximum effect observed by the extract, using the Scientist® program. The same program was used to adjust the speeds using least squares procedures and statistical analyses.

RESULTS AND DISCUSSION: In article 1, *Gymnema sylvestre* extract progressively inhibited pancreatic lipase activity with increasing concentration, although it did not achieve total inhibition even at high concentrations. Numerical interpolation determined an IC₅₀ of 484.6 μ g/mL. Kinetic analysis, simultaneously varying the concentration of the extract and substrate, indicated that the experimental data best fit an incomplete parabolic inhibition equation, with a Ki1 value approximately 2.2 times lower than Ki2. The results of blood triglyceride levels after olive oil administration in animals strongly indicate that the extract was able to inhibit fat absorption by intestinal cells. The sensitivity of the inhibition was high, with an ID₅₀ of 41,14 mg/kg. Oleic acid tolerance tests confirmed the inhibition of the absorption of this fatty acid in animals. Thus, pancreatic lipase inhibition alone does not explain the reduction in triglyceride absorption; the extract also inhibits the transport system of fatty acids by intestinal cells, contributing to its lipid-lowering effect. In addition, the extract did not inhibit pancreatic amylase or interfere with starch and glucose absorption in animals, at least at concentrations up to 1000 μ g/mL. Molecular docking simulations, performed with phytochemicals present in the extract according to literature data and chemical analysis of the commercial extract, showed that gymnemagenin, the aglycone of gymnemic acid, had a higher potential for interaction with the active site of lipase than the reference inhibitor orlistat. The extract used is a concentrate containing more than 75% gymnemic acids, which suggests that these compounds, due to their abundance, have greater potential for inhibiting fat absorption than the polyphenols present in smaller quantities. In Article 2, the chemical characterization of the extract demonstrated significant antioxidant capacity, with IC₅₀

values of 83,69 $\mu\text{g/mL}$ and 217,99 $\mu\text{g/mL}$ in the ABTS and DPPH assays, respectively. The extract also presented a Fe^{3+} ion reduction constant (kFRAP) of 0.017 min^{-1} . The total phenolic content was quantified at 29 mg gallic acid equivalents per gram of extract. The phenolic profile revealed a high concentration of flavonoids (9,95 mg/g), mainly derived from the aglycones kaempferol and quercetin, with protocatechuic acid being the most abundant phenolic acid (0,79 mg/g). Treatment with *G. sylvestre* extract significantly attenuated tiloxapol-induced hyperlipidemia, as evidenced by reduced serum levels of triacylglycerols, total cholesterol, and VLDL. There was also a reduction in fasting blood glucose, normalization of glucose intolerance (oGTT), and insulin resistance, demonstrated by the restoration of the pyruvate tolerance test, HOMA-IR index, and triglyceride/glucose ratio. Although the extract did not increase serum insulin, it promoted normalization of pancreatic β -cell secretory capacity, as indicated by the HOMA- β index. In addition, the extract reversed the increase in plasma and liver carbonyl proteins to levels similar to controls, normalized the activity of the antioxidant enzymes catalase and SOD in the liver, and restored reduced thiol groups in the plasma of hyperlipidemic animals. In molecular docking studies, gymnemagenin, kaempferol, quercetin, and protocatechuic acid showed relatively low affinity for PPAR γ and PPAR α . However, molecular dynamics simulations (50 ns) indicated structural and conformational stability of gymnemagenin at the active sites of these receptors, similar to classical inhibitors, without causing destabilization of the ligand-receptor complex. Finally, the *G. sylvestre* 75 extract demonstrated safety and good tolerability in murine models, indicating its safe profile at the administered dose.

CONCLUSIONS: *Gymnema sylvestre* extract, a relatively inexpensive product, has shown promising pleiotropic effects in reducing fat absorption, hyperlipidemia, hyperglycemia, and oxidative stress, all factors closely related to metabolic syndrome. These therapeutic effects appear to result from the combined action of multiple mechanisms, including: (1) inhibition of pancreatic lipase activity, (2) blocking the transport of fatty acids by intestinal cells and (3) modulating cellular metabolism by improving insulin sensitivity and activating PPAR α and PPAR γ nuclear receptors. Given this, *G. sylvestre* extract can be considered safe preparation with multifactorial action and complementary therapeutic potential in the control of dyslipidemia and prevention of cardiovascular diseases.

Keywords: lipase inhibition; kinetic mechanisms; molecular dynamics; fat absorption; molecular docking.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	8
GENERAL ABSTRACT.....	11

ARTIGO 1: Uma avaliação *in vitro*, *in vivo* e *in silico* da inibição de absorção de gordura por um extrato rico em ácido gymnêmico de folhas de *Gymnema sylvestre*

Resumo.....	16
1. Introdução.....	17
2. Materiais e Métodos.....	19
2.1. Produtos Químicos.....	19
2.2. Extrato.....	19
2.3. Animais.....	19
2.4. Ensaio e cinética da lipase pancreática.....	19
2.5. Ensaio de α -amilase pancreática.....	20
2.6. Teste de tolerância oral a triglicerídeos em camundongos.....	20
2.7. Triglicerídeos plasmáticos após administração de ácido oleico.....	20
2.8. Testes de tolerância ao amido e à glicose em camundongos.....	21
2.9. Avaliação <i>in silico</i> dos potenciais inibidores da lipase	21
2.10. Cálculos e análise estatística.....	22
3. Resultados	23
3.1. Atividade da lipase pancreática e cinética da inibição.....	23
3.2. Efeitos sobre a absorção dos triglicerídeos pelas células intestinais em camundongos.....	26
3.3. Efeitos sobre os níveis de triglicerídeos no sangue após administração de oleato em camundongos.....	28
3.4. Efeitos na tolerância ao amido e à glicose.....	29
3.5. Simulações de docking.....	30
4. Discussão.....	32
4.1. Aspectos introdutórios gerais.....	32
4.2. Inibição da lipase pancreática.....	33
4.3. Inibição da absorção de triglicerídeos.....	34
4.4. Compostos do extrato possivelmente envolvidos.....	35
4.5. Tentativas de traduzir os efeitos para os humanos.....	36
5. Conclusões.....	37
6. Referências.....	37

ARTIGO 2: Mecanismos hipolipidêmicos da *Gymnema sylvestre* na hiperlipidemia induzida pelo tiloxapol

Resumo.....	42
1. Introdução.....	43
2. Materiais e Métodos.....	45
2.1. Reagentes e extrato.....	45
2.2. Ensaio antioxidante e teor de fenólicos e aminoácidos no extrato.....	45
2.3. Quantificação do perfil fenólico do extrato de <i>Gymnema sylvestre</i>	46
2.4. Animais.....	47
2.5. Hiperlipidemia induzida por tiloxapol.....	47
2.6. Teste de tolerância oral à glicose e ao piruvato em animais.....	47

	17
2.7. Coleta de amostra de sangue e de fígado.....	48
2.8. Insulina plasmática e marcadores de resistência à insulina.....	48
2.9. Parâmetros bioquímicos	48
2.10. Parâmetros oxidativos.....	49
2.11. Toxicidade aguda.....	50
2.12. Previsão farmacocinética pelo SwissADME.....	50
2.13. Docking molecular.....	51
2.14. Dinâmica molecular.....	52
2.15. Cálculos e critérios estatísticos.....	52
3. Resultados.....	52
3.1. Atividade antioxidante e teores fenólicos totais do extrato de <i>Gymnema sylvestre</i>	52
3.2. Perfil fenólico do extrato de <i>Gymnema sylvestre</i>	53
3.3. Efeitos do extrato de <i>Gymnema sylvestre</i> no perfil lipídico e marcadores cardíacos em animais hiperlipidêmicos	54
3.4. Efeitos do extrato de <i>Gymnema sylvestre</i> no perfil glicêmico e nos marcadores de resistência à insulina em animais hiperlipidêmicos.....	56
3.5. Efeitos do extrato de <i>Gymnema sylvestre</i> sobre os marcadores do estado oxidativo no fígado e no sangue de animais hiperlipidêmicos.....	59
3.6. Screening virtual.....	60
3.7. Docking molecular.....	62
3.8. Dinâmica molecular da gymnemagenina.....	65
3.9. Toxicidade aguda.....	66
4. Discussão.....	67
5. Conclusão.....	74
6. Referências.....	75
Material suplementar	84

ARTIGO 1: Uma avaliação *in vitro*, *in vivo* e *in silico* da inibição de absorção de gordura por um extrato rico em ácido gimnêmico de folhas de *Gymnema sylvestre*

Thalita Faleiros Demito Santos, Gustavo H. Souza, Beatriz Paes Silva, Gabriel Arcanjo Viana Neto, Milena Thais Francisco da Silva, Cristina Giatti Marques de Souza, Livia Bracht, Jurandir F. Comar, Rosane M. Peralta, Adelar Bracht, Anacharis B. Sá-Nakanishi.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2025.120179>

Resumo

A hiperlipidemia é um distúrbio metabólico associado à síndrome metabólica, obesidade e diabetes. *Gymnema sylvestre* é uma planta usada na medicina popular ayurvédica para controlar hiperglicemia e hiperlipidemia. Esses efeitos foram respaldados por um bom número de investigações. O objetivo deste estudo foi elucidar os mecanismos subjacentes aos efeitos anti-hiperlipidêmicos de um extrato comercial derivado de folhas de *G. sylvestre*, padronizado com 75% ácidos gimnêmicos (“*Gymnema sylvestre* 75”). Foram realizados experimentos *in vivo*, *in vitro* e *in silico*, abrangendo diversos aspectos da absorção de gordura. Os ensaios da atividade da lipase pancreática revelaram que o extrato inibiu a mesma por meio de um mecanismo de inibição não competitivo e incompleto (cinética parabólica). A inibição máxima da enzima em concentrações saturantes de substrato atingiu 65%. Os testes de tolerância a triglicerídeos em camundongos indicaram inibição da absorção de gordura com um ID₅₀ de 41,4 mg/kg. Essa dose revelou-se significativamente inferior àquela prevista com base na inibição da lipase pancreática *in vitro* (IC₅₀ = 484,6 µg/mL), o que sugere a atuação de mecanismos adicionais além da simples inibição enzimática. Notavelmente, a inibição da absorção de ácido oleico livre pelo extrato indica que o bloqueio do transporte intestinal de ácidos graxos pode representar um mecanismo complementar. Estudos *in silico* corroboraram essa hipótese, ao demonstrarem alta afinidade de ligação da gymnemagenina e do gymnemosídeo B ao sítio ativo da lipase pancreática. Assim, a combinação da inibição da lipase com a interferência no transporte de ácidos graxos mediada pelo extrato de *Gymnema sylvestre* parece desempenhar papel crucial na redução da hiperlipidemia e no favorecimento do controle do peso corporal em modelos animais.

Palavras-chave: inibição da lipase; mecanismos cinéticos; absorção de triglicerídeos; absorção de ácidos graxos; encaixe molecular.

1. Introdução

A hiperlipidemia é uma doença metabólica crônica não transmissível resultante de alterações no metabolismo lipídico. É caracterizada por níveis séricos elevados de triglicerídeos e colesterol total (AshtaryLarky et al., 2021; Lamat et al., 2022). Esta condição é uma característica proeminente associada à obesidade e à síndrome metabólica, mas também um dos principais fatores de risco que, isoladamente ou em combinação, aceleram o desenvolvimento de doença coronariana e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Li et al., 2019). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 17,9 milhões de mortes a cada ano (OMS, 2021). Neste contexto, o controle da hiperlipidemia tem sido cada vez mais enfatizado como uma estratégia multifatorial para minimizar o risco de desenvolvimento de doenças crônicas relacionadas.

Embora muitos medicamentos sintéticos possam ser úteis na redução dos níveis séricos de lipídios, seus efeitos colaterais em tratamento a longo prazo têm sido frequentemente relatados. Plantas e seus derivados oferecem uma vantagem significativa devido aos diversos metabólitos secundários bioativos que possuem e seus distintos mecanismos de ação (Hilal et al., 2024). *G. sylvestre* é uma planta medicinal pertencente à família Asclepiadaceae, nativa da Índia, conhecida como “gurmar” (destruidor de açúcar). É amplamente reconhecida como um componente chave em inúmeras formulações tradicionais, tanto de ervas únicas ou múltiplas, usadas para tratamento da hiperglicemia e hiperlipidemia associada ao diabetes (Persaud et al., 1999). As atividades farmacológicas da *G. sylvestre* são predominantemente atribuídas aos ácidos gimnêmicos (AGs), gimnemagenina e um peptídeo chamado gurmarina (Sinsheimer et al., 1970). Os AGs são saponinas triterpenóides do tipo oleanano e são considerados os principais constituintes ativos da espécie. A qualidade dos extratos, formulações nutraceuticas e suplementos alimentares contendo *G. sylvestre* são atualmente avaliados com base em seus teores de AGs (Patil et al., 2013; Di Fabio et al., 2014).

O efeito anti-hiperglicêmico tem sido estudado com alguns detalhes. Foi demonstrado que a absorção de glicose pelas células intestinais pode ser inibida pelo extrato de *G. sylvestre* (Li et al., 2019; Kanetkar et al., 2007). Especificamente, os ácidos gimnêmicos V e XV, são inibidores do transportador de glicose dependente de sódio 1 (SGLT1) expresso em oócitos de *Xenopus laevis* (Wang et al., 2014). Os ratos tratados com ácido gimnêmico ou gimnemagenina

exibiram concentrações mais baixas de glicose no sangue em jejum e melhor tolerância oral à glicose e à insulina (Li et al., 2019; Ahamad et al., 2023). Estudos *in vitro* demonstraram que a gimnemagenina inibe de forma eficaz as principais enzimas envolvidas na absorção de amido, nomeadamente a α -amilase pancreática e a α -glucosidase. Embora estes resultados sugiram que a gimnemagenina poderia ajudar a controlar os níveis de açúcar no sangue retardando a digestão do amido, nada se tem esclarecido se este efeito ocorre realmente *in vivo*, uma vez que as concentrações necessárias para a metade da máxima inibição são relativamente elevadas (1-2 mg/mL). Em modelo *in vivo*, a suplementação dietética com extrato de *Gymnema sylvestre* (250 mg/kg e 500 mg/kg) em ratos diabéticos induzidos por aloxana promoveu uma significativa redução da glicemia, restabelecendo-a a níveis comparáveis aos do grupo controle em um curto período de intervenção (7 dias). Este efeito foi acompanhado pela restauração dos níveis séricos de insulina e por uma normalização quase completa dos parâmetros lipídicos plasmáticos, incluindo triglicerídeos, LDL, VLDL e HDL. Os resultados sugerem que tais efeitos são mediados, ao menos em parte, pela modulação da transcrição de genes envolvidos na via de sinalização da insulina (Muzaffar et al., 2023).

As condições hiperlipidêmicas que melhoraram no estudo supracitado (Muzaffar et al., 2023) estão associados à diabetes (Muzaffar et al., 2023). Isto levanta uma questão se esta ação também ocorre quando a hiperlipidemia está associada a outras causas. Em ratos alimentados com uma dieta rica em gorduras, o extrato de folhas de *G. sylvestre* (durante 3 semanas) não influenciou o peso corporal, mas diminuiu os níveis de colesterol total e de triglicerídeos plasmáticos (Shigematsu et al., 2001). Em outro estudo, uma fração rica em saponina de um extrato de folhas de *G. sylvestre* (100 mg/kg durante 8 semanas) diminuiu o peso corporal, o consumo de alimentos, o peso dos órgãos viscerais e os níveis de triglicerídeos, colesterol, lipoproteínas de baixa densidade, índice aterogênico, glicose e aumentou os níveis de lipoproteínas de alta densidade em ratos obesos, sem efeitos em ratos normais (Reddy et al., 2012). Estes resultados foram apoiados por evidências de inibição da lipase pancreática que foram confirmadas por um estudo mais recente (Manimegalai et al., 2006).

As observações resumidas acima sugerem fortemente que os extratos de *G. sylvestre* possa influenciar o metabolismo lipídico e potencialmente promover a perda de peso, dependendo do modelo de obesidade utilizado (Reddy et al., 2012; Shigematsu et al., 2001). Os primeiros estudos colocaram a hipótese de múltiplos mecanismos subjacentes a este efeito, incluindo a inibição da lipase intestinal, embora o mecanismo cinético, a força e a eficácia *in vivo* ainda não tenham sido totalmente caracterizadas (Shigematsu et al., 2001). Por estas razões, decidimos abordar estas questões com maior detalhe utilizando um extrato comercial rico em ácido gimnêmico de *G. sylvestre* (“*Gymnema sylvestre* 75”), amplamente utilizado na

medicina tradicional e em estudos prévios sobre as suas propriedades antidiabéticas (Jain et al., 2006; Shridhar et al., 2015; Turner et al., 2022). Nosso trabalho tem três objetivos principais: (1) caracterizar a cinética da ação do extrato sobre a lipase pancreática, (2) avaliar seu impacto na absorção dos triglicerídeos através de estudos *in vivo* em camundongos e (3) realizar simulações *in silico* para avaliar as propriedades de ligação da molécula central dos AGs e de outros princípios ativos ao sítio ativo da lipase pancreática.

2. Materiais e Métodos

2.1. Produtos Químicos

A lipase pancreática suína (tipo II) e o ácido oleico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, EUA). Orlistat e acarbose, isentos de excipientes, foram obtidos em uma farmácia local (Manipulação Farmácia São Paulo-Maringá, Pr). Todos os produtos químicos foram obtidos com o mais alto grau de pureza possível (>95%).

2.2. Extrato

O extrato concentrado das folhas de *G. sylvestre* (“*Gymnema sylvestre* 75”) foi obtido em uma farmácia local (Manipulação Farmácias São Paulo-Maringá, Pr) da marca farmacêutica SM. Data de fabricação: 03 de março de 2022, número do lote: 22C26-B025-090888, contendo 78,3% de ácido gymnêmico conforme relatório anexo ao material suplementar.

2.3. Animais

Para os testes de tolerância oral ao azeite, ao oleato, ao amido e à glicose foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus Swiss*) com 28 a 32 g de peso corporal (aproximadamente 40 dias). Os animais foram alimentados *ad libitum* com uma dieta padrão de laboratório (Nuvilab, Colombo, Brasil) e mantidos num ciclo regular de claro/escuro. Todos os experimentos foram realizados após um jejum prévio de 18 h. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos, cada um com 4 animais. Este número foi decidido com base na experiência prévia do grupo de pesquisa (Castilho et al., 2021; Da Silva et al., 2023; Souza et al., 2025). Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Protocolo número 9905181121).

2.4. Ensaio e cinética da lipase pancreática

A atividade da lipase pancreática foi determinada utilizando p-nitrofenil-palmitato como substrato (Castilho et al., 2021). A lipase pancreática suína foi ressuspensa em tampão Tris-HCl (600 U/mL). O meio de reação foi tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8,2) contendo p-

nitrofenil-palmitato em concentrações de até 600 μM . A concentração de *G. sylvestre* variou entre 50 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Após uma pré-incubação de 5 minutos a 37 °C, a reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL da solução enzimática e mantida durante 10 minutos. A reação foi interrompida mergulhando os tubos em água fervente e a concentração de p-nitrofenol foi medida espectrofotometricamente a 410 nm. As velocidades de reação foram calculadas a partir de uma curva padrão com p-nitrofenol (coeficiente de extinção de $1,83 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e expressas em $\mu\text{mol/min}$.

2.5. Ensaio da α -amilase pancreática

A atividade da α -amilase pancreática suína (velocidade inicial) foi medida por meio da velocidade de aparecimento de açúcar redutor (Castilho et al., 2021; Souza et al., 2025). O meio de reação foi tampão fosfato 20 mM, pH 6,9, contendo NaCl 6,7 mM, amido comercial 1 g/100 mL e concentrações variáveis do extrato de *G. sylvestre* (até 1000 $\mu\text{g/mL}$). A concentração da enzima em todas as incubações foi igual a 0,75 U/mL. Após 10 minutos de incubação a 37 °C, a reação foi paralisada em água fervente por 5 minutos. Os açúcares redutores foram determinados pelo método do 3,5-dinitrosalicilato, a 540 nm, e convertidos em velocidade de reação a partir de uma curva de calibração da glicose. As velocidades da reação foram expressas em $\mu\text{mol/min}$.

2.6. Teste de tolerância oral a triglicerídeos em camundongos

A absorção de triglicerídeos pelas células intestinais foi determinada por meio do teste de tolerância oral ao azeite de oliva (Castilho et al., 2021; Souza et al., 2025). O extrato de *G. sylvestre* foi solubilizado em água filtrada e administrado por via intragástrica nas doses de 100, 250 e 500 mg por kg de peso corporal para diferentes grupos de animais. O grupo controle recebeu apenas água potável. O medicamento de referência orlistate foi administrado ao grupo controle positivo (50 mg/kg). Após a administração do fármaco ou extrato, todos os animais receberam azeite de oliva intragástrica (5 mL/kg). Amostras de sangue foram coletadas da veia da cauda aos 0, 90, 180, 240 e 360 minutos após a administração do azeite. As concentrações de triglicerídeos foram determinadas usando um medidor de triglicerídeos Accutrend Plus® Roche, que utiliza um ensaio enzimático-colorimétrico de ponto final para quantificar a fração glicerol dos triglicerídeos.

2.7. Teste de tolerância oral ao ácido oleico

Três grupos de animais receberam por via intragástrica uma solução oral (100 μL) do extrato de *G. sylvestre* na dose de 500 mg/kg^{-1} . O quarto grupo (controle) os animais receberam

água potável (200 µL). Para os primeiros três grupos de animais as seguintes combinações de glicerol e ácido oleico foram administrados por via intragástrica: (1) ácido oleico sozinho (180 µL); (2) glicerol sozinho (20 µL); (3) ácido oleico (180 µL) mais glicerol (20 µL). As amostras de sangue foram analisadas com o medidor de triglicerídeos AccutrendPlus® Roche, conforme descrito acima, no tempo zero (antes da administração do glicerol e do oleato) e após 90 minutos (Castilho et al., 2021).

2.8. Testes de tolerância ao amido e à glicose em camundongos

Foi seguido o procedimento adotado em trabalhos anteriores (Castilho et al., 2021; Da Silva et al., 2021). O extrato de *G. sylvestre* foi solubilizado em água filtrada e administrado por via intragástrica nas doses de 100, 250 e 500 mg por kg de peso corporal a diferentes grupos de animais. O grupo controle recebeu apenas água potável. A droga de referência acarbose foi administrada a outro grupo (50 mg/kg). Após a administração do medicamento ou do extrato, todos os animais receberam, por via intragástrica, amido na dose de 1 g/kg ou glicose na dose de 1,5 g/kg. A glicose plasmática foi então determinada nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos após administração. Foram coletadas amostras de sangue da veia da cauda e analisadas com um glicosímetro (AccuChek®).

2.9. Avaliação *in silico* dos potenciais inibidores da lipase

Com intuito de avaliar os fitoquímicos da *G. sylvestre* com a maior probabilidade de inibir a lipase, as estruturas tridimensionais dos vários constituintes químicos identificados na *G. sylvestre* (Tiwari et al., 2014; Jangam et al., 2023) foram recuperadas da base de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e preparadas utilizando o Open Babel (O'Boyle et al., 2011) para análises *in silico* subsequentes. A enzima do *Homo sapiens* (EC 3.1.1.3, PDBid: 1LPB, resolução de 2,46 Å) complexada com um inibidor experimental sintético de fosfonato de alquila (MUP) foi utilizada nas simulações (Egloff et al., 1995). Nas preparações para os estudos de acoplamento, as moléculas de água foram removidas, restando apenas o cofator de cálcio e a colipase, ambos críticos para a atividade catalítica *in vivo*. A estrutura da lipase foi minimizada em termos de energia e validada utilizando um gráfico de Ramachandran (Gopalakrishnan et al., 2007). O software AutoDock 4.2.3 (Morris et al., 2009), implementado na interface gráfica Pyrx 0.8 (Dallakyan et al., 2015), e GOLD (Jones et al., 1997) foram utilizados para os estudos de acoplamento *in silico*. Os parâmetros de docking molecular foram otimizados através do redocking do MUP no complexo lipase-cofator-ligante minimizado, utilizando simulações de dinâmica molecular das bibliotecas NAMD2/VMD (Phillips et al., 2005; Humphrey et al., 1996) com 30,000 passos de gradiente conjugado. Para efeitos de

comparação, a pontuação relativa média (MRS) foi calculada através da média das pontuações de acoplamento de cada composto em quatro simulações efetuadas com cada software (Da Silva et al., 2021). Esta métrica permite a classificação dos compostos com base na sua afinidade de ligação à lipase, utilizando o orlistate (CID: 3034010) como referência:

$$MRS = \frac{1}{N_p} \left(\frac{S_{P_1}}{BS_{P_1}} + \frac{S_{P_2}}{BS_{P_2}} + \dots \right) \quad (1)$$

Na equação (1) MRS é a pontuação média relativa, N_p , o número de programas de encaixes molecular utilizados nas simulações, S_{P_1} , S_{P_2} , a pontuação de cada ligante no programa e BS_{P_1} , BS_{P_2} , a melhor pontuação correspondente obtida em cada programa entre todos os ligantes.

2.10. Cálculos e análise estatística

A interpolação numérica para a determinação da concentração necessária para inibir 50% da atividade máxima da enzima (IC_{50}) dose responsável por 50% do máximo efeito (ID_{50}) foi efetuada utilizando o software Scientist® da Micro Math Scientific Software (Salt Lake City, UT). O mesmo programa foi utilizado para ajustar as equações das velocidades iniciais experimentais da atividade da lipase pancreática através de um procedimento iterativo de mínimos quadrados não linear. A decisão sobre o modelo (equação) mais adequado baseou-se no critério de seleção do modelo (MSC), nos desvios-padrão dos parâmetros otimizados e na soma dos desvios quadrados entre as velocidades de reação experimentais e as calculadas. O critério de seleção de modelos, que corresponde ao Critério de Informação de Akaike normalizado, é definido como (Akaike, 1974):

$$MSC = \ln \left[\frac{\sum_{i=1}^n w_i (Y_{obs_i} - \bar{Y}_{obs})^2}{\sum_{i=1}^n w_i (Y_{obs_i} - Y_{cal_i})^2} \right] - \frac{2p}{n} \quad (2)$$

Y_{obs} são as velocidades de reação experimentais, a velocidade de reação experimental média, Y_{cal} a velocidade de reação calculada teoricamente, W o peso de cada ponto experimental, n o número de observações e p o número de parâmetros do conjunto de equações. No presente trabalho, o modelo com o maior valor de MSC foi considerado o mais adequado, desde que os parâmetros estimados fossem positivos. Quando os valores de MSC diferiam em menos de 5%, o modelo que apresentava os menores desvios-padrão para os parâmetros estimados foi considerado o mais adequado.

Para comparar a evolução temporal das concentrações de triglicerídeos no sangue após a administração do extrato de *G. sylvestre*, os dados foram submetidos a uma análise de

variância múltipla (MANOVA) com testes post-hoc Student-Newman-Keuls. As curvas de efeito versus concentração foram submetidas a uma análise de variância unidirecional (ANOVA). Os cálculos foram efetuados utilizando o programa Statistica™ da Stat Soft® (Tulsa, OK, EUA). O critério geral de significância foi $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Atividade da lipase pancreática e cinética da inibição

Inicialmente, a atividade da lipase pancreática foi medida em função da concentração do extrato rico em ácido gimnêmico a uma concentração fixa de substrato. Os resultados são mostrados na Figura 1A. A atividade da enzima diminuiu progressivamente quando a concentração do extrato foi aumentada. A interpolação numérica dos dados revelou que a inibição de 50% ocorreu com a concentração de 484,6 g/mL. Este valor é estritamente válido para as concentrações saturantes de substrato utilizadas no ensaio da figura 1A. Deve-se notar também que a curva apresenta uma clara tendência para estabilizar sem atingir a inibição total da atividade da lipase. Para efeitos comparativos, foi também determinada a dependência da concentração da inibição da lipase pelo orlistate, o inibidor clássico da lipase pancreática. Os resultados destes ensaios estão apresentados na Figura 1B. O orlistate inibiu a lipase pancreática com um valor IC_{50} de 11,45 ng/mL, provando, assim, ser muito mais eficaz do que o extrato rico em ácido gimnêmico utilizado no presente estudo em termos de massa total por mL.

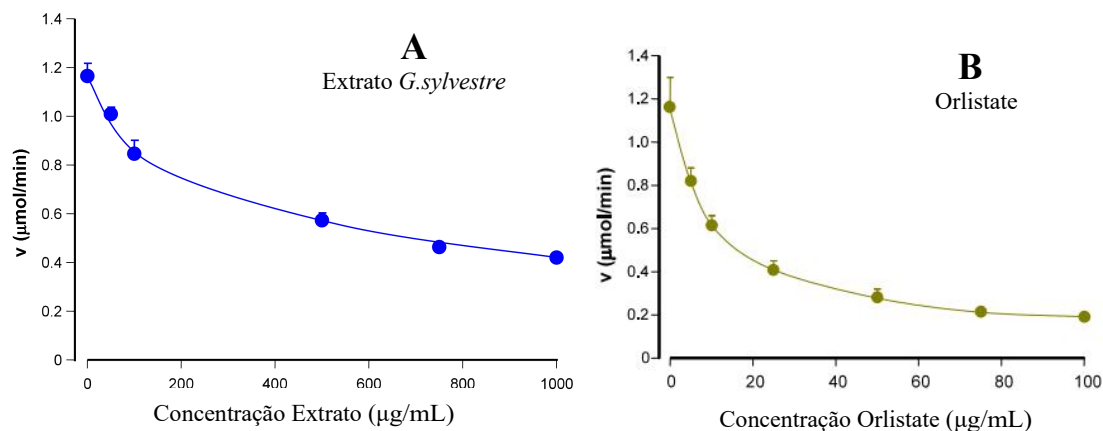


Figura 1. Efeito dependente de concentração da atividade da lipase pancreática em relação à concentração do extrato de *G. sylvestre* em uma concentração fixa de substrato (600 µM). As velocidades de reação (v) foram determinadas conforme descrito na seção Materiais e métodos. Os pontos representam as médias de 4 medições independentes mais os erros padrão da média. Linhas contínuas representam valores otimizados obtidos por meio da equação 4.

A fim de uma melhor caracterização da inibição da lipase pelo extrato, a atividade da enzima foi determinada em concentrações variáveis de substrato e inibidor. Os resultados são apresentados na Figura 2. As curvas de saturação foram diminuindo progressivamente à medida que o extrato foi adicionado a concentrações cada vez mais elevadas, um fenômeno esperado se considerarmos a atividade inibitória da Figura 1A. Estas curvas não mostraram qualquer tendência para convergir no sentido da curva de controle a concentrações elevadas de substrato, o que torna improvável uma inibição do tipo competitiva. A inibição não-competitiva é mais provável e a equação clássica que descreve a inibição não-competitiva completa foi ajustada aos dados:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{i1}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{i2}}\right)} \quad (3)$$

Na equação (3), V é a velocidade de reação, $[S]$ a concentração de substrato e $[I]$ a concentração de extrato; além disso, K_M é a constante de Michaelis-Menten, $V_{\max}$ a velocidade máxima de reação, K_{i1} a constante de dissociação de um complexo enzima inibidor putativo (EI) e K_{i2} a correspondente constante de dissociação do complexo enzima-substrato-inibidor (ESI).

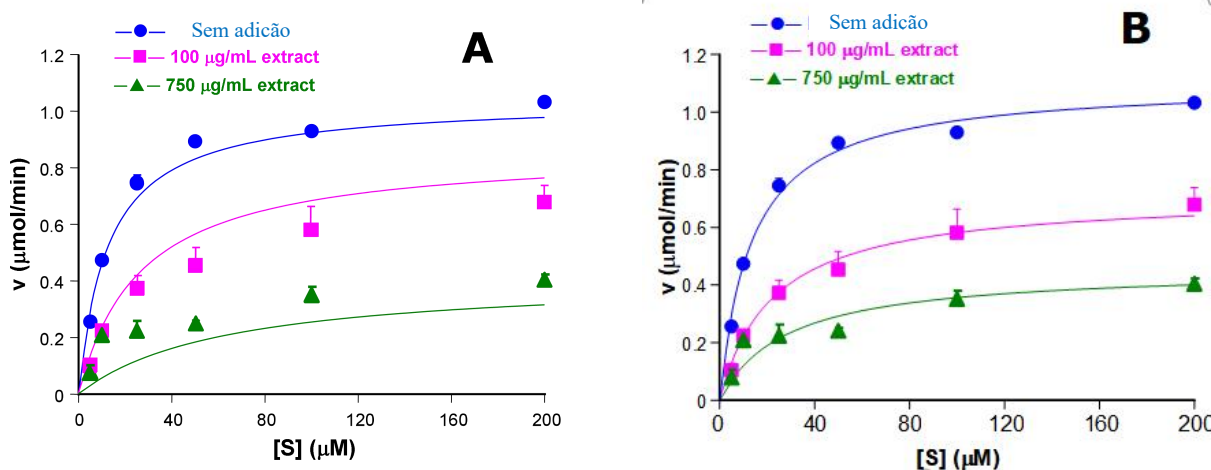


Figura 2. Cinética da inibição da lipase pancreática pelo extrato de *G. sylvestre*. As concentrações de substrato e extrato foram variadas simultaneamente, e as velocidades de reação foram medidas conforme descrito na seção Materiais e métodos. As equações (3), painel A, e (4), painel B, foram ajustadas a todo o conjunto de dados experimentais por meio de um procedimento de mínimos quadrados não linear. As curvas teóricas (linhas contínuas) foram calculadas introduzindo as constantes cinéticas otimizadas na equação (3), painel A, ou (4), painel B, juntamente com as concentrações variáveis de substrato e inibidor. As constantes cinéticas otimizadas obtidas pelo ajuste da equação (3), painel A, foram: $V_{\max}$, $1,039 \pm 0,072$ $\mu\text{mol/min}$; K_M , $12,50 \pm 3,59$ μM ; K_{i1} , $497,36 \pm 282,75$ $\mu\text{g/mL}$; $K_{i2} = 64,93 \pm 35,41$. A soma dos desvios quadrados foi 0,102 e o critério de seleção do modelo (MSC) foi 2,20. As constantes cinéticas otimizadas obtidas pelo ajuste da equação (4), painel B, foram: V_1 , $1,102 \pm 0,036$ $\text{mol } \mu\text{/min}$; V_2 , $0,385 \pm 0,045$ $\text{mol } \mu\text{/min}$; K_M , $13,60 \pm 1,71$ μM ; K_{i1} , $38,10 \pm 9,94$ $\mu\text{g/mL}$;

$K_{i2} = 83,78 \pm 18,33$. A soma dos desvios quadrados foi 0,0194 e o critério de seleção do modelo (MSC) 3,75.

Os resultados do procedimento de ajuste podem ser apreciados comparando as curvas experimentais do painel A da Figura 2 com as curvas calculadas no mesmo painel (linhas contínuas). É óbvio, mesmo numa simples inspeção, que as curvas teóricas se desviam forte e sistematicamente dos dados experimentais. Ou seja, esta equação não teve sucesso no ajuste de equações que descrevem a inibição competitiva ou não competitiva. A conformidade com a equação (3) pressupõe uma inibição completa (linear). No entanto, como já foi referido acima, a curva v versus $[I]$ sugere fortemente que a inibição pelo extrato de *G. sylvestre* pode ser incompleta, ou seja, do tipo hiperbólico, um mecanismo que é ilustrado pela Figura 3.

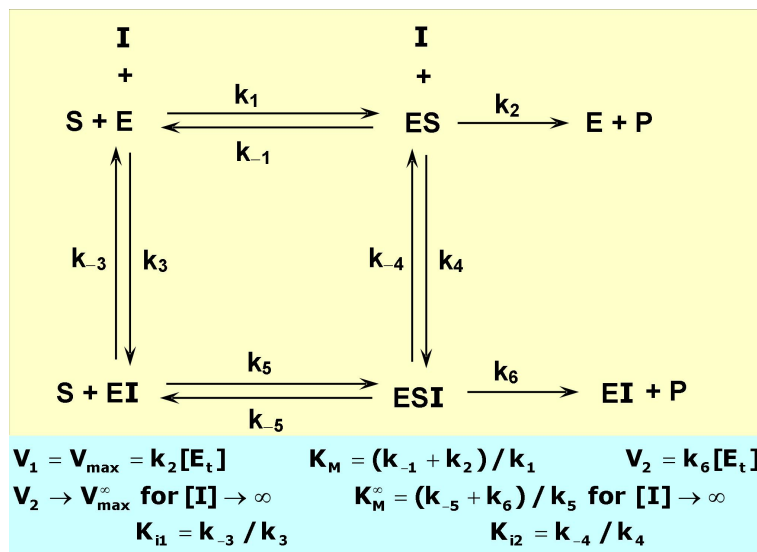


Figura 3. Representação esquemática do mecanismo hiperbólico (incompleto) de inibição (Botts e Morales, 1953; Baici, 2015). Os símbolos E, S e I representam enzima, substrato e inibidor. Os parâmetros mais importantes que aparecem na equação (4) ou que são mencionados no texto estão definidos na parte inferior.

A inibição incompleta ocorre quando a ligação do inibidor reduz a atividade da enzima até um certo ponto sem inativação completa. A equação de estado estacionário que descreve o mecanismo na Figura 3 é bastante complexa e inclui termos quadráticos $[S]$ e $[I]$ (Botts e Morales, 1953; Baici, 2015). Uma equação simplificada que não contém termos quadráticos, no entanto, demonstrou ser uma aproximação razoável. Esta equação simplificada surge sob uma das duas hipóteses: (a) quase-equilíbrio para a ligação do substrato, ou seja, $k_2/k_{-1} \ll 1$ e $k_6/k_{-5} \ll 1$; (b) o inibidor (também chamado modificador) não altera as razões das constantes de desaparecimento de ES e ESI, ou seja, $(1 + k_2/k_{-1}) \approx (1 + k_6/k_{-5})$. A equação simplificada pode ser escrita como (Botts e Morales, 1953; Baici, 2015):

$$v = \frac{V_1[S] + V_2[S] \frac{[I]}{K_{i2}}}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{i1}} \right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{i2}} \right)} \quad (4)$$

A Figura 3 apresenta o significado dos vários parâmetros da equação (4). V_2 é a velocidade máxima da enzima modificada. Vale apenas mencionar que $V_2 = 0$ significa inibição completa e, neste caso, a equação (4) torna-se na equação (3). O painel B da Figura 2 permite comparar dados experimentais e teóricos em termos do mecanismo ilustrado na Figura 3. É evidente, numa simples inspeção, que a concordância é boa. Assim, a inibição da lipase pelo extrato é do tipo incompleto (parabólico). Esta conclusão é igualmente corroborada pelos indicadores estatísticos apresentados na legenda da figura 2, que são claramente favoráveis ao mecanismo representado na figura 3.

A determinação do melhor modelo e a otimização das constantes cinéticas têm a vantagem de permitir calcular a percentagem de inibição para várias combinações de concentrações de substrato e inibidor. Isto foi feito como uma percentagem de inibição = $(1 - v_i/v) 100$, em que v é a velocidade de reação na ausência de inibidor e v_i a velocidade de reação na presença do inibidor a uma dada concentração. A Figura 4 mostra as curvas teóricas obtidas em várias combinações de concentrações de substrato e inibidor, utilizando as constantes cinéticas otimizadas indicadas na legenda da Figura 2. O gráfico revela que é presumível que a percentagem de inibição aumente a baixas concentrações de substrato. A baixas concentrações de substrato e altas concentrações de inibidor, podem ser esperadas inibições percentuais de cerca de 80%. Isto é mais do que se pode esperar em concentrações saturantes de substrato e inibidor. Este último pode ser calculado a partir dos valores de V_1 e V_2 indicados na legenda da figura 2 como $(1 - V_2/V_1) 100 = (1 - 0,385/1,102) 100 = 65,1\%$.

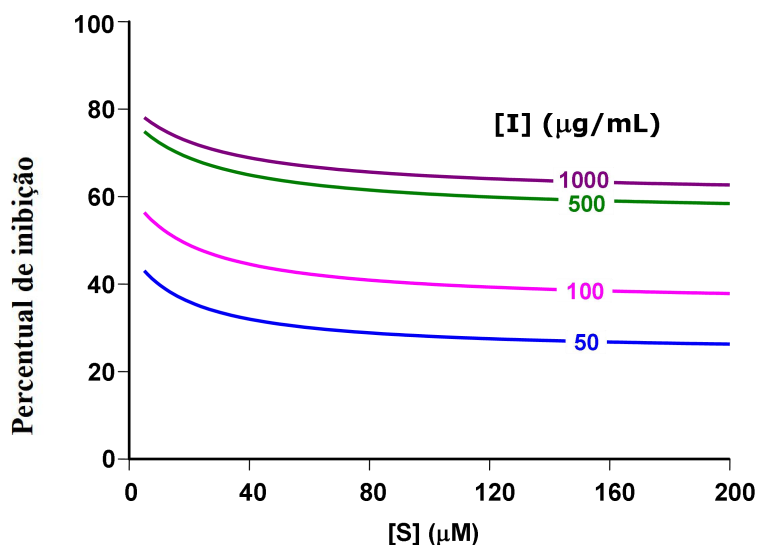


Figura 4. Inibição percentual da lipase pancreática por diferentes concentrações de extrato ([I]) em função da concentração do substrato ([S]). Os cálculos foram realizados utilizando a equação (4) e os parâmetros otimizados listados na Tabela 2. A inibição percentual é igual a $(1 - v_i/v) \times 100$, onde v é a velocidade de reação calculada na ausência do extrato e v_i a velocidade de reação na presença de uma determinada concentração de extrato.

3.2. Efeitos sobre a absorção dos triglicerídeos pelas células intestinais em camundongos

Para avaliar o significado fisiológico e farmacológico da inibição da lipase pancreática pelo extrato de *G. sylvestre*, foram realizados ensaios *in vivo* utilizando o teste de tolerância oral ao azeite. Este ensaio consiste na administração oral de uma carga de azeite (5 ml/kg), seguida da medição dos níveis de triglicerídeos no plasma ao longo do tempo. A figura 5 (painéis A e B) ilustra os cursos temporais das alterações dos níveis de triglicerídeos no plasma após a administração de azeite em diferentes condições.

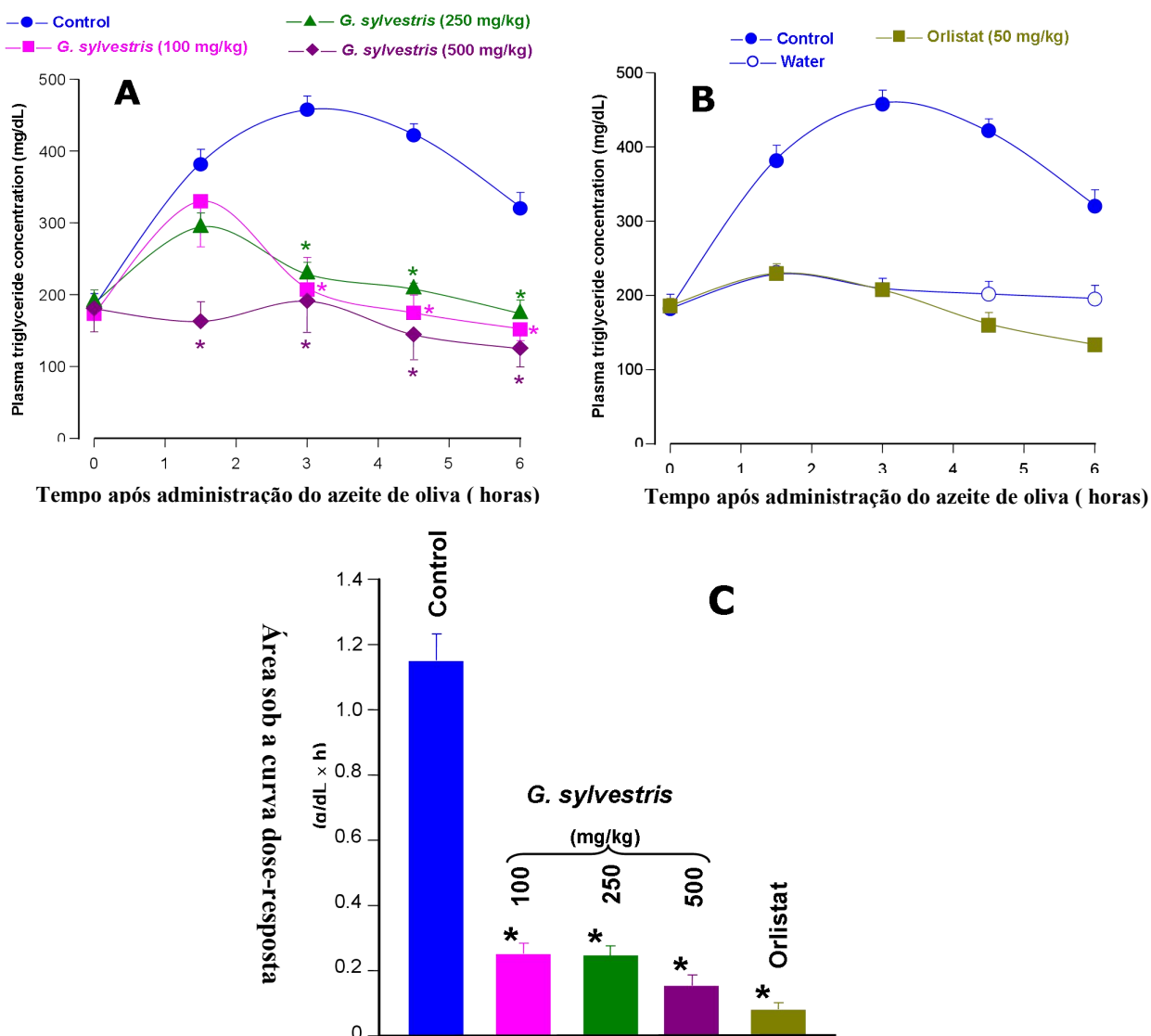


Figura 5. Efeitos do extrato de *G. sylvestre* e orlistate na tolerância ao azeite de oliva em camundongos. A administração oral de azeite de oliva (5 mL.kg^{-1}) foi realizada imediatamente após a administração dos extratos ou orlistate. Os triglicerídeos plasmáticos foram medidos conforme descrito em Materiais e métodos. Cada curva consiste em médias $\pm$ erros padrão médios de 4 camundongos. Os painéis A e B mostram os cursos temporais das mudanças na concentração de triglicerídeos no sangue após a administração de azeite de oliva sozinho ou em combinação com várias doses do extrato de *G. sylvestre* ou orlistate. O painel C mostra as áreas sob as curvas obtidas após os vários tratamentos com os extratos de *G. sylvestre* e orlistate ilustrados pelos painéis A e B, subtraídos da área sob a curva obtida após a administração de água (linha de base). Asteriscos indicam significância estatística em relação à curva controle ($p \leq 0,05$; Newman-Keuls) com MANOVA para as curvas de curso temporal e ANOVA para as comparações de área.

A curva do controle (somente azeite) apresenta um aumento significativo dos triglicerídeos plasmáticos após a administração do azeite, com um pico às 3 horas após a administração. Como esperado, o orlistate, o inibidor clássico da absorção de triglicerídeos, impediu este aumento de forma acentuada (Figura 5B). Quando foi administrada água em vez de azeite, os níveis de triglicerídeos mantiveram um perfil baixo durante as três horas seguintes. A administração do extrato nas doses de 100 e 250 mg/kg apresentou efeitos substanciais na curva de tolerância, já nas primeiras determinações 1,5 h após a administração do azeite, e este perfil não revelou valores diferentes do controle. Os níveis de triglicerídeos neste momento representam, no entanto, os novos valores de pico e os níveis nos tempos subsequentes foram inferiores aos da condição do controle. A dose de extrato de 500 mg/kg eliminou o pico inicial de triglicerídeos, mantendo os níveis baixos até 3 horas. As áreas sob as curvas, corrigidas a partir da linha base, são consideradas como uma medida representativa da velocidade ou extensão da absorção de triglicerídeos. O painel C da figura 5 mostra as áreas calculadas sob as curvas, corrigidas para a linha de base representada pela curva obtida quando água foi administrada (painel B). A partir deste perfil dos triglicerídeos plasmáticos, é possível obter, por interpolação numérica, a dose teórica que provoca uma inibição de 50% (ID_{50}), que neste caso é de 41,14 mg/kg.

3.3. Efeitos sobre os níveis de triglicerídeos no sangue após administração de oleato em camundongos

As doses nas quais o extrato de *Gymnema sylvestre* inibiu a absorção de triglicerídeos em modelos animais são relativamente baixas, o que é difícil de conciliar com as características observadas para a inibição da lipase pancreática marcada por um valor elevado de IC_{50} e uma inibição incompleta mesmo em altas concentrações. Essa discrepância sugere que outros eventos envolvidos no processo global de digestão e absorção de lipídeos também estejam sendo modulados pelo extrato. A lipase pancreática hidrolisa os triglicerídeos da dieta em ácidos graxos livres e monoacilgliceróis, os quais são posteriormente absorvidos pelos enterócitos através de mecanismos mediados por transportadores específicos, como o CD36 e o

FATP4. Dados obtidos no presente estudo indicam que o extrato de *G. sylvestre* também é capaz de interferir na absorção de ácidos graxos livres, implicando que a inibição dos transportadores intestinais de lipídios pode representar um mecanismo adicional envolvido na sua ação hipolipemiante. Portanto, o efeito observado na redução da lipemia pode ser resultado da ação combinada sobre diferentes alvos do processo de absorção intestinal de gorduras, e não exclusivamente da inibição enzimática da lipase pancreática (Stahl et al., 1999; Schreck e Melzig, 2018). Pode ser que o extrato de *G. sylvestre* iniba o transporte de ácidos graxos livres, como já relatado para outros agentes (Da Silva et al., 2021; Ahowesso et al., 2015). Para abordar esta questão, administramos ácido aos animais com posterior quantificação dos equivalentes de trioleína no plasma. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos. Os dados foram expressos como a diferença entre os níveis basais (182,55 mg de equivalentes de trioleína por dL) e os níveis encontrados 90 minutos após a administração de ácido oleico isolado, glicerol isolado e ácido oleico + glicerol, com ou sem a administração prévia do extrato de *G. sylvestre*. O ensaio de triglicerídeos sanguíneos utilizado no presente trabalho quantifica a fração glicerol. No entanto, quando o glicerol é administrado isoladamente, o sistema de ensaio apresenta um aumento menos pronunciado, que corresponde a 31% do aumento encontrado nos ensaios em que o glicerol e o ácido oleico foram administrados simultaneamente. Quando o ácido oleico foi administrado isoladamente, foi detectado um aumento muito pequeno da concentração de triglicerídeos no sangue. Por outro lado, nos animais que receberam o extrato de *G. sylvestre* antes da administração de ácido oleico + glicerol, o sistema de ensaio dos triglicerídeos constatou apenas pequenos aumentos, na realidade bastante semelhantes aos detectados quando o glicerol foi administrado sozinho. Os resultados sugerem fortemente que o extrato de *G. sylvestre* é capaz de inibir a absorção de ácido oleico livre.

Tabela 1. Efeito de *G. sylvestre* (500 mg/kg) na absorção de oleato em camundongos.

Administração intragástrica	Incremento no plasma equivalentes de trioleína após 90 minutos (mg dL ⁻¹)
Ácido oleico + glicerol	164,34 ± 15,1
Glicerol	51,2 ± 8,3*
Ácido oleico	8,23 ± 2,2*
Ácido oleico + glicerol + extrato	46,2 ± 6,1*

A concentração basal de triglicerídeos nesta série experimental foi de 182,55 mg de equivalentes de trioleína por dL (n = 3). O asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo experimental que recebeu ácido oleico mais glicerol (p < 0,05). Os detalhes experimentais são descritos na seção Materiais e Métodos.

3.4. Efeitos na tolerância ao amido e à glicose

Para testar se o extrato rico em AGs das folhas de *G. sylvestre* (“*Gymnema sylvestre* 75”) também é capaz de afetar a absorção do amido ou da glicose, foram realizados ensaios em camundongos com a maior dose utilizada neste trabalho que inibiu a absorção dos triglicerídeos (500 mg/kg). Os resultados são apresentados na figura 6. Eles revelam pequenas tendências de diminuição dos valores de pico aos 60 minutos após a administração de amido ou glicose, sem significância estatística, quando submetidos à análise de variância multivariada. Estes resultados contrastam fortemente com os obtidos no teste de tolerância aos triglicerídeos, em que a dose de 500 mg/kg aboliu quase totalmente o aumento dos triglicerídeos no sangue após a administração de azeite. Uma série adicional de experiências, apresentada no painel C da figura 6, não conseguiu detectar uma inibição significativa da α -amilase pancreática pelo extrato em concentrações até 1000 $\mu\text{g/mL}$.

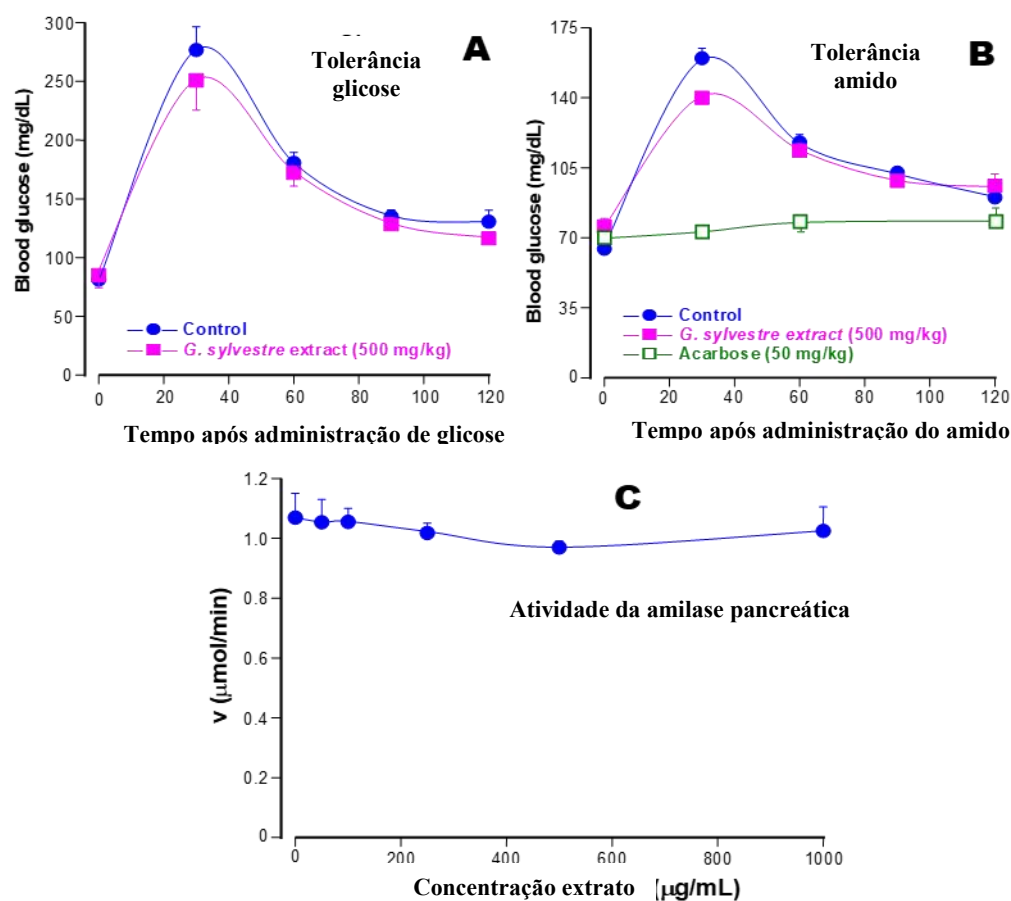


Figura 6. Efeitos do *G. sylvestre* sobre a tolerância à glicose (painel A), tolerância ao amido (painel B) e atividade da α -amilase (C). A administração oral de amido (1 g/kg) ou glicose (1,5 g/kg) foi realizada imediatamente após a administração do extrato de *G. sylvestre* (500 mg/kg). A glicemia foi medida conforme descrito em Materiais e métodos. Os dados de ambos os testes de tolerância são as médias de 4 experimentos independentes. A atividade da amilase foi medida utilizando amido como substrato e analisando a produção de açúcares redutores após 10 minutos de incubação, conforme descrito na seção Materiais e métodos. Os dados no painel C correspondem as médias de 3 experimentos independentes.

3.5. Simulações de docking molecular

As simulações de redocking envolvem o acoplamento de uma molécula MUP ao mesmo complexo. Considerando que o programa reproduz com sucesso a pose cristalográfica e a

classifica com uma pontuação RMSD abaixo de 2 Å em todas as repetições, isso revela que o programa entende as forças de interação entre enzima e molécula e muito provavelmente será capaz de usá-las na identificação de uma nova molécula (molécula desconhecida) da biblioteca (Bueno et al., 2019). Neste estudo, o redocking foi realizado quatro vezes para cada programa, dentre os três programas testados. Esta abordagem permitiu selecionar os programas AutoDock 4.2.3 e Gold entre os três programas avaliados, uma vez que estes foram capazes de replicar com precisão a pose da molécula MUP de forma consistente em todas as tentativas na configuração que adapta no complexo modelo lipase-MUP humano. Em seguida, os protocolos de ancoragem validados foram aplicados para avaliar a possibilidade de interação de moléculas do extrato de *G. sylvestre*, como a gimnemagenina, os gimnemosídeos A e B e as agliconas de polifenóis glicosídicos presentes nos extratos de folhas de *G. sylvestre* (Tiwari et al., 2014).

Para identificar as moléculas mais promissoras, foram consideradas as pontuações de acoplamento e a reprodutibilidade entre repetições para calcular a pontuação relativa média (MRS) utilizando a equação (1), que foi utilizada para avaliar o desempenho. Uma vez que cada programa utiliza algoritmos distintos, resultados consistentes em diferentes programas aumentam a confiança nas previsões. Os valores calculados através da equação (1) refletem o número de vezes que o software foi executado, a pontuação obtida para cada acoplamento (também para cada molécula) e a pontuação mais elevada entre todos as moléculas.

Os melhores resultados do rastreio virtual estão apresentados na tabela 2, no qual os compostos foram classificados por ordem decrescente de afinidade teórica com a lipase. Das seis moléculas avaliadas, a gimnemagenina obteve a maior MRS, superando até mesmo o composto de referência (orlistate) neste aspecto. A figura 7 apresenta as estruturas da gimnemagenina e dos compostos de referência, e realça as regiões de interações intermoleculares hidrofóbicas e identifica as supostas ligações de hidrogênio formadas entre as moléculas e o sítio ativo da enzima. Existem amplas zonas de interações hidrofóbicas tanto para a gimnemagenina como para o orlistate, tal como revelado pela coloração castanha no sítio ativo da enzima. Este fato justifica em grande parte as afinidades semelhantes da enzima para ambos os compostos. Por outro lado, é de notar que as estruturas hidrofóbicas de ambos os compostos se devem basicamente a ligações C-H, mas a hidrofobicidade do orlistate é caracterizada principalmente por cadeias alifáticas lineares, ao passo que a hidrofobicidade da gimnemagenina resulta principalmente de componentes alicíclicos.

Tabela 2. Escores de docking da lipase pancreática dos principais compostos identificados no extrato de *G. sylvestre* e de seus derivados putativos após hidrólise.

MOLÉCULAS	SCORE AUTODOCK	SCORE GOLD (kcal/mol)	MRS
-----------	-------------------	--------------------------	-----

4.2.3 (kcal/mol)			
Gimnemagenina	-8,52	47,34	$0,843 \pm 0,039^*$
Quercetina	-6,83	51,31	$0,772 \pm 0,069$
Kaempferol	-6,59	48,56	$0,738 \pm 0,079$
Orlistate	-3,97	69,05	$0,733 \pm 0,010$
Gymnemosídeo B	-4,91	60,15	$0,724 \pm 0,043$
MUP	-3,81	52,91	$0,607 \pm 0,022^*$
Gimnemosídeo A	-1,64	57,73	$0,515 \pm 0,019^*$
Ácido protocatecuico	-3,98	34,53	$0,484 \pm 0,043^*$

* representa diferença estatística em relação ao composto de referência, orlistate, de acordo com Anova-One way, teste post hoc de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

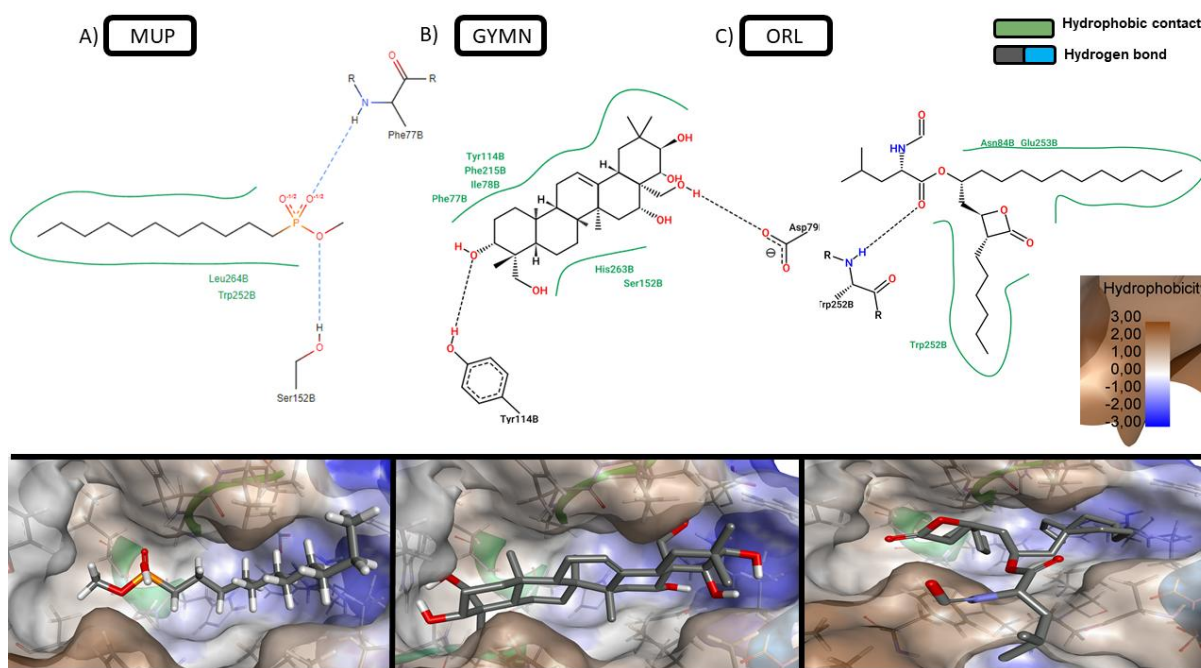


Figura 7. Docking molecular do ácido metoxiundecilfosfínico (MUP, A), gimnemagenina (GYM, B) e orlistate (ORL, C) à lipase pancreática humana. As melhores posições acopladas (embaixo) e as interações intermoleculares entre moléculas no sítio ativo da lipase pancreática (em cima) foram avaliadas pelo programa PoseView.

4. Discussão

4.1. Aspectos introdutórios gerais

A hiperlipidemia tem sido considerada um importante fator causal para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e, além disso, está diretamente ligada à obesidade e ao diabetes. Portanto, a diminuição dos níveis de lipídios plasmáticos é importante em qualquer tentativa de prevenção e tratamento de doenças (Hurtado-Roca et al., 2017).

Compostos bioativos naturais com ações hipolipidêmicas são altamente desejáveis, pois frequentemente também exercem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e hepatoprotetoras (Ramos et al., 2021). É provável que o extrato de *G. sylvestre* que foi investigado no presente trabalho se enquadre nesta categoria, uma vez que demonstrou uma clara capacidade de diminuir os níveis de lipídios plasmáticos juntamente com um potencial antioxidante que pode eventualmente levar a ações anti-inflamatórias (Jangam et al., 2023). As seções seguintes irão explorar os potenciais mecanismos subjacentes aos efeitos hipolipidêmicos observados neste estudo. Além disso, as provas que apoiam o envolvimento de compostos específicos identificados no extrato serão cuidadosamente examinadas e discutidas.

4.2. Inibição da lipase pancreática

Nossa experiência confirma relatórios anteriores de que o extrato de *G. sylvestre* é um inibidor da lipase pancreática (Shigematsu et al., 2001; Manimegalai et al., 2019). O presente estudo, no entanto, avança muito mais no assunto ao apresentar uma caracterização cinética detalhada. A observação relevante foi a de que a inibição causada pelo extrato é do tipo incompleta, ou seja, depois de atingido um certo grau de inibição, novos incrementos na concentração do extrato não causam incrementos na inibição. Esta observação é importante e tem de ser explorada nas tentativas de traduzir os efeitos *in vitro* em possíveis consequências *in vivo*. O modelo cinético que foi ajustado aos dados fornece uma base quantitativa para prever o grau máximo possível de inibição, uma possibilidade útil porque este último também varia com a concentração do substrato e não apenas com a concentração do inibidor, como foi demonstrado por simulações. Estas últimas mostraram que, a baixas concentrações de substrato, o grau de inibição é mais elevado. Em termos estritamente matemáticos, isso ocorre principalmente porque o segundo termo do numerador na equação (4) se torna mais significativo em concentrações mais altas de substrato. É também interessante notar que o inibidor (ou grupo de inibidores) se liga mais fortemente à enzima livre (E) do que ao complexo enzima-substrato (ES). De facto, 2,2 vezes mais fortemente, como pode ser calculado a partir da razão K_{i2}/K_{i1} .

A heterogeneidade da preparação utilizada, um extrato rico em ácidos gimnêmicos, mas que contém certamente gimnemagenina e derivados da gimnemagenina, para além de muitas outras substâncias, como os polifenólicos (Satheeshkumar et al., 2014), não invalida a utilização da equação (4), desde que as proporções relativas de todos os inibidores se mantenham inalteradas (Chou et al., 1977; Cleland, 1963). Esta é uma condição que se mantém sempre que são utilizadas várias quantidades da mesma preparação. No entanto, as constantes

de inibição medidas terão um significado complexo. São certamente funções complexas de várias constantes de dissociação individuais e de fatores relacionados com a massa total do extrato e o seu teor em princípios ativos. Não obstante, continuam a fornecer uma estimativa da força da preparação, expressa em termos da massa que foi adicionada.

4.3. Inibição da absorção de triglicerídeos

A inibição da digestão e da absorção dos triglicerídeos foi claramente demonstrada por experiências *in vivo* em camundongos. Pelo que constatamos, esta é a primeira demonstração experimental do fenômeno. A inibição da lipase pancreática parece desempenhar um papel significativo no mecanismo subjacente. Existem vários exemplos na literatura de extratos de plantas que inibem tanto a lipase pancreática como a absorção de triglicerídeos como, por exemplo, a erva-mate (Fioroto et al., 2022) e o chá roxo (Da Silva et al., 2023). No entanto, existem outros mecanismos possíveis e importantes, como foi demonstrado para a lipofermata (Ahowesso et al., 2015) e a cianidina-3-O-glicosídeo (Castilho et al., 2021). Este último composto, por exemplo, é um fraco inibidor da lipase pancreática, mas um forte inibidor da absorção de triglicerídeos. Esta observação levou à sugestão de que a cianidina-3-O-glucosídeo poderia inibir uma ou mais etapas (por exemplo, o transporte) na sequência de acontecimentos que transformam os ácidos graxos livres no trato intestinal em triglicerídeos. A mais provável destas etapas foi apontada como sendo o transporte de ácidos graxos livres através da membrana celular dos enterócitos, uma vez que se verificou que o composto inibia a incorporação de oleato livre fornecido externamente nos triglicerídeos plasmáticos (Castilho et al., 2021). No presente caso, existem também fortes indícios de que a inibição da lipase pancreática pode não ser a única razão para a inibição da absorção de triglicerídeos pelo extrato de *G. sylvestre*. De fato, ensaios mostraram que o extrato de *G. sylvestre* também inibia o aumento dos níveis de triglicerídeos plasmáticos quando o oleato livre e o glicerol eram administrados a camundongos. A única forma de os enterócitos produzirem um excesso de triglicerídeos e de os transferirem para o sangue nestas condições é serem abastecidos extracelularmente com estes compostos através de um sistema de transporte (Stahl et al., 1999; Schreck e Melzig, 2018). Assim, é razoável levar em conta a hipótese de que o extrato de *G. sylvestre* é capaz de inibir o sistema de transporte dos ácidos graxos livres das células intestinais. Este fenômeno deveria também contribuir para o efeito inibidor global do extrato de *G. sylvestre* na absorção das gorduras. A hipótese de um mecanismo inibitório adicional é igualmente coerente com a dose relativamente baixa de extrato de *G. sylvestre* que provoca

uma inibição de 50% da absorção dos triglicerídeos (41,14 mg/kg). A inibição máxima possível da lipase pancreática em concentrações de substrato saturantes ou quase saturantes (a condição gastrointestinal mais provável após uma carga de 5 ml/kg de azeite) está limitada a 65,1%, mas a inibição máxima da absorção de triglicerídeos que foi alcançada nas nossas experiências foi de 86%. Além disso, se tivermos em conta os resultados obtidos com outros inibidores da lipase pancreática, como o extrato de chá roxo (Da Silva et al., 2023), a dose de *G. sylvestre* que produz uma inibição de 50% da absorção de triglicerídeos deverá ser consideravelmente superior a 41,14 mg/kg se a inibição da lipase fosse o único mecanismo. De fato, o extrato aquoso de chá roxo é um inibidor mais forte da lipase pancreática do que o extrato de *G. sylvestre* utilizado no presente trabalho, sendo os valores IC_{50} a concentrações saturantes de substrato iguais a 170 e 484,6 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente. No entanto, o extrato de chá roxo inibe a absorção de triglicerídeos em doses consideravelmente superiores a 41,14 mg/kg.

Os efeitos sobre a absorção das gorduras aqui detectados com a preparação “*Gymnema sylvestre* 75” parecem ser em grande parte específicos, pois não foram detectados efeitos semelhantes no que diz respeito à absorção do amido e da glicose. Este fato é um pouco inesperado, uma vez que duas saponinas da *G. sylvestre* são relatadas como inibidores relativamente potentes da absorção eletrogênica da glicose nas células epiteliais intestinais (Wang et al., 2014). A base experimental desta conclusão, no entanto, são os registos de captação de glicose em oócitos de *Xenopus laevis* micro-injetados com cRNA para o transportador de glicose dependente de sódio 1 (SGLT1). Claramente, são necessárias mais experiências utilizando modelos de mamíferos ou células de mamíferos para uma clarificação mais abrangente. Em contraste, a inibição da α -amilase pancreática observada nas nossas experiências foi mínima dentro da gama de concentrações que produziu a inibição máxima da lipase pancreática. Com base nos nossos resultados com a α -amilase, não seria de esperar, de fato, efeitos pronunciados na absorção do amido. Deve sublinhar-se que as determinações do nosso trabalho se referem a efeitos a curto prazo, praticamente limitados ao ambiente gástrico. Isto é especialmente relevante para a tolerância à glicose, um parâmetro que também pode ser afetado por efeitos a médio e longo prazo provocados pelo tratamento prolongado com *G. sylvestre*, como demonstrado anteriormente por experiências realizadas com ratos db/db (Li et al., 2019).

4.4. Compostos do extrato possivelmente envolvidos

A identificação dos compostos exatos responsáveis pelos efeitos inibitórios sobre a lipase pancreática e os transportadores de ácidos graxos é intrinsecamente difícil, uma vez que os extratos de plantas são muito complexos em termos de composição química. No entanto, o

extrato padronizado utilizado no presente trabalho, pela sua própria natureza, contém certamente grandes quantidades de ácidos gimnêmicos. Este grupo de substâncias corresponde a uma mistura de 17 saponinas diferentes que é habitualmente utilizada como marcador de controle de qualidade em preparações comerciais. No entanto, um número considerável de outros constituintes químicos também foi identificado em *G. sylvestre*, muitos deles possuindo gymnemagenina como sua estrutura central ou flavonóides (Tiwari et al., 2014; Jangam et al., 2023). A gymnemanegina, tal como indicado pelos ensaios de docking molecular, pode ligar-se muito fortemente à lipase pancreática. O gymnemosídeo B demonstra igualmente uma capacidade de ligação significativa e é bastante razoável supor que muitas das saponinas triterpenóides presentes no extrato utilizado no presente estudo partilham propriedades semelhantes. Outras possibilidades são os flavonóides que possuem kaempferol e quercetina como estrutura central, que também são constituintes da *G. sylvestre* (Tiwari et al., 2014; Jangam et al., 2023). A maioria destas moléculas é conhecida pelas suas propriedades anti-lipase, que se supõe derivarem basicamente da supressão da absorção de gordura *in vivo* (Li et al., 2023). Tal como revelado pelas nossas simulações de docking, o kaempferol e a quercetina são também previsivelmente inibidores da lipase pancreática com uma capacidade de ligação teórica semelhante à do orlistate. No entanto, vale a pena mencionar que a quantidade relativa de polifenólicos no extrato de *G. sylvestre* utilizado neste trabalho é certamente muito menor do que o conteúdo em ácidos gimnêmicos ou compostos relacionados.

Foram apresentados vários argumentos que apoiam a hipótese dos componentes do extrato de *G. sylvestre* poderem inibir a absorção de ácidos graxos livres. No entanto, os nossos dados não nos permitem identificar o(s) composto(s) específico(s) envolvido(s) nesta ação. Como relatado por Castilho et al. (2021), a cianidina-3-O-glucósido, na sua forma pura, é capaz de inibir a absorção de oleato livre em animais a uma dose excepcionalmente baixa de 0,2 mg/kg. Esta descoberta anterior, combinada com as observações feitas no presente estudo, sugere que uma investigação mais aprofundada dos efeitos da gymnemagenina pura e dos ácidos gimnêmicos na absorção de ácidos graxos livres tem potencial para descobrir novos mecanismos sobre as ações destes compostos.

A nossa discussão sobre os compostos que possivelmente atuam na absorção de gorduras centrou-se na gymnemagenina e nos ácidos gimnêmicos porque estes compostos são certamente os mais abundantes no extrato utilizado. No entanto, as transformações químicas e enzimáticas no ambiente gástrico também devem ser consideradas. Os polifenólicos sofrem muitas transformações no trato gastrointestinal, como o demonstram numerosos estudos (Correa et al., 2024). O mesmo se pode dizer dos ácidos gimnêmicos, que são metabolizados em agliconas correspondentes por enzimas gastrointestinais (Kamble et al., 2013). Por

consequente, é sempre possível que sejam gerados inibidores mais fortes no intestino que não estão presentes quando a lipase pancreática é desafiada com o extrato *in vitro*.

4.5. Tentativas de transladar os efeitos para os humanos

Uma questão pertinente que pode ser formulada é com relação as doses do extrato normalizado “*Gymnema sylvestre* 75” que são necessárias para uma inibição significativa da absorção dos triglicerídeos no homem. A dose que provoca uma inibição de 50% da absorção das gorduras nos animais (ID₅₀), igual a 41,14 mg/kg, pode ser tomada como ponto de partida. Extrapolando esta dose dos animais para o homem, um indivíduo de 75 kg necessitaria de aproximadamente 3,1 g, o que, embora não sendo excessivo, pode não ser totalmente confortável. No entanto, a conversão direta de doses animais para humanos não tem sido considerada adequada. Atualmente, o método de normalização da área de superfície corporal é considerado mais adequado para traduzir doses de animais para seres humanos (Reagan-Shaw et al., 2007). Utilizando uma fórmula baseada neste conceito, a dose de 41,14 mg/kg de camundongo torna-se 3,32 mg/kg quando traduzida para humanos (Reagan-Shaw et al., 2007). Este valor representa uma ingestão total de aproximadamente 250 mg para um indivíduo com 75 kg de peso. Esta dose pode eventualmente ser duplicada se pretender uma inibição da absorção das gorduras superior a 50% sem ultrapassar significativamente a dose diária recomendada que é de cerca de 400 mg (Shanmugasundaram et al., 1990; Drug.com). Estas dosagens devem evidentemente ser consideradas como um ponto de partida para futuras investigações e não constituem de modo algum uma conclusão definitiva.

5. Conclusões

O extrato de *G. sylvestre*, que pode ser considerado um produto de baixo custo, é capaz de reduzir a absorção de gorduras em doses relativamente baixas. Trata-se de pelo menos dois mecanismos: (1) a inibição da lipase pancreática; (2) a inibição do transporte dos ácidos graxos livres para as células intestinais. Estes efeitos são provavelmente evocados por vários compostos no extrato, especialmente os que possuem a gimnemagenina como estrutura central, mas também polifenóis derivados do kaempferol e da quercetina. No entanto, as atribuições exatas neste domínio continuam a ser uma área aberta para investigações minuciosas. As ações relatadas (1) e (2) podem certamente contribuir para os efeitos anti-hiperlipidêmicos que têm sido tradicionalmente atribuídos aos extratos de *G. sylvestre*. Podem também contribuir para o controle e o tratamento da síndrome metabólica e da obesidade. No entanto, os resultados aqui obtidos não excluem a existência de outros efeitos a nível celular em vários órgãos, como

sugerido por numerosas observações e que ainda estão à espera de ser esclarecidos por investigações detalhadas.

6. Referências

- Ahamad, J., Amin, S., Naquvi, K.J., Mir, S.R., 2023. Gymnemagenin a Promising Drug Candidate for Management of Hyperglycemia: In-Vitro and In-Vivo Study. *Journal of Angiotherapy*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.25163/angiotherapy.719357>.
- Ahowesso, C., Black, P.N., Saini, N., Montefusco, D., Chekal, J., Malosh, C., Lindsley, C.W., Stauffer, S.R., Di Russo, C.C., 2015. Chemical inhibition of fatty acid absorption and cellular uptake limits lipotoxic cell death. *Biochemical Pharmacology*, 98, 167–181. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.09.004>.
- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6), 716-723. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>.
- Ashtary-Larky, D., Bagheri, R., Asbaghi, O., Tinsley, G.M., Kooti, W., Abbasnezhad, A., Afrisham, R., Wong, A., 2021. Effects of resistance training combined with a ketogenic diet on body composition: a systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(21), 5717-5732. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1890689>.
- Baici, A., 2015. Kinetics of Enzyme-Modifier Interactions. The General Modifier Mechanism. *Springer Verlag*, Berlin, 65-102. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1402-5_2.
- Botts, J., Morales, M., 1953. Analytical description of the effects of modifiers and of enzyme multivalency upon the steady state catalyzed reaction rate. *Transactions of the Faraday Society*, 49, 696-707. <https://doi.org/10.1039/TF9534900696>.
- Bueno, P. S. A., Kato-Schwartz, C. G., de Souza Lima, D., Bracht, A., Peralta, R. M., & Seixas, F. A. V., 2019. *In silico* evaluation of condensed and hydrolysable tannins as inhibitors of pancreatic α -amylase. *Journal of Molecular Modeling*, 25, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00894-019-4176-3>.
- Castilho, P. A., Bracht, L., Barros, L., Albuquerque, B. R., Dias, M. I., Ferreira, I. C. F. R., Comar, J. F., da Silva, T. B. V., Peralta, R. M., Sá-Nakanishi, A. B., Bracht, A., 2021. Effects of a *Myrciaria jaboticaba* peel extract on starch and triglyceride absorption and the role of cyanidin-3-O-glucoside. *Food & Function*, 12(6), 2644-2659. <https://doi.org/10.1039/D0FO02927K>.
- Chou, T.C., Talalay, P., 1977. A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetic systems. *Journal of Biological Chemistry*, 252, 6438-6442. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39978-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39978-7).
- Cleland, W.W., 1963. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. II. Inhibition: Nomenclature and Theory. *Biochimica and Biophysica Acta*, 7, 173-187. [https://doi.org/10.1016/0926-6569\(63\)90226-8](https://doi.org/10.1016/0926-6569(63)90226-8).
- Correa, G., Garcia-Manieri, J. A. A., Dias, M. I., Pereira, C., Mandim, F., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., Peralta, R. M., Bracht, A., 2024. Gastrointestinal digestion of yerba mate, rosemary and green tea extracts and their subsequent colonic fermentation by human, pig or rat inocula. *Food Research International* 114918. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114918>.

- Dallakyan, S., Olson, A. J., 2015. Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology*, 1263, 243-250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19.
- Da Silva, T. B. V., Castilho, P. A., Sá-Nakanishi, A. B., Seixas, F. A. V., Dias, M. I., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., Bracht, A., Peralta, R. M., 2021. The inhibitory action of purple tea on in vivo starch digestion compared to other *Camellia sinensis* teas. *Food Research International*, 150, 110781. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110781>.
- Da Silva, T. B. V., Dias, M.I., Pereira, C., Mandim, F., Ivanov, M., Soković, M., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Seixas, F. A. V., Bracht, A., Peralta, R. M., 2023. Purple tea: chemical characterization and evaluation as inhibitor of pancreatic lipase and fat digestion in mice. *Food & Function*, 14, 1761. <https://doi.org/10.1039/d2fo02442j>.
- Di Fabio, G., Romanucci, V., De Marco, A., Zarrelli, A., 2014. Triterpenoids from *Gymnema sylvestre* and their pharmacological activities. *Molecules*, 19(8), 10956-10972. <https://doi.org/10.3390/molecules190810956>.
- Drugs.com Herbal Database. Gymnema Uses, Benefits & Dosage. Available online: <https://www.drugs.com/npp/gymnema.html> (accessed on 1 October 2014).
- Egloff, M. P., Marguet, F., Buono, G., Verger, R., Cambillau, C., Van Tilbeurgh, H., 1995. The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate. *Biochemistry*, 34(9), 2751-2762. <https://doi.org/10.1021/bi00009a003>.
- Fioroto, C. K. S., da Silva, T. B. V., Cstilha, P. A., Uber, T. M., Sá-Nakanishi, A. B., Seixas, F. A. V., Peralta, R. M., Bracht, A., 2022. Effects of *Ilex paraguairiensis* beverages on in vitro triglyceride and starch absorption in mice. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102330. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102330>.
- Gopalakrishnan, G., Sowmiya, S., Sheik, S. S., Sekar, K., 2007. Ramachandran plot on the web (2.0). *Protein & Peptide Letters*, 14(7), 669-671. <https://doi.org/10.2174/092986607781483912>.
- Hilal, B., Khan, M.M., Fariduddin, Q., 2024. Recent advancements in deciphering the therapeutic properties of plant secondary metabolites: phenolics, terpenes, and alkaloids. *Plant Physiol Biochem*, 211:108674. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108674>.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- Hurtado-Roca, Y., Bueno, H., Fernandez-Ortiz, A., Ordovas, J. M., Ibanez, B., Fuster, V., ... & Laclaustra, M., 2017. Oxidized LDL is associated with metabolic syndrome traits independently of central obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 66(2), 474-482. <https://doi.org/10.2337/db16-0933>.
- Jangam, A., Tirunavalli, S.K., Adimoolam, B.M. et al. As atividades anti-inflamatórias e antioxidantes do extrato de *Gymnema Sylvestre* resgatam a síndrome do desconforto respiratório agudo em ratos por meio da modulação da via NF-κB/MAPK. *Inflammopharmacol* **31**, 823–844 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10787-022-01133-5>.
- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., Taylor, R., 1997. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, 267(3), 727-748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>.

Kamble, B., Gupta, A., Patil, D., Khatal, L., Janrao, S., Moothedath, I., Duraiswamy, B., 2013. Determination of gymnemagenin in rat plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to pharmacokinetics after oral administration of *Gymnema sylvestre* extract. *Biomedical Chromatography*, 27(5), 669-677. <https://doi.org/10.1002/bmc.2845>.

Kanetkar, P., Singhal, R., Kamat, M., 2007. *Gymnema sylvestre*: A memoir. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 41(2), 77-81. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.2007010>.

Lamat, H., Sauvart-Rochat, M. P., Tauveron, I., Bagheri, R., Ugbole, U. C., Maqdasi, S., Navel, V., Dutheil, F., 2022. Metabolic syndrome and pesticides: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution*, 305, 119288. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119288>.

Li, Y., Xiao, Y., Gao, W., Pan, J., Zhao, Q., Zhang, Z., 2019. Gymnemic acid alleviates inflammation and insulin resistance via PPAR δ - and NF κ B-mediated pathways in db/db mice. *Food & Function*, 10(9), 5853-5862. <https://doi.org/10.1039/C9FO01419E>.

Li, M. M., Chen, Y. T., Ruan, J. C., Wang, W. J., Chen, J. G., & Zhang, Q. F., 2023. Structure-activity relationship of dietary flavonoids on pancreatic lipase. *Current research in food science*, 6, 100424. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.100424>.

Manimegalai, B., Velavan, S., 2019. Evaluation of anti-obesity activity of *Gymnema sylvestre* leaves extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8, 2170-2173

Morris, G. M. Huey, R., Lindstorm, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *Journal of Computational Chemistry*, 30, 2785-2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.

Muzaffar, H., Qamar, I., Bashir, M., Jabeen, F., Irfan, S., Anwar, H., 2023. *Gymnema sylvestre* supplementation restores normoglycemia, corrects dyslipidemia, and transcriptionally modulates pancreatic and hepatic gene expression in alloxan-induced hyperglycemic rats. *Metabolites*, 13(4), 516. <https://doi.org/10.3390/metabo13040516>.

O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., Hutchison, G. R., 2011. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>.

Patil, A. N., Nirmal, S. A., Chavan, A. K., 2013. Development and validation of HPTLC method for estimation of gymnemic acid in microencapsulated antidiabetic polyherbal formulations. *Acta Chromatographica*, 25, 601-613. <https://doi.org/10.1556/AChrom.25.2013.4.1>.

Persaud, S. J., Al-Majed, H., Raman, A., Jones, P. M., 1999. *Gymnema sylvestre* stimulates insulin release in vitro by increased membrane permeability. *Journal of Endocrinology*, 163, 207-212. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1630207>.

Phillips, J. C., Braun, R., Wang, J., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., Schulten, K., 2005. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1781-1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.

Ramos, L. P. A., Justino, A. B., Tavernelli, N., Saraiva, A. L., Franco, R. R., de Souza, A. V., Espindola, F. S., 2021. Antioxidant compounds from *Annona crassiflora* fruit peel reduce lipid levels and oxidative damage and maintain the glutathione defense in hepatic tissue of Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112049. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112049>.

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2007. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal*, 22, 659-661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>.

Reddy, R. M. I., Latha, P. B., Vijaya, T., Rao, D. S., 2012. The saponin-rich fraction of a *Gymnema sylvestre* R. Br. aqueous leaf extract reduces cafeteria and high-fat diet-induced obesity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 67, 39-44. <https://doi.org/10.1515/znc-2012-1-206>.

Satheeshkumar, N., Shantikumar, S., & Komali, M. (2014). *Identification and Quantification of Aldose Reductase Inhibitory Flavonoids in Herbal Formulation and Extract of Gymnema sylvestre Using HPLC-PDA and LC-MS/MS*. 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/518175>.

Shanmugasundaram, E.R.; Rajeswari, G.; Baskaran, K.; Rajesh Kumar, B.R.; Radha Shanmugasundaram, K.; Kizar Ahmath, B., 1990. Use of *Gymnema sylvestre* leaf extract in the control of blood glucose in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.* 30, 281-294. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90107-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90107-5).

Shigematsu, N., Asano, R., Shimosaka, Y., Okazaki, M., 2001. Effect of administration with the extract of *Gymnema sylvestre* R. Br leaves on lipid metabolism in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24, 713-717. <https://doi.org/10.1248/bpb.24.713>.

Sinsheimer, J.E., Rao, G.S., McIlhenny, H.M., 1970. Constituents from *Gymnema sylvestre* leaves. V: Isolation and preliminary characterization of the gymnemic acids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(5), 622–628. <https://doi.org/10.1002/jps.2600590510>.

Souza, G.H., Silva, B.P., Neto, GAV, Pilau, E., Barros, L., Bracht, L., Comar, J.F., Peralta, R.M., Bracht, A., Sá-Nakanishi, A.B., 2025. *Tamarindus indica* sub-products as potential tools for simultaneous management of diabetes and obesity. *Food & Function*, 2025, Mar 3;16(5):1969-1991. <https://doi: 10.1039/d4fo04536j>.

Stahl, A.; Hirsch, D.J., Gimeno, R.E., Punreddy, S., Ge, P., Watson, N., Patel, S., Kotler, M., Raimondi, A., Tartaglia, L.A., Lodish, H.F., 1999. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Molecular Cell*, 1999, 4, 299–308. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80332-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80332-9).

Tiwari, P., Mishra, B.N., Sangwan, N.S. Phytochemical and pharmacological properties of *Gymnema sylvestre*: an important medicinal plant. *Biomed Res Int.* 2014 ; 2014:830285. <https://doi.org/10.1155/2014/830285>.

Wang, Y., Dawid, C., Kottra, G., Daniel, H., Hofmann, T., 2014. Gymnemic acids inhibit sodium-dependent glucose transporter 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 25-30. <https://doi.org/10.1021/jf501766u>.

(WHO) World Health Organization. Obesity and Overweight; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021

ARTIGO 2: Mecanismos hipolipidêmicos da *Gymnema sylvestre* em modelo de hiperlipidemia aguda induzida pelo tiloxapol

Thalita Faleiros Demito Santos, Gustavo H. Souza, Beatriz Paes Silva, Gabriel Arcanjo Viana Neto, Luiz A. N. Pessoa, Tiane C. Finimundy, Lilian Barros, Paulo C. de Freitas Mathias, Livia Bracht, Jurandir F. Comar, Rosane M. Peralta, Adelar Bracht, Anacharis B. Sá-Nakanishi.

RESUMO

A hiperlipidemia é um distúrbio metabólico frequentemente associado à obesidade e à síndrome metabólica, sendo reconhecida como um fator de risco significativo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Embora haja um interesse crescente no uso de agentes fitoterápicos, as evidências científicas que comprovam a eficácia de plantas medicinais no manejo da hiperlipidemia aguda ainda são limitadas. *Gymnema sylvestre*, amplamente utilizada na medicina tradicional, especialmente na medicina ayurvédica e chinesa, destaca-se por suas propriedades anti-hiperglicêmicas e hipolipemiantes. A espécie contém compostos bioativos promissores, com potencial para modular a homeostase metabólica de forma eficaz. Desse modo, este estudo avaliou os efeitos preventivos do extrato padronizado de *G. sylvestre* 75 no perfil lipídico, no metabolismo e no estresse oxidativo em um modelo de hiperlipidemia aguda induzida por tiloxapol. Os ratos machos receberam *G. sylvestre* (400 mg/kg) durante três dias consecutivos por administração intragástrica. A hiperlipidemia aguda foi induzida por uma única injeção intraperitoneal de tiloxapol (400 mg/kg), e os animais foram eutanasiados 24 horas após, e o sangue e fígado coletados para as análises bioquímicas. O tratamento atenuou significativamente a hiperlipidemia induzida pelo tiloxapol, como evidenciado pela redução de triglicerídeo sérico, colesterol total, VLDL, glicose em jejum e índice HOMA-IR. Além disso, o extrato melhorou significativamente o estado oxidativo no plasma e no tecido hepático, reduziu a resistência à insulina e aumentou o índice HOMA- β . A avaliação dos ácidos gimnêmicos foi validada e normalizada a 78,3% de acordo com as especificações do fabricante. Embora a gimnemagenina tenha apresentado baixa probabilidade de ancoragem tanto para o receptor PPAR α como para o PPAR γ , as simulações de dinâmica molecular indicaram uma interação estável para ambos os receptores. Coletivamente, estes resultados demonstram que a *G. sylvestre* exerce efeitos hipolipidêmicos, anti-hiperglicêmicos e antioxidantes robustos, potencialmente mediados pela ativação do PPAR α e PPAR γ . Estes resultados apoiam o potencial terapêutico da *G. sylvestre* como estratégia complementar para a prevenção e controle da hiperlipidemia aguda e dos distúrbios metabólicos associados.

Palavras-chave: gimnemagenina; docking molecular; resistência à insulina; índice HOMA.

1. INTRODUÇÃO

A hiperlipidemia, definida por níveis plasmáticos elevados de triglicerídeos e colesterol, é um fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Abass et al., 2022; Singh et al., 2017). O aumento da prevalência global da hiperlipidemia é atribuído principalmente a padrões alimentares pouco saudáveis e a estilos de vida sedentários, apresentando desafios significativos para os sistemas de saúde pública (Mahboob, 2024). As perturbações do metabolismo dos lipídios estão estreitamente associadas a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que contribuem para o aumento do estresse oxidativo nos tecidos periféricos (Zalba et al., 2001). As EROs são moléculas altamente reativas que contém elétron não emparelhados, geradas fisiologicamente durante o metabolismo celular. No entanto, quando produzidas em excesso, as EROs podem induzir danos oxidativos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, prejudicando assim a função celular e desempenhando um papel central na patogênese da aterosclerose (Madamanchi et al., 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 17,9 milhões de mortes por ano (WHO, 2021). As evidências de ensaios clínicos em grande escala demonstraram que intervenções eficazes de redução dos lipídios séricos podem reduzir significativamente a mortalidade (Hurtado-Roca et al., 2017). Os tratamentos hipolipidêmicos atuais, como os fibratos, a niacina, as estatinas e os sequestrantes de ácidos biliares, estão associados a uma série de efeitos secundários, incluindo lesões musculares graves, diarreia, náuseas, irritação gástrica, disfunção hepática e renal e secura da pele (Beshir et al., 2021). Além disso, estudos recentes sugerem que a utilização prolongada de inibidores da biossíntese do colesterol pode ter um impacto negativo na neurotransmissão cerebral (Salem et al., 2011). Tendo em conta estas preocupações, a procura por compostos bioativos eficazes capazes de modular o metabolismo lipídico e, ao mesmo tempo, reduzir o estresse oxidativo tornou-se cada vez mais importante (Al-Hiari et al., 2011). Nos últimos anos, os compostos bioativos naturais têm atraído um interesse crescente no controle de distúrbios metabólicos, como a hiperlipidemia, devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e hipolipemiantes (Ramos et al., 2021). As plantas e os produtos derivados de plantas oferecem uma vantagem significativa para o tratamento devido aos seus diversos metabólitos secundários bioativos e mecanismos de ação pleiotrópicos (Ononamadu et al., 2019). As interações sinérgicas ou multifatoriais entre as moléculas do extrato podem melhorar os efeitos biológicos, para além de tender a ser compostos naturais de menor custo quando comparados com os sintéticos (Wagner e Ulrich-Merzenich 2009).

A *G. sylvestre* é uma planta indígena (família Asclepiadaceae), utilizada na medicina ayurvédica, bem como na medicina complementar e alternativa, como tratamento naturopático

para a diabetes. Também demonstra efeitos promissores no tratamento da obesidade, artrite, hiperlipidemia e hipercolesterolemia (Singh et al., 2008; Tiwari et al., 2014). Tradicionalmente consumida na forma de chá ou mastigando diretamente as suas folhas, a *G. sylvestre* transitou sem problemas para regimes dietéticos modernos, estando disponível nas formas de pó, comprimido e pastilha (Reddy, 2022). Sabe-se que as folhas de *G. sylvestre* contêm aproximadamente 18 ácidos gimnêmicos (AG) distintos, cada um caracterizado por diferenças sutis nas moléculas de açúcar ligadas à gimnemagenina, que constituem a sua espinha dorsal saponénica. Os AG são saponinas triterpenóides do tipo oleanano e são considerados os principais fitoquímicos ativos na preparação. Atualmente, a qualidade dos extratos, das formulações nutracêuticas e dos suplementos alimentares que contêm *G. sylvestre* é avaliada pelo teor de AG (Patil et al., 2013; Di Fabio et al., 2014). O extrato de *Gymnema sylvestre* 75 é muito utilizado em farmácia de manipulação e corresponde a um extrato concentrado contendo cerca de 75% de ácidos gimnêmicos.

As preparações de *Gymnema* não foram aprovadas como medicamentos na Europa, mas são comercializadas como ingredientes de certos suplementos alimentares, isoladamente ou em combinação com outras ervas e/ou micronutrientes. Como suplemento alimentar, é utilizado sem supervisão médica, mas é concebível que os suplementos alimentares à base de *Gymnema* possam também ser consumidos sozinhos ou em combinação com medicamentos antidiabéticos.

Alguns estudos em animais mostraram que a *G. sylvestre* diminuiu os níveis de glicose e triglicerídeos, colesterol-LDL e colesterol total no sangue quando o extrato foi administrado durante pelo menos 21 dias após hiperlipidemia e hiperglicemia induzidas por aloxano (Muzafar et al., 2023, Srinuanchai, et al., 2019). Em animais obesos induzidos por dietas ricas em gordura, o extrato de *G. sylvestre* mostrou uma redução significativa nos níveis de colesterol total, triglicerídeos, LDL e VLDL, enquanto aumentou os níveis de HDL quando administrado por 8 semanas após a instalação da obesidade (Singh et al., 2017; Kumar et al., 2013; Pothraju et al., 2016). Esses efeitos clínicos foram atribuídos à capacidade do extrato de *G. sylvestre* de aumentar a secreção de insulina, promover a regeneração das células das ilhotas pancreáticas, aumentar a utilização periférica de glicose e inibir a absorção de glicose no epitélio intestinal (Muzzaffar et al., 2023; Patel et al., 2009; Li et al., 2019; Ahmad et al., 2023). O receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ) é uma proteína alvo bem caracterizada no tratamento de hiperlipidemia e diabetes tipo 2 (Tyagi et al., 2011). Numerosos compostos foram relatados como agonistas de PPAR γ , destacando sua relevância como alvo terapêutico.

Recentemente, o nosso grupo de investigação revelou que a preparação comercial do extrato rico em AG (*G. sylvestre* 75) inibiu a enzima lipase pancreática de forma dependente da

concentração, com IC₅₀ de 484,6 µg/mL (Santos et al., 2025). Este fenômeno refletiu-se na inibição da absorção do triglicerídeo pelas células do epitélio intestinal, com ID₅₀ de 41 mg/kg de peso corporal, que resulta não só da inibição da lipase, mas também da inibição do complexo mecanismo de transporte e reesterificação dos ácidos graxos pelas células intestinais.

Embora tenham sido realizados alguns estudos científicos centrados na bioatividade hipolipidêmica da *G. sylvestre*, todos eles revelaram a ação terapêutica do extrato após a doença instalada em tratamento a longo prazo. Além disso, em todas as publicações a ação hipolipidêmica do extrato foi avaliada em condições de hiperlipidemia associadas a doenças de base como a obesidade e a diabetes. Assim, o presente trabalho teve como objetivo descrever o efeito preventivo do extrato comercial de *G. sylvestre* rico em ácido gimnêmico (“*Gymnema sylvestre* 75”) sobre o metabolismo sistêmico no modelo animal de hiperlipemia induzida por tiloxapol, um modelo agudo de hiperlipidemia. O estudo irá elucidar o potencial agonístico de fitoquímicos de *G. sylvestre* com proteína PPAR α e PPAR γ usando docking molecular e diferentes parâmetros de simulações de dinâmica molecular,

Tiloxapol (Triton WR-1339) é um tensoativo não iônico normalmente utilizado para induzir hiperlipidemia aguda em modelos animais experimentais. Atua inibindo a atividade da lipoproteína lipase e impedindo a absorção de lipoproteínas pelos tecidos extra-hepáticos, resultando em níveis elevados de lipídios circulantes. Além disso, o tiloxapol estimula a síntese hepática de colesterol (HMG-CoA redutase) e aumenta a absorção intestinal de lipídios através da emulsificação. Devido a estas propriedades, o tiloxapol é amplamente utilizado para estudar as alterações do metabolismo lipídico e para avaliar a eficácia de candidatos a agentes hipolipidêmicos em estudos pré-clínicos (Sousa et al., 2017; Goldfarb 1978).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e extrato

ABTS (ácido 2,2-azinobis (3-etilbenotiazolina-6-sulfônico), DPPH (2,2-di-fenil-1-picril-hidrazil), ácido etileno diaminotetracético (K₃EDTA), 2,4, 6-tripiridil-s-trizina (TPTZ), Tris, DNPH (2,4-Dinitrofenil-hidrazina), 1,1,3,3-Tetraetoxipropano, ácido oleico, foram adquiridos à Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, EUA). O extrato concentrado de folhas de *Gymnema sylvestre* (“*Gymnema sylvestre* 75”) foi adquirido de uma farmácia de manipulação local (Manipulação Farmácias São Paulo, Maringá, PR), fabricado pela SM Pharmaceutical Enterprise®. Data de fabricação: 03 de março de 2022, Número do lote: 22C26-B025-090888, *Gymnema sylvestre* 75 é uma preparação fitoterápica disponível comercialmente derivada do extrato da folha de *Gymnema sylvestre*, concentrada e padronizada para conter 75% de ácido

gimnêmico. Todos os produtos químicos foram obtidos com o grau de pureza mais elevado possível (>95%).

2.2 Ensaios antioxidantes e teor de fenólicos e aminoácidos no extrato

Três ensaios químicos distintos foram empregados para avaliar a atividade antioxidante do extrato: poder redutor férrico (FRAP), eliminação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e descoloração do cátion radicalar 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS⁺) (Correa et al. (2024). Diluições seriadas dos diferentes extratos foram preparadas e utilizadas nesses ensaios. A porcentagem de eliminação de radicais para DPPH e ABTS foi calculada usando a equação: $[(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle}] \times 100$. Os resultados foram expressos como valores IC₅₀, representando a concentração de extrato (µg/mL) necessária para inibir 50% da atividade radicalar.

Os resultados de FRAP foram expressos como k_(FRAP), definido como a inclinação inicial da regressão linear obtida a partir do gráfico da absorbância versus concentração do extrato, em unidades de min⁻¹. Esse parâmetro reflete uma constante de velocidade de pseudo-primeira ordem, indicando a velocidade na qual o íon férrico é reduzido na presença do extrato (Souza et al., 2025).

O teor de fenólico total do extrato foi quantificado utilizando o método de Folin-Ciocalteu e expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extrato, tal como descrito por Singleton e Rossi (1965).

O conteúdo de aminoácidos totais foi determinado utilizando o ensaio da ninidrina. A quantificação foi efetuada com base numa curva de calibração construída com padrões de alanina, e os resultados foram expressos em µmoles por grama de extrato bruto (Starcher, 2001).

2.3 Quantificação do perfil fenólico do extrato de *G. sylvestre*

O extrato seco foi ressuspenso em solução aquosa de etanol (80:20 v/v), a uma concentração de 10 mg/mL, e filtrados (0,2 µm). O perfil fenólico do extrato foi determinado por cromatografia líquida (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), com um detetor de matriz de diodos (comprimentos de onda de 280, 330 e 370 nm) ligado a uma espectrometria de massa de ionização por electrospray funcionando em modo negativo (Linear Ion Trap LTQ XL, Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). O nitrogênio foi utilizado para nebulização (50 psi); o sistema foi operado com uma tensão de pulverização de 5 kV, uma temperatura de fonte de 325 °C, uma tensão capilar de -20 V. A voltagem do tubo de focalização foi mantida em -66 V. A varredura completa cobriu um intervalo de m/z 100 a 1800 (Bessada et al. 2016). A aquisição de dados foi efetuada com o sistema de dados Xcalibur®

(ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA). Os compostos fenólicos foram identificados de acordo com as suas características cromatográficas, pela sua retenção, espectros de absorção e características de massa em comparação com os compostos padrão obtidos e com a literatura. Para a análise quantitativa, foram utilizadas curvas de calibração preparadas com padrões adequados. Os resultados foram expressos em mg por g de extrato seco (mg/g) como média $\pm$ desvio padrão de três análises independentes.

2.4 Animais

Todos os experimentos com animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (protocolo número 9905181121). Para o modelo de hiperlipidemia aguda induzida por tiloxapol foram utilizados ratos machos (Wistar) com peso entre 240 a 290 g (aproximadamente 80 dias) (Sousa et al., 2017). Os animais foram alimentados *ad libidum* com uma dieta padrão de laboratório (Nuvilab, Colombo, Brasil) e mantidos em um ciclo regular de claro-escuro. Para os experimentos *in vivo*, os animais foram mantidos em jejum por 18 horas.

2.5 Hiperlipidemia induzida por tiloxapol

Os animais foram separados nos três grupos seguintes: animais tratados com água (Controle), animais tratados com água e injeção de tiloxapol (Grupo hiperlipidêmico); animais tratados com extrato de *G. sylvestre* e injeção de tiloxapol (Grupo hiperlipidêmico tratado).

A dose do extrato utilizada neste estudo foi determinada com base em investigações preliminares e corroborada por relatórios previamente publicados (Silvério et. al. 2013; Malik et al., 2007, Santos et al., 2025). O extrato na dose de 400 mg/kg de peso corporal foi administrado aos animais por gavagem durante 3 dias. No 3º dia de tratamento, a hiperlipidemia foi induzida intraperitonealmente pela administração de tiloxapol em dose única de 400 mg/kg de peso corporal.

2.6 Teste de tolerância oral à glicose e ao piruvato em animais

Os níveis de glicose no sangue foram quantificados em animais em jejum (tempo zero) e 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de uma carga de glicose (1,5 g/Kg) por via oral (oGTT). O sangue foi coletado por punção venosa da cauda, e o teor de glicose quantificado através de glicosímetro (Accucheck Active®).

Para a avaliação da gliconeogênese a partir do piruvato, os níveis de glicose no sangue foram monitorizados em jejum (tempo zero) e após a administração de uma carga de piruvato (2 g/kg) por via oral, tendo o teor de glicose sido quantificado através de um glicosímetro a

partir de sangue coletado por punção venosa da cauda, tal como descrito no oGTT. Os resultados foram apresentados ao longo do tempo após a administração de piruvato de sódio (0, 30, 60 min.) e foram utilizados para calcular a área sob a curva (AUC).

2.7 Coleta de amostras de sangue e de fígado

Os animais em jejum de 18 h. foram anestesiados com a associação de cetamina + xilazina (90 e 9 mg/Kg, i.p.), as amostras de sangue foram obtidas por punção da veia cava inferior com ácido etileno diaminotetracético de potássio (K_3EDTA) e centrifugadas a 3.500 g (15 min.). O plasma obtido após centrifugação do sangue foi aliquotado para análise posterior. O fígado foi removido e congelado imediatamente em nitrogênio líquido e mantido a -80 °C para avaliação dos parâmetros oxidativos.

2.8 Insulina plasmática e marcadores de resistência à insulina

Os níveis de insulina plasmática foram quantificados por radioimunoensaio (RIA), em contador gama (Wizard2 Automatic Gamma Counter, TM-2470, PerkinElmer®, Shelton, CT, EUA). Foi utilizada como padrão a insulina humana. O anticorpo foi anti-insulina de coelho (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e a insulina radioativa utilizada foi a insulina humana recombinante marcada com Iodo125 (PerkinElmer, Shelton CT, EUA). Os coeficientes de variação intra-ensaio situaram-se no intervalo de 8-10 %. O limite de detecção foi de 0,006 ng/ml. As medições foram efetuadas num único ensaio.

O modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR) foi utilizado como um índice fisiológico para avaliar a resistência à insulina. O HOMA-IR foi calculado multiplicando a concentração de glicose no sangue em jejum (mg/dL) pela concentração de insulina sérica em jejum (ng/mL) e dividindo o resultado por 22,5. Para estimar a capacidade secretora das células beta pancreáticas, foi utilizado o modelo de avaliação da função de células beta (HOMA- β). Este índice foi obtido a partir das concentrações de glicose e insulina em jejum, através da seguinte fórmula: (HOMA- β) = (insulina em jejum [ng/mL] $\times$ 20 / glicose em jejum [mg/dL]) - 3,5 (Torrezan et al., 2019).

Adicionalmente, foi calculado o índice triglicérido-glicose (TyG), um marcador preditivo de resistência à insulina e doença cardiovascular, através da fórmula: Índice TyG = $\text{Ln} [\text{triglicéridos em jejum (mg/dL)} \times \text{glicose em jejum (mg/dL)} / 2]$ (Araújo et al., 2022).

2.9 Parâmetros bioquímicos

Os níveis plasmáticos de colesterol total (CT), triacilglicerol (TAG), lipoproteína de alta densidade (HDL) e glicose foram determinados usando kits de reação disponíveis

comercialmente (Labtest Diagnóstica, MG, Brasil). Os níveis plasmáticos de lipídios e glicose foram expressos em mg/dL.

Os níveis de colesterol não HDL foram calculados pela diferença entre os níveis de colesterol total e HDL-colesterol (da Rocha et al., 2009). Refere-se à quantidade de colesterol transportada por todas as lipoproteínas aterogênicas (prejudiciais) no sangue. O índice de risco cardíaco (IRC) foi obtido através da razão entre triacilgliceróis e HDL (Shanmugasundaram et al., 1989).

As atividades da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST), quantificadas como marcadores de lesão hepática, foram determinadas utilizando-se kits de ensaio comercialmente disponíveis (Labtest Diagnóstica, MG, Brasil). As atividades enzimáticas foram expressas em U/L.

2.10 Parâmetros oxidativos

O fígado clampeado foi homogeneizado em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4), 10% p/v com a ajuda de um homogeneizador Van Potter-Elvehjem. Aliquotas de homogenato foram centrifugadas a 11 000 g (15 min.) e o sobrenadante obtido após a centrifugação foi separado para análise posterior.

Os grupos carbonilas das proteínas foram medidos espectrofotometricamente no sobrenadante do homogenato de fígado e no plasma utilizando 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), tal como descrito anteriormente (Levine et al., 1990). O coeficiente de extinção molar (ϵ) de $2,20 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ foi utilizado nos cálculos e os resultados foram expressos em nmol de grupos carbonil por mg de proteína.

Os níveis de lipoperóxidos foram quantificados no homogenato de fígado por meio do ensaio TBARS (ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (Buege et al., 1978). O conteúdo em TBARS foi calculado a partir da curva padrão preparada com 1,1',3,3'-tetraetoxipropano, e os resultados foram expressos em nmol por mg de proteína.

As atividades da catalase e da superóxido dismutase (SOD) foram analisadas por espectrofotometria no sobrenadante do homogenato de fígado. A atividade da catalase foi estimada a 240 nm a partir da diminuição da absorbância do H_2O_2 (substrato) (Bergmeyer 1974). A atividade da SOD foi estimada pelo método de autooxidação do pirogalol em pH 8,2 a 420 nm (Marklund e Marklund, 1974). Os resultados foram expressos em unidades de SOD (U) por mg de proteínas.

A concentração de grupos tióis totais no plasma foi determinada utilizando o reagente DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)), conforme descrito por Ellman (1959), com adaptações. A reação com DTNB (10 mM) ocorreu por 15 minutos de incubação à temperatura

ambiente e protegido da luz, e em seguida a absorbância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. A concentração de tióis foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de $13.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, sendo os resultados expressos em μmol de tióis por mg de proteínas.

Proteínas totais foram quantificadas no sobrenadante, homogenato e plasma por meio do reativo de Folin Cialcateau, e os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão de albumina (Singleton e Rossi, 1965).

2.11 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda oral foi conduzida de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), Test Guideline 425. Ratos em jejum (12h) com livre acesso a água, previamente pesados, receberam uma dose única intragástrica do extrato a 2.000 mg/kg de peso corporal. O grupo controle recebeu apenas veículo (água). Cada animal foi monitorado individualmente durante os primeiros 30 minutos após a administração e depois foram realizadas observações durante as 4 e 24 horas seguintes. Além disso, os animais foram observados pelo menos duas vezes por dia durante um período de 14 dias. Os sinais clínicos de toxicidade, incluindo letargia, hipertermia, prurido, respiração, consistência das fezes, alterações comportamentais, diaforese ou outros efeitos adversos, bem como a mortalidade, foram registados durante todo o período de observação. Também foi investigado a possibilidade de lesão hepática após o tratamento por três dias consecutivos com o extrato na dose de 400 mg/kg . Para tanto, as atividades plasmáticas da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato-aminotransferase (AST) foram determinadas por meio de ensaios enzimático-cinético utilizando kit comercial (Gold-Analisa®).

2.12 Previsão farmacocinética pelo SwissADME

A triagem farmacocinética *in silico* (ADME) e a avaliação da semelhança com drogas foram realizadas usando a ferramenta online gratuita SwissADME, desenvolvida pelo Instituto Suíço de Bioinformática (Daina et al., 2017). Esta plataforma foi utilizada para estimar as propriedades farmacocinéticas individuais (ADMET) e os parâmetros de semelhança dos compostos identificados no extrato com drogas. Inicialmente, a base de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi utilizada para obter o SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) canônico para cada composto. Estas cadeias SMILES foram depois utilizadas como entrada para a estimativa de parâmetros através do SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>; acessado em 5 de dezembro de 2024). O objetivo foi validar e dar prioridade a compostos promissores dentro do extrato para investigação adicional como potenciais contribuintes para o efeito de redução de lipídeos observado. Foram avaliadas

as seguintes propriedades ADMET: absorção gastrointestinal (GI); permeação da barreira hemato-encefálica (BBB); inibição do sistema do citocromo P450; e substrato da glicoproteína de permeabilidade (P-gp). Além disso, a semelhança com o fármaco foi avaliada utilizando: parâmetros de semelhança com o fármaco (ADME): Filtro de Lipinski e pontuação de biodisponibilidade.

2.13 Docking molecular

Com intuito de investigar o principal fitoquímico identificado no extrato responsável pelo efeito hipolipemiante no plasma, as estruturas tridimensionais de quatro constituintes encontrados nesta espécie e identificados por UHPLC-ESL-O-TOF-MS/MS foram obtidas a partir da base de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e preparadas utilizando Open Babel (O'Boyle et al., 2011) para as análises *in silico* subsequentes. A estrutura do PPAR γ e PPAR α (PDBid: 2XKW, resolução de 2,02 Å), complexada com um agonista experimental pioglitazona (P1B) and bezafibrato (PEM), foi submetida a docking geométrico, transferindo o agonista para uma estrutura com maior integridade (PDBid: 3B3K, resolução de 2,60 Å) (Montanari et al., 2009). Todas as moléculas de água foram removidas. O complexo PPAR γ e PPAR α (3B3K-P1B) foi minimizado e validado com o gráfico de Ramachandran (Gopalakrishnan et al., 2007). Foram utilizados os softwares AutoDock Vina (Trott e Olson 2010), implementado na interface gráfica Pyrx 0.8 (Dallakyan et al., 2015), e GOLD (Jones et al., 1997). Os parâmetros para ancoragem molecular foram estabelecidos através da redocking de P1B e PEM no complexo minimizado com PPAR γ e PPAR α respectivamente usando bibliotecas de dinâmica molecular NAMD2/VMD (Phillips et al., 2005 e Humphrey et al., 1996) com 30.000 passos de gradiente conjugado. A melhor score forneceu um desvio quadrático médio da raiz (RMSD) entre duas poses abaixo de 2,0 Å (Tuccinardi et al., 2014) usando o servidor de cálculo de distância de pose de acoplamento (<https://zhanggroup.org/DockRMSD/>).

A pontuação média relativa (MRS) foi calculada a partir da pontuação média de acoplamento de cada composto em quatro simulações realizadas com cada programa (Equação 2) (Souza et al., 2025). Nessa equação, MRS é o score médio relativo, N_p , o número de programas de docagem molecular usados nas simulações, “Sp1” significa o escore médio do composto em quatro simulações usando o programa AutoDock Vina, enquanto “BSp1” denota o maior score observado entre os compostos da biblioteca no programa AutoDock Vina; o mesmo conceito se aplica aos resultados do programa Gold, mas aqui será usado Sp2 e BSp2. A MRS permite a classificação dos compostos com o PPAR α e o PPAR γ utilizando o ligante PEM e P1B como referência, respectivamente.

$$MRS = \frac{1}{N_p} \left(\frac{S_{p_1}}{BS_{p_1}} + \frac{S_{p_2}}{BS_{p_2}} + \dots \right) \quad (2)$$

2.14 Dinâmica molecular

Para quantificar e clarificar as pontuações de acoplamento molecular, foram efetuadas simulações prolongadas de dinâmica molecular (MD) com todos os átomos equilibrados durante 50 ns. O modelo de água TIP3P foi utilizado para a solvatação, com variáveis moléculas de água para cada ligante. Os sistemas foram solvatados e neutralizados com ions Na⁺. Após a minimização da energia, o equilíbrio e a simulação MD de 50 ns, as alterações estruturais e o comportamento dinâmico foram avaliadas. O RMSD relacionado com a modificação da estrutura, o raio de giro para o grau de compactação de uma proteína e a flutuação da raiz quadrada média (RMSF) relacionada com a estabilização dos resíduos foram calculados a partir dos átomos da cadeia principal da proteína após o alinhamento das estruturas na estrutura de referência utilizando VMD. As simulações de MD foram realizadas no CENAPAD/Unicamp, Brasil, com o sistema Dell AMD Epyc 7662 / nVIDIA Tesla A100.

2.15 Cálculos e critérios estatísticos

A interpolação numérica para a determinação da IC₅₀ (concentrações necessárias para reduzir 50% da atividade) foi efetuada utilizando o software Scientist da MicroMath Scientific Software (Salt Lake City, UT). Os resultados são apresentados como média ± EPM de análises independentes (n=4-6). As análises estatísticas foram efetuadas através de uma análise de uma variância (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey. Isto permitiu-nos determinar diferenças significativas entre os diferentes grupos de tratamento, p<0,05. Os resultados estatísticos detalhados, incluindo valores de p, tamanhos de amostra (n) e estatísticas de teste, são fornecidos para cada figura e tabela.

3. RESULTADOS

3.1 Atividade antioxidante e teores fenólicos totais do extrato de *G. sylvestre*

Como etapa inicial da caracterização do extrato de *Gymnema sylvestre*, foi avaliada sua capacidade antioxidante *in vitro*. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 1. A atividade antioxidante, avaliada por meio dos ensaios ABTS e DPPH, foi expressa em valores de IC₅₀, os quais representam a concentração do extrato necessária para neutralizar 50% dos respectivos radicais durante o período de incubação (ver seção de Materiais e Métodos para detalhes dos ensaios). O extrato apresentou maior capacidade antioxidante no ensaio ABTS quando comparado ao DPPH, conforme observado pelos menores valores de IC₅₀ para o primeiro. A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada posteriormente pela capacidade

de reduzir íons férricos, que foi de $0,017 \text{ min}^{-1}$. Considerando que a capacidade antioxidante dos extratos vegetais está frequentemente relacionada ao teor de grupos fenólicos, este último foi quantificado e o resultado apresentado na Tabela 1 revela valores de 29,00 mg de equivalente de ácido gálico por grama de extrato. A Tabela 1 também apresenta a concentração de aminoácidos do extrato que foi de $61,10 \text{ } \mu\text{mol}$ por g de extrato.

Tabela 1: Atividade antioxidante, grupos fenólicos e conteúdo de aminoácidos no extrato de *Gymnema sylvestre*

Parâmetro	Extrato de <i>Gymnema sylvestre</i>
ABTS (IC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$)	$83,69 \pm 8,030$
DPPH (IC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$)	$217,99 \pm 20,91$
FRAP (K_{FRAP}) (min^{-1})	$0,017 \pm 0,001$
Grupos fenólicos (mg GAE eq)/g)	$29,00 \pm 4,026$
Conteúdo de aminoácidos ($\mu\text{mol/g}$)	$61,10 \pm 4,501$

Os dados são representados como média $\pm$ erro padrão médio ($n = 4$). GA: Ácido gálico.

3.2 Perfil fenólico do extrato de *G. sylvestre*

Na tentativa de caracterizar o perfil fenólico do extrato, foram realizadas análises cromatográficas associadas ao espectro de massas. Os resultados são apresentados na Tabela 2. Os compostos fenólicos individuais foram identificados provisoriamente de acordo com seu tempo de retenção (R_t), comprimento de onda de absorbância máxima (λ_{max}), íon pseudomolecular ($[\text{M}-\text{H}]^-$) e respectivo padrão de fragmentação (MS^2). Foi possível identificar vinte e seis compostos fenólicos: três ácidos fenólicos, vinte flavonoides e três saponinas triterpenoides. Os flavonoides são principalmente derivados glicosilado contendo kaempferol ou quercetina (aglicona) como núcleo central. Também foi encontrado com a análise exploratória do extrato gimnemosídeos, gimnemagenina e derivados de gimnemosídeo. Ao contrário de todas as outras moléculas, estas não foram quantificadas devido à ausência de uma curva de padrão. Entretanto, de acordo com o laudo do fornecedor (SM Pharma), o extrato padronizado contém 78,3% de ácidos gimnêmicos.

As moléculas encontradas em maiores quantidades no extrato foram os flavonoides, que constituíram quase 90% do conteúdo fenólico total. Os principais flavonoides identificados e quantificados foram kaempferol-3-O-glucosil-dirhamnosil-galactosídeo (0,64 mg/g) e quercetina-3-O-cumaril-feruloil-soforosídeo (0,54 mg/g). Todos os outros flavonoides quantificados foram derivados ou de quercetina ou de kaempferol. Os ácidos fenólicos mais abundantes encontrados foram o ácido protocatecuico-4-glicosídeo (0,79 mg/g) seguido por 1-O-protocatecuil- β -xilose (0,33 mg/g) e trans-p-cumaril- β -d-glicopiranosídeo (0,061 mg/g).

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	[MH] ⁻ m/z	MS ² (m/z)	Identificação provisória	Média ± sd
1	5.16	279	315	153(100),109(8)	Ácido protocatecuico-4-glicosídeo	0,790±0,03
2	8.32	278	285	153(100),109(18)	1- O -Protocatecuil-β-xilose	0,331±0,01
3	11.06	315	325	163(100),135(21)	trans-p-cumaroil-β-d-glucopiranosídeo	0,061±0,002
4	12,47	336	771	609(41),505(100),285(14)	Kaempferol-3- O -β-d-diglucoiranosídeo 7- O -β-d-glucopiranosídeo	0,512±0,001
5	14,86	334	755	593(100),447(24),285(9)	Kaempferol-3- O -glucosil-ramnosil-galactosídeo	0,525±0,002
6	15,55	328	1109	933(100),787(51),301(21)	Quercetina 3-(2- p -cumaroil-feruloil-soforosídeo)-7-glicosídeo	0,495±0,001
7	15,99	328	785	609(100),429(38),285(21)	Kaempferol-3- O -feruloil-soforosídeo	0,4768±0,0005
8	16.24	331	785	623(18),315(100)	Isorhamnetina-hexosil-cumaroilexose	0,479±0,001
9	17,61	314	505	221(10),161(100)	Gimnemenina	nq
10	18.14	325	1063	917(51),755(100),575(33),285(5)	Kaempferol-3- O -glucosil-dicumaroil-dihexosídeo	0,472±0,0004
11	18.43	328	1123	947(100),771(61),625(46),301(8)	Quercetina-3- O -cumaroil-diferuloil-soforosídeo	0,4688±0,0002
12	20.07	327	947	771(100),625(25),301(14)	Quercetina-3- O -cumaroil-feruloil-soforosídeo	0,548±0,003
13	20h45	317	917	771(100),631(30),285(18)	Kaempferol-3-(2- p -cumaroil-soforosídeo)-7-glicosídeo	0,524±0,002
14	20,69	326	1285	933(100),787(48),463(26),301(7)	Quercetina-3-(2- p -cumaroil-diferuloil)-sofotriósido	0,476±0,0003
15	21.21	328	1255	1109(100),933(68),625(11),301(6)	Quercetina-3-(2- p -dicumaroil-feruloil)-sofotriósido	0,484±0,0004
16	21,52	326	1257	933(100),301(25)	Quercetina-3-(2- p -cumaroil-soforotriósido)-7-soforosídeo	0,492±0,001
17	22,57	326	931	755(100),593(40),447(24),285(9)	Kaempferol-3- O -glucosil-ramnosil-feruloil-galactosídeo	0,515±0,002
18	23.04	318	901	609(100),447(19),285(7)	Kaempferol-3- O -glucosil-dirhamnosil-galactosídeo	0,640±0,006
19	23,67	323	961	785(100),609(74),285(12)	Kaempferol-3- O -diferuloil-soforosídeo	0,475±0,0005
20	23,87	318	1239	1063(100),917(68),771(41),285(10)	Kaempferol-3-(2- p -dicumaroil-feruloil)-soforotriósido	0,468±0,0002
21	24.03	319	1299	1123(100),947(61),771(32),625(27),301(7)	Quercetina-3- O -cumaroil-triferuloil-soforosídeo	0,4717±0,0003
22	24,28	323	931	623(100),315(26),301(8)	4- O -Metilquercetina-rutinosil-rutinosídeo	0,468±0,0003
23	24,91	322	1269	1093(100),917(54),325(41),301(12)	Quercetina-3- O -dicumaroil-diferuloil-soforosídeo	0,483±0,001
24	30.04	322	681	505(100),301(45)	Quercetina-3- O -feruloil-acetilhexosídeo	0,471±0,0004
25	31.31	278	827	665(100),489(61),421(6)	Gymnemoside	nq
26	32,48	279	945	813(100),651(33),489(7)	Derivado de gymnemosídeo	nq
Ácidos fenólicos totais						1,18±0,04
Flavonóides totais						9,95±0,01
Compostos fenólicos totais						11,13±0,02

Tabela 2: Tempo de retenção (Rt), comprimentos de onda de máxima absorção na região do visível (λ_{max}), dados espectrais de massa, identificação e quantificação (mg/g de extrato) de compostos fenólicos no extrato de *G. sylvestre*.

Nq: não quantificado. Curva de calibração utilizada: ácido gálico ($y = 131538x + 292163$, $R^2 = 0,9969$, LOD = 8,05 µg/mL e LOQ = 24,41 µg/mL); ácido clorogênico ($y = 168823x - 161172$; $R^2 = 0,9999$; LOD = 0,20 µg/mL; LOQ = 0,68 µg/mL); ácido clorogênico ($y = 168823x - 161172$; $R^2 = 0,9999$; LOD = 0,20 µg/mL; LOQ = 0,68 µg/mL); quercetina 3-O-glicosídeo ($y = 34843x - 160173$; $R^2 = 0,9998$; LOD = 0,21 µg/mL; LOQ = 0,71 µg/mL)

3.3 Efeitos do extrato de *G. sylvestre* no perfil lipídico e marcadores cardíacos em animais hiperlipidêmicos

Considerando que o extrato de *G. sylvestre* inibiu a absorção de triglicerídeos em células intestinais de animais (Santos et al., 2025), outros possíveis mecanismos de ação de *G. sylvestre* foram investigados em modelos de hiperlipidemia aguda *in vivo*. A Figura 1 revela o

efeito do extrato no perfil lipídico de animais hiperlipidêmicos induzidos por tiloxapol. Conforme esperado, o modelo experimental apresentou níveis elevados de triglicerídeos séricos e colesterol total, em concordância com dados previamente descritos na literatura (Souza et al., 2017). Esses aumentos foram 26 e 4 vezes maiores respectivamente em relação ao grupo controle. O tratamento com *G. sylvestre* impediu esse aumento em 1,9 e 1,4 vezes, mas ainda manteve os níveis mais elevados do que os do controle. O aumento do conteúdo de triglicerídeos refletiu no aumento do colesterol-VLDL em grau semelhante ao mesmo no grupo hiperlipidêmico. O tratamento, por sua vez, bloqueou parcialmente esta elevação, de forma semelhante ao efeito sobre o conteúdo de triglicerídeos. O colesterol HDL não foi modificado nem pela hiperlipidemia nem pelo tratamento com *G. sylvestre*. Os teores de triglicerídeos e HDL foram utilizados para calcular o risco cardiovascular pela razão entre eles. Este índice foi 34 vezes maior em animais hiperlipidêmicos do que em animais controle, e o extrato bloqueou esse aumento, reduzindo-o pela metade. O perfil lipídico também foi utilizado para calcular o conteúdo de colesterol não-HDL, outro marcador cardiovascular, que foi bastante elevado pela hiperlipidemia, mas o extrato prejudicou parcialmente esse aumento, reduzindo em 5 vezes o valor da condição hiperlipídica.

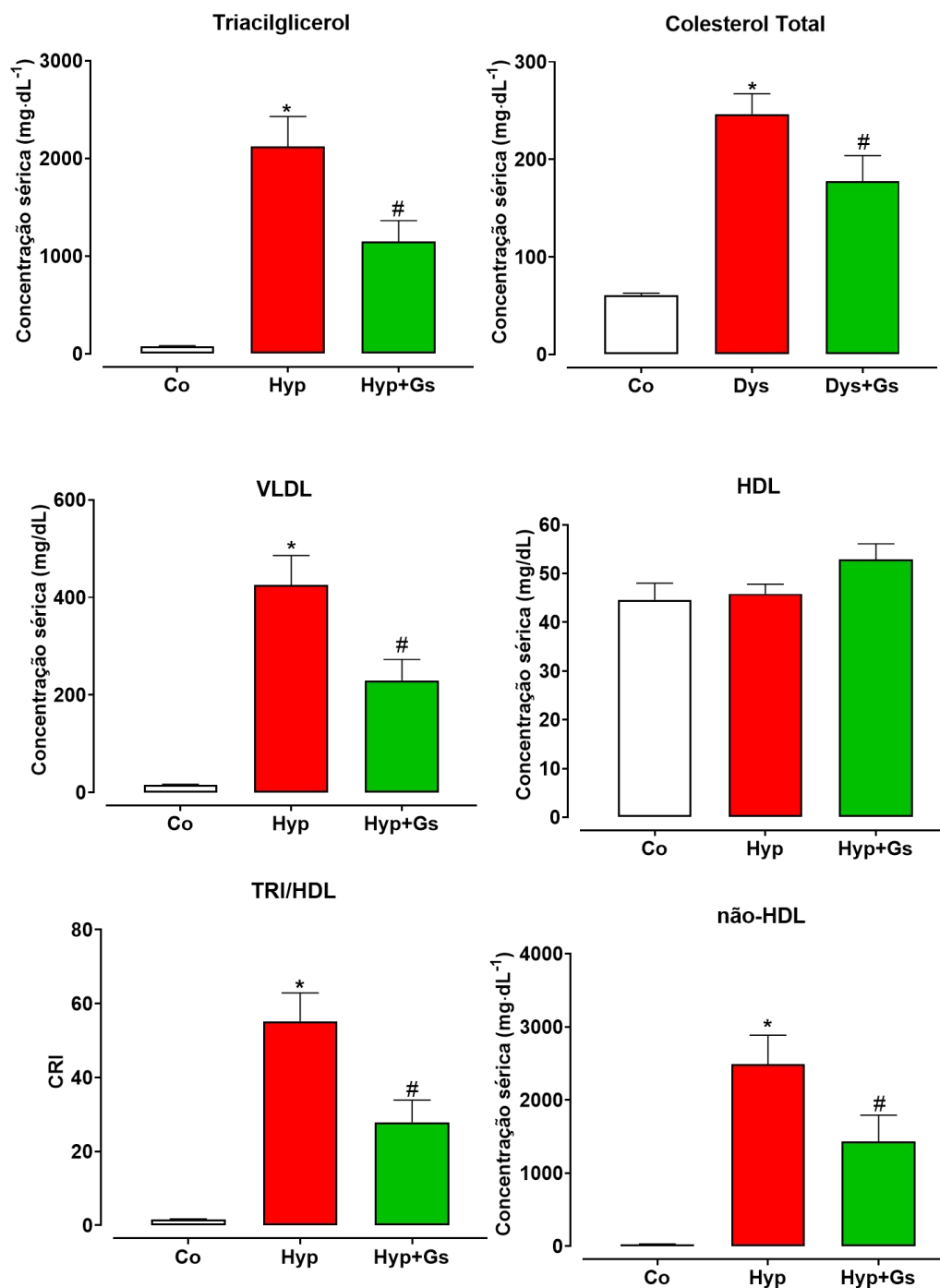


Figura 1. Efeito do extrato de *Gymnema sylvestre* sobre os lipídios séricos e marcadores plasmáticos em animais hiperlipidêmicos. A hiperlipidemia foi induzida pela administração de tiloxapol (400 mg/kg) conforme descrito na seção de material e métodos. O tratamento foi realizado durante três dias com *G. sylvestre* (400 mg/kg) previamente à indução da hiperlipidemia. Cada valor representa a média ± erro padrão média de 4-6 animais. Co: controle; Hyp: animais hiperlipidêmicos; Hyp+Gs: animais tratados submetidos à hiperlipidemia. * e #: Diferença estatística em relação ao grupo controle e hiperlipidêmico respectivamente, de acordo com ANOVA One-way, teste post-hoc de Tukey (Programa Prisma 8.0), ($p < 0,05$).

3.4 Efeitos do extrato de *G. sylvestre* sobre o perfil glicêmico e marcadores de resistência à insulina em animais hiperlipidêmicos

A Fig. 2 mostra o efeito de *G. sylvestre* na glicemia de jejum, nos níveis de insulina, no

índice HOMA e no teste de tolerância à glicose e ao piruvato em animais hiperlipidêmicos. O conteúdo de glicose em jejum aumentou em animais hiperlipidêmicos quando comparados ao grupo controle. Este aumento foi de 24%. O extrato, por outro lado, impediu esta elevação induzida pela hiperlipidemia, mantendo os níveis de glicose semelhantes aos do grupo controle. Os níveis de insulina plasmática em jejum foram quantificados (Fig. 2B). Embora o extrato de *G. sylvestre* tenha revelado uma tendência a aumentar esse conteúdo, o mesmo não apresentou significância estatística. Os níveis de glicose e insulina de jejum foram utilizados para calcular o índice HOMA-IR e o índice HOMA- β (Fig. 2C e 2 D, respectivamente). O HOMA-IR foi elevado pela hiperlipidemia em 138%, mas o extrato preveniu parcialmente esse aumento, mantendo-o em níveis 76% superiores aos do controle. Por outro lado, o HOMA- β foi reduzido pela metade em animais hiperlipidêmicos, e o extrato impediu a redução e a manteve-o próximo aos níveis do grupo controle.

Para avaliar a capacidade de metabolização da glicose, o perfil glicêmico temporal foi avaliado após a administração de uma carga de glicose em animais em jejum. A Fig. 2E ilustra um aumento acentuado no conteúdo de glicose em todos os três grupos, atingindo um pico 30 minutos após a administração do carboidrato. No grupo controle, os níveis de glicose diminuíram gradualmente ao longo do tempo, enquanto, nos animais hiperlipidêmicos o declínio foi mais lento, mantendo-o 33,3% mais altos do que os do grupo controle ao final do experimento. Em contraste, os animais hiperlipidêmicos tratados com o extrato de *G. sylvestre* apresentaram perfil de variação dos níveis de glicose semelhante a condição controle, indicando que o extrato atenuou a alteração induzida pela hiperlipidemia. Uma abordagem alternativa para representar a variação temporal de glicose após administração de uma sobrecarga da mesma é através do cálculo da área sob a curva (AUC) do perfil glicêmico ao longo do tempo, que integra as concentrações de glicose e exclui o tempo como parâmetro independente (Figura inserida no painel 2E). A AUC não foi alterada pela hiperlipidemia, entretanto, o extrato foi capaz de reduzi-la a um nível inferior ao do grupo controle.

A velocidade da gliconeogênese foi avaliada *in vivo* usando o teste de tolerância ao piruvato (TTP). Neste ensaio, uma carga de piruvato foi administrada a animais em jejum, e os níveis de glicose sérica foram medidos ao longo do tempo. Os resultados são apresentados como a área sob a curva (AUC) na Fig. 2F. A AUC aumentou em condições hiperlipidêmicas em aproximadamente 41% em comparação com o grupo controle. No entanto, o pré-tratamento com o extrato preveniu efetivamente esse aumento, mantendo os valores em níveis comparáveis aos do controle.

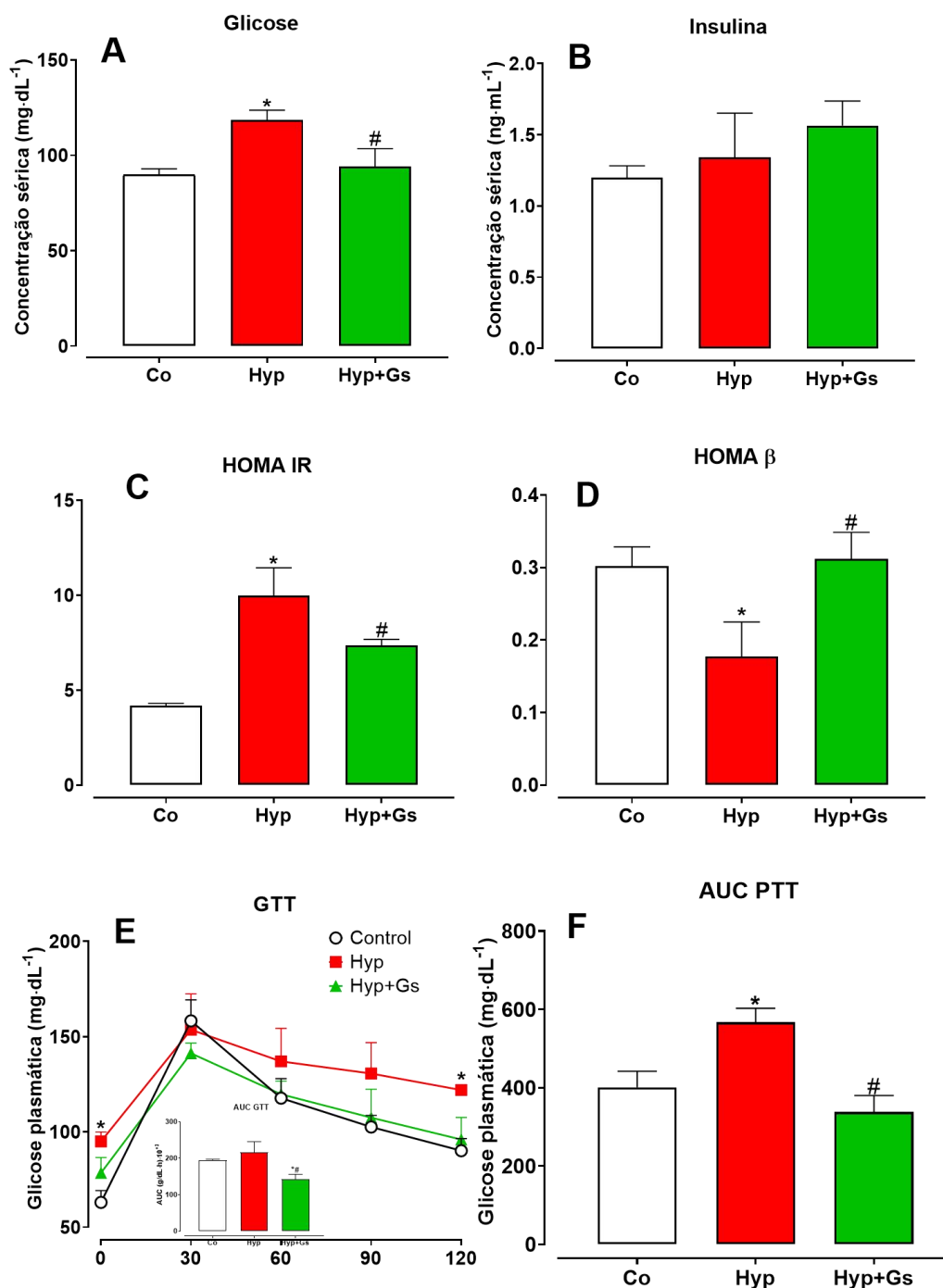


Figura 2. Efeito do extrato de *Gymnema sylvestre* sobre os parâmetros glicêmicos, níveis de insulina e resistência à insulina no plasma de animais hiperlipidêmicos. A hiperlipidemia foi induzida pela administração de tiloxapol (400 mg/kg) conforme descrito na seção de material e métodos. O tratamento foi realizado durante três dias com *G. sylvestre* (400 mg/kg) previamente à indução da hiperlipidemia. Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão médio de 4-6 animais. Co: controle; Hyp: animais hiperlipidêmicos; Hyp+Gs: animais tratados submetidos à hiperlipidemia. A: glicemia de jejum; B: níveis de insulina; C: HOMA-IR; D: HOMA- β ; D: Perfil glicêmico após sobrecarga oral de glicose; E: Área sob a curva do perfil glicêmico obtido após sobrecarga de piruvato (PTT). * e #: Diferença estatística em relação ao grupo controle e hiperlipidêmico respectivamente de acordo com ANOVA One-Way, teste post-hoc Tukey (Programa Prisma 8.0), ($p < 0,05$).

3.5 Efeitos do extrato de *G. sylvestre* sobre o estado oxidativo no fígado e no sangue de animais hiperlipidêmicos

Considerando que a alteração no metabolismo está diretamente ligada à modificação do estado oxidativo, alguns marcadores relacionados ao último foram avaliados tanto no plasma quanto no fígado. Resultados estão ilustrados na Figura 3. A hiperlipidemia aumentou o conteúdo do grupo carbonila da proteína em 90% e 86% quando comparado ao controle no fígado (Fig.3A) e no plasma (Fig. 3E), respectivamente. O extrato, por sua vez, impediu integralmente essa elevação no plasma, mas no fígado reduziu parcialmente este marcador em 27% em relação à condição hiperlipidêmica. Da mesma forma, a hiperlipidemia aumentou os níveis de TBARS em 80% no fígado, mas o extrato nesse caso não foi capaz de impedir essa elevação (Fig. 3B). O sistema antioxidante enzimático, ou seja, as atividades da catalase e da superóxido dismutase, foram prejudicadas pela hiperlipidemia, cujas atividades foram reduzidas em 26% e 35% em relação ao controle respectivamente. *G. sylvestre* impediu a queda atividade da catalase mantendo a níveis semelhantes aos do controle. Já, com relação a atividade da SOD o extrato impediu parcialmente a queda, mantendo o a níveis pouco abaixo do controle. A redução do conteúdo do grupo sulfidril no plasma não foi alterada pela hiperlipidemia, no entanto, o extrato o elevou ligeiramente o mesmo em comparação aos grupos controle e hiperlipidêmico (Fig. 3F).

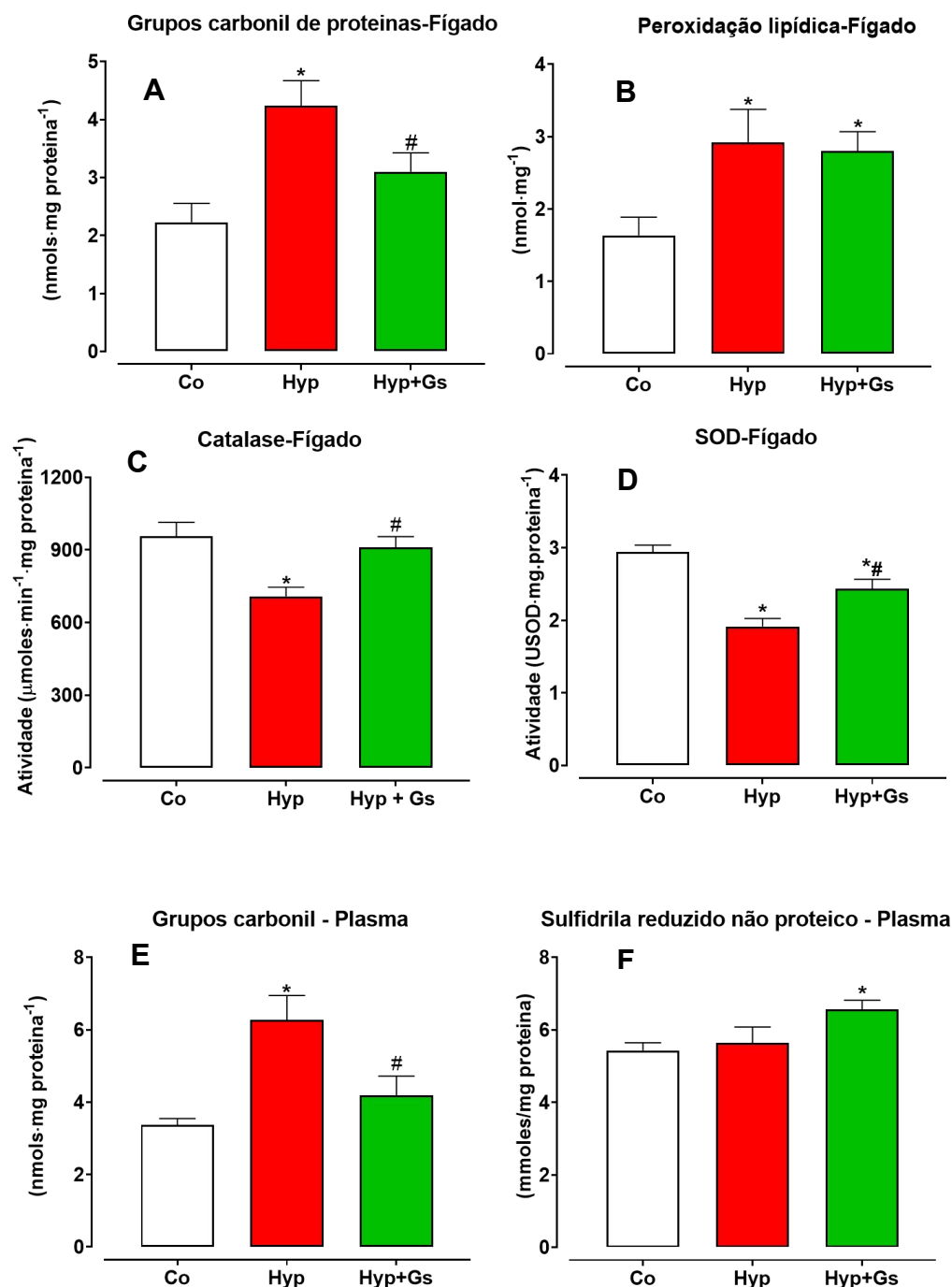


Figura 3. Efeito do extrato de *Gymnema sylvestre* sobre o estresse oxidativo no fígado (A-D) e plasma (E e F) de animais hiperlipidêmicos. A hiperlipidemia foi induzida pela administração de tilioxapol (400 mg/kg) conforme descrito na seção de material e métodos. O tratamento foi realizado durante três dias com *G. sylvestre* 400 mg/kg previamente à indução da hiperlipidemia. Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão médio de 4-6 animais. Co: controle; Hyp: animais hiperlipidêmicos; Hyp+Gs: animais tratados submetidos à hiperlipidemia. * e #:

3.6 Screening virtual

As propriedades farmacocinética e de similaridade de drogas dos bioativos encontrados no extrato de *G. sylvestre* foram utilizadas por meio de uma abordagem de farmacoinformática *in silico* para avaliar o potencial de cada molécula em contribuir para o efeito sistêmico. A ferramenta online SwissADME oferece acesso gratuito a um conjunto de modelos preditivos

rápidos, porém robustos, para determinação das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, similaridade de drogas e compatibilidade com a química medicinal. Estes parâmetros são investigados antes do processo de descoberta do medicamento, quando os compostos em consideração são numerosos, mas o acesso as amostras físicas é limitado.

Uma biblioteca virtual foi construída considerando que ligações glicosídicas presentes nos diversos fitoquímicos do extrato apresentam alta probabilidade de serem clivadas no ambiente gastrointestinal. Portanto, as análises no swissADME foram realizadas basicamente com agliconas, a saber: gimnemagenina, quercetina, kaempferol e ácido protocatecuico. Os resultados estão apresentados na tabela 3. Os gimnemosídeos foram excluídos desta tabela (resultados na Tabela S1, em material suplementar) por apresentarem baixa probabilidade de absorção gastrointestinal e baixa biodisponibilidade. Uma das razões relacionadas é o elevado peso molecular destas moléculas. O valor de consenso computado do LogP (uma medida da lipofilicidade de um composto, indicando sua distribuição entre um solvente não polar, como octanol e água), para os compostos selecionados variou de 0,66 a 3,20, na seguinte ordem crescente: ácido protocatecuico, quercetina, kaempferol e gimnemagenina. Por outro lado, o Log S, um parâmetro que mede a solubilidade de uma molécula em água, apresentou valores crescentes na seguinte ordem: gimnemagenina < kaempferol < quercetina < ácido protocatecuico. Parte destes resultados também podem ser observados pelo modelo do ovo cozido (boiled-egg) (Figura S1), que prevê a absorção gastrointestinal humana passiva (HIA) e a permeação da barreira hematoencefálica (BHE) de fitoquímicos presentes no extrato. Esses parâmetros foram estimados em função da posição das moléculas no referencial wLOGP versus TPSA, que são outros parâmetros obtidos nesta plataforma *in silico*, os quais representam, respectivamente, a lipofilicidade e a superfície polar topológica das moléculas analisadas. Na figura S1, a região branca representa alta probabilidade de absorção passiva pelo trato gastrointestinal, e a região amarela (gema) representa alta probabilidade de absorção pela barreira hematoencefálica. As áreas amarela e branca não são mutuamente exclusivas. Além disso, os pontos coloridos em azul descrevem moléculas que são reconhecidas pela glicoproteína de efluxo P-gp (PGP+), e em vermelho são moléculas que não são substrato da P-gp (PGP-). A gimnemagenina demonstrou potencial para ser um substrato da P-gp e não atuar como inibidor contra nenhuma das isoformas do CYP testadas. Por outro lado, kaempferol, quercetina e ácido protocatecuico não são substratos da P-gp, mas os dois primeiros foram classificados como potenciais inibidores das isoformas CYP1A2, CYP2D6 e CYP3A4. Com exceção da gimnemagenina, que apresentou duas violações dos filtros de similaridade a fármacos, segundo as regras de Lipinski, outras moléculas não apresentaram. Essas moléculas apresentaram uma variação de biodisponibilidade de 0,17 até 0,56.

A partir dessa análise, foi possível compreender que os gimnemosídeos a e b apresentaram baixa probabilidade de absorção gastrointestinal e baixa biodisponibilidade, portanto foram excluídos dos estudos *in silico* a seguir.

Tabela 3: Parâmetros farmacocinéticos e de similaridade drogas previstos pela programa SwissADME dos fitoquímicos identificados no extrato de *G. sylvestre* através do UPLC-MS.

	Gimnemagenina	Kaempferol	Quercetina	Ácido protocatecuico
TPSA	121,38	111,13	131,36	77,76
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	3,20	1,70	1,63	0,66
Log S (ESOL)	-5,35	-3,31	-3,16	-1,86
absorção GI	Alto	Alto	Alto	Alto
BBB permeante	Não	Não	Não	Não
Substrato P-gp	Sim	Não	Não	Não
Inibidor do CYP1A2	Não	Sim	Sim	Não
Inibidor do CYP2C19	Não	Não	Não	Não
Inibidor do CYP2D6	Não	Sim	Sim	Não
Inibidor do CYP2C9	Não	Não	Não	Não
Inibidor do CYP3A4	Não	Sim	Sim	Não
Lipinski	Não; 2 violações: MW>500, NH ₂ OH>5	Sim; 0 violações	Sim; 0 violações	Sim; 0 violações
Pontuação de biodisponibilidade	0,17	0,55	0,55	0,56

Absorção GI - Absorção gastrointestinal; permeante da BBB - permeação da barreira hematoencefálica

3.7 Docking Molecular

Após a avaliação farmacocinética e de similaridade com drogas, gimnemagenina, kaempferol, quercetina e ácido protocatecuico foram selecionadas e utilizados para o estudo de docking molecular. Este é um método de simulação teórica que investiga as interações e prevê as ligações e afinidades entre receptores e ligantes. Simulações de redocking foram utilizadas para avaliar o desempenho de diferentes programas e protocolos de docking. Essa abordagem envolve o acoplamento de um ligante já presente em uma estrutura cristalográfica ou modelada. Neste estudo, o redocking foi realizado quatro vezes para cada programa, e os resultados estão resumidos na Tabela S2 cujos RMSD foram inferiores a 2 angstroms. Entre os três programas testados, o Autodock Vina e o GOLD acoplaram com sucesso o PEM (bezafibrato) e o P1B (pioglitazona) no sítio de ligação do PPAR α e PPAR γ respectivamente, conforme confirmado pela análise gráfica de Ramachandran. O redocking bem-sucedido indica que o protocolo adotado é confiável e, portanto, pode ser aplicado à triagem de ligantes desconhecidos provenientes de bibliotecas virtuais. Assim, os protocolos de docking foram empregados para

rastrear potenciais moléculas presentes no extrato de *Gymnema sylvestre*, utilizando uma biblioteca virtual composta por moléculas com maior probabilidade de apresentar biodisponibilidade sistêmica, conforme predito pelo programa SwissADME, especificamente aquelas com alta probabilidade de absorção intestinal passiva. As moléculas selecionadas para o estudo incluíram gimnemagenina, kaempferol, quercetina e ácido protocatecuico.

Para identificar os compostos mais promissores, foram consideradas tanto as pontuações de docking quanto a reprodutibilidade entre as repetições. Uma vez que cada programa de docking emprega algoritmos distintos, a consistência dos resultados entre diferentes ferramentas aumenta a robustez e a confiabilidade das predições. Assim, as pontuações médias obtidas por cada programa foram utilizadas para o cálculo da pontuação relativa média (MRS), conforme expressa na Equação (2). Os principais resultados da triagem virtual, juntamente com as estruturas moleculares da gimnemagenina, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Pontuação média relativa do docking molecular dos principais compostos identificados no extrato de *G. sylvestre* ou gerados após sua hidrólise no intestino. O ligante cristalográfico de referência bezafibrato (PEM) e pioglitazona (PIB) foram utilizados como referências para PPAR α e PPAR γ (*Homo sapiens*), respectivamente.

PPARα			
Molécula	SCORE AUTODOCK VINA (kcal/mol)	SCORE GOLD (kcal/mol)	MRS
PEM	-9,00	83,61	1,000 $\pm$ 0,001 ^a
Gimnemagenina	-6,02	42,43	0,588 $\pm$ 0,034 ^b
Quercetina	-7,50	63,01	0,876 $\pm$ 0,049 ^c
Kaempferol	-7,00	63,39	0,845 $\pm$ 0,029 ^c
Ácido protocatecuico	-5,80	51,24	0,693 $\pm$ 0,025 ^b
PPARγ			
PIB	-9,02	93,54	1,000 $\pm$ 0,001 ^a
Gimnemagenina	-1,17	57,23	0,378 $\pm$ 0,014 ^b
Quercetina	-6,56	71,15	0,744 $\pm$ 0,039 ^c
Kaempferol	-6,90	70,87	0,768 $\pm$ 0,029 ^c
Ácido protocatecuico	-4,70	47,51	0,514 $\pm$ 0,045 ^d

* letras diferentes indicam significância estatística de acordo com Oneway – ANOVA pos-hoc teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Ambos os compostos de referência exibiram MRS de 1, revelando também a validação do docking molecular para PPAR α e PPAR γ em diferentes programas. Por outro lado, moléculas selecionadas do extrato exibiram uma pontuação média relativa (MRS) menor quando comparadas ao fármaco de referência. Os compostos podem ser agrupados em dois grupos quando analisada a interação com PPAR α , ou seja, compostos que exibiram maior afinidade para o receptor, com MRS em torno de 0,85, especificamente, quercetina e kaempferol, e compostos de menor afinidade para PPAR α , que exibiram uma MRS média de

0,64, ou seja, ácido protocatecuico e gymnemagenina. Já a probabilidade dessas moléculas interagirem com o receptor PPAR γ em ordem decrescente de MRS foi kaempferol, seguida por quercetina, ácido protocatecuico e gymnemagenina.

A Fig. 4 representa os tipos de interações moleculares entre a gymnemagenina e os receptores PPAR α e PPAR γ em estruturas bidimensionais (2D). Os resultados de docking molecular revelaram que o bezafibrato, fármaco de referência para o PPAR α , formou quatro ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Thr279, Tyr314 e Tyr464. Em contraste, a gymnemagenina estabeleceu uma ligação de hidrogênio com um resíduo de leucina e apresentou interações hidrofóbicas extensas, especialmente com Cys275 e Val281.

Os resultados de docking molecular para o receptor PPAR γ mostraram que o fármaco de referência P1B exibiu quatro sítios de ligação hidrofóbicos com receptor, de modo específico com Ser342, Ile281, Gly284 e Arg288, e quatro ligações de hidrogênio com Arg280, Met257 e Gly258. Por outro lado, a gymnemagenina estabeleceu interações de van der Waals apenas com Gly284, e três ligações de hidrogênio com Gln271, Met252 e Ser342. As representações 3D destas interações moleculares podem ser visualizadas na Fig S2.

Conforme relatado na literatura, o PPAR γ foi identificado como um alvo potencial da gymnemagenina (DasNandy et al., 2022). Com base nessas evidências e também nos resultados de docking, simulações de dinâmica molecular em longo prazo foram realizadas para investigar a estabilidade dessa potencial interação.

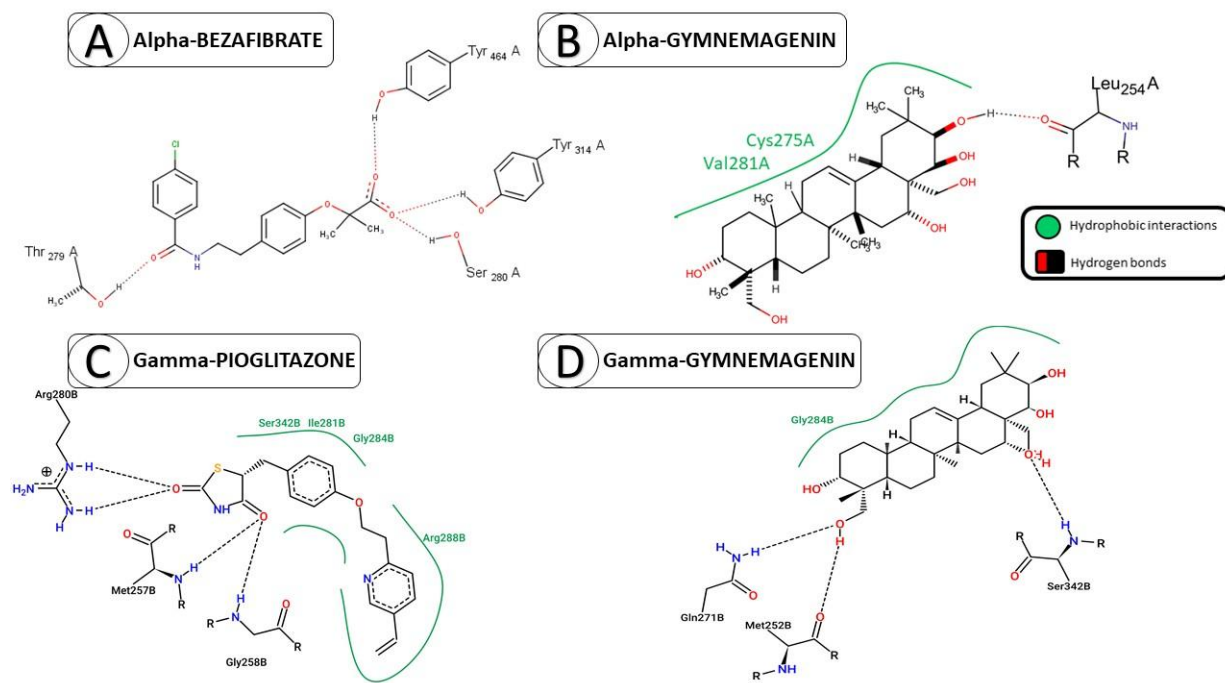


Figura 4: As melhores poses obtidas através do docking molecular do bezafibrato (A) e gymnemagenina (B) com PPAR α e pioglitazona (C) e gymnemagenina (D) com PPAR γ . Diagrama 2d de interações com resíduos de aminoácidos no sítio ativo do receptor, avaliado pelo programa PoseView.

3.8 Dinâmica Molecular (DM) da gimnemagenina

Com base em achados de ancoragem molecular e relatos da literatura que identificam PPAR α e PPAR γ como alvos potenciais da gimnemagenina (DasNandy et al., 2022), simulações de DM de longo prazo (50 ns) foram realizadas para avaliar a estabilidade e características estruturais dessas interações. Os principais parâmetros estruturais analisados incluíram desvio quadrático médio (RMSD), flutuação quadrática média (RMSF) e raio de giro, e os resultados estão exibidos na Fig. 5. A gimnemagenina, apesar de apresentar uma pontuação de docking molecular inferior à pioglitazona, permaneceu no sítio de ligação do PPAR γ ao longo do tempo de simulação. A estabilidade conformacional e estrutural do PPAR γ e seus complexos ligantes foram avaliados usando análise RMSD. A Figura 5A exibe o gráfico RMSD para o complexo pioglitazona-receptor e o complexo gimnemagenina-receptor, indicando que o complexo PPAR γ -gimnemagenina permaneceu estável durante todo o período de simulação. O RMSD foi de $3,95 \pm 0,010$ Å para a gimnemagenina e $4,35 \pm 0,004$ Å para a pioglitazona. RMSF foi utilizado para determinar a flutuação média de cada aminoácido no complexo PPAR γ -ligante (Figura 5B). Este parâmetro apresenta comportamentos semelhantes para pioglitazona e gimnemagenina, o que indica que os resíduos de aminoácidos analisados mostraram comportamentos que não diferiram entre pioglitazona e gimnemagenina, ou seja, a ancoragem de qualquer uma das moléculas não desestabiliza termodinamicamente o sistema nos aminoácidos específicos.

Por fim, no gráfico do raio de giro, que se refere à estabilidade da estrutura da proteína em relação a molécula complexada, ela fornece informações sobre a compactação do complexo. Observa-se uma estabilização mais rápida da estrutura globular na presença da molécula referência em comparação com a gimnemagenina. No entanto, a estrutura também atinge o equilíbrio com a última. Se uma proteína mantém um valor de Rg relativamente estável, isso sugere que a proteína está enovelada de forma estável. Por outro lado, se o valor de Rg flutua ao longo do tempo, isso indica desdobramento.

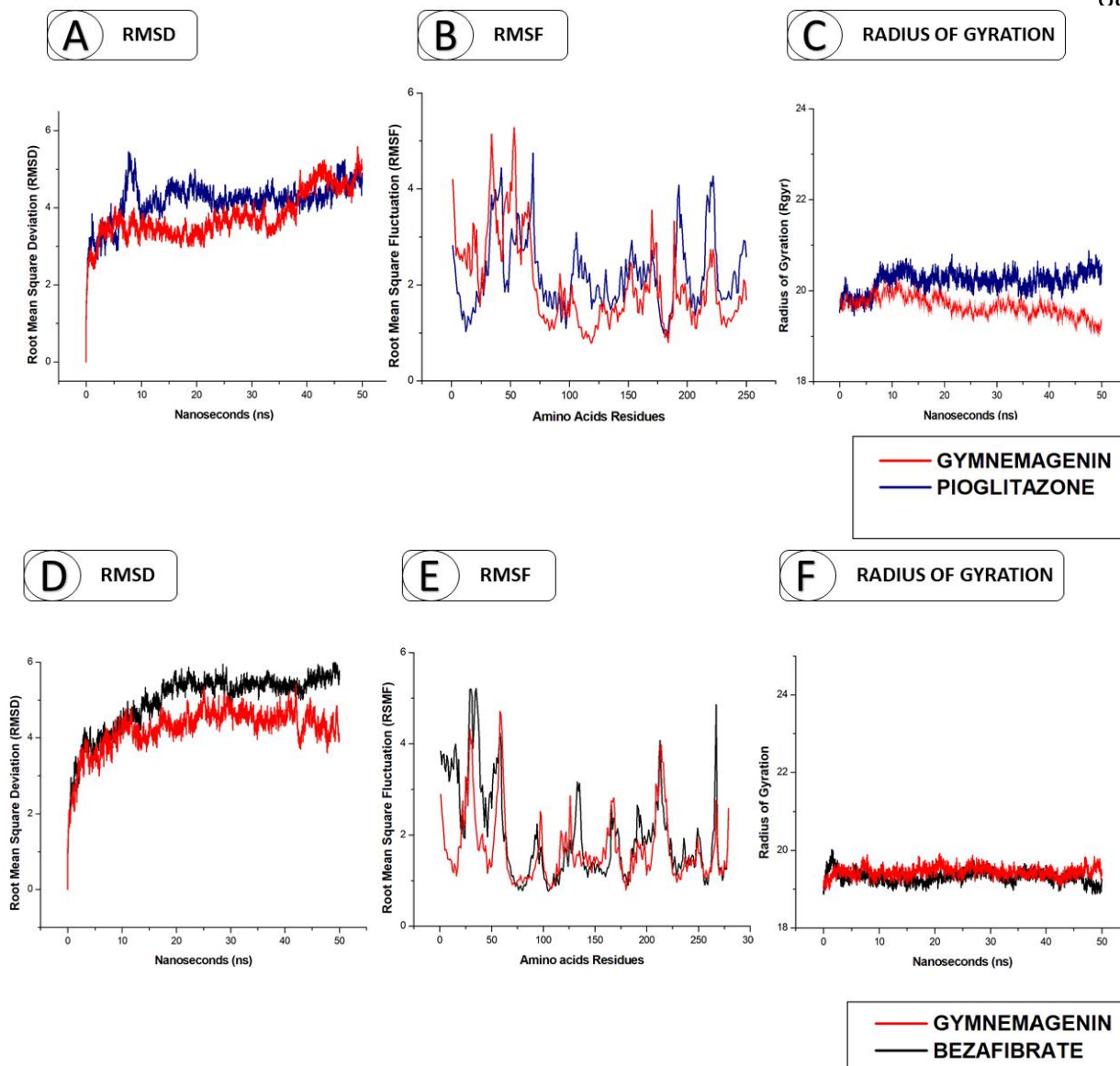


Figura 5. Análise da simulação de dinâmica molecular das interações da gimnemagenina com PPAR γ (A-C) e PPAR α (D-E). A) RMSD (Desvio Quadrático Médio das Raízes), B) RMSF (Flutuação Quadrática Média das Raízes) e C) raio de giro em função do tempo, para os complexos alvo-gimnemagenina e alvo-fármaco de referência.

3.9 Toxicidade aguda

Observações comportamentais dos animais experimentais não revelaram sinais clínicos de toxicidade, morbidade ou mortalidade após a administração de uma dose oral única de 2.000 mg/kg do extrato. Além da avaliação clínica, análises bioquímicas foram realizadas para avaliar a potencial toxicidade hepática, após administração consecutivas de 400 mg/kg do extrato por três dias. Os resultados, apresentados na Tabela 05, indicam que *G. sylvestre* não alterou a atividade dessas enzimas hepáticas em animais hiperlipidêmicos, sugerindo a ausência de efeitos hepatotóxicos nessa condição.

Tabela 5: Efeito de *G. sylvestre* sobre a atividade das aminotransferases hepáticas em animais hiperlipidêmicos

Enzima	Grupos		
	Controle	Hiperlipidêmico	Hy+ <i>G.sylvestre</i>
ALT (U/dL)	13,69 ± 1,80	14,68 ± 1,43	12,70 ± 1,52
AST (U/dL)	20,49 ± 1,91	23,61 ± 2,03	24,60 ± 2,51

A atividade foi medida espectrofotometricamente conforme descrito na seção Material e Métodos.

4 DISCUSSÃO

O extrato de *Gymnema sylvestre*, rico em ácidos gimnêmicos, demonstrou eficácia notável em mitigar as alterações sistêmicas do metabolismo de carboidratos e lipídios, bem como o estresse oxidativo tecidual induzidos por um quadro agudo de hiperlipidemia. Quando administrado em um regime de tratamento de curto prazo em modelos animais, o extrato foi capaz de impedir hiperlipidemia, resistência à insulina e bem como o aumento do estresse oxidativo, evidenciando seu potencial terapêutico multifuncional. Esses achados reforçam o valor farmacológico dessa planta tradicionalmente utilizada na medicina ayurvédica e sugerem novos caminhos para intervenções metabólicas e mesmo prevenção de hiperlipidemia baseadas em produtos naturais.

O extrato de *Gymnema sylvestre* 75 foi quimicamente caracterizado quanto às suas atividades antioxidantes e demonstrou uma capacidade significativa de eliminação de radicais livres em ensaios *in vitro*, especialmente nos testes com ABTS e DPPH. Notavelmente, apresentou maior eficácia no ensaio ABTS, com um valor de IC₅₀ aproximadamente 2,6 vezes menor em comparação ao DPPH, indicando um potencial mais elevado na doação de elétrons ao cátion radical ABTS^{•+}. Essa diferença de desempenho entre os ensaios evidencia a diversidade de mecanismos antioxidantes envolvidos, uma vez que o teste DPPH mede predominantemente a capacidade de doação de átomos de hidrogênio, enquanto o ABTS avalia a doação de elétrons. Adicionalmente, o extrato exibiu uma atividade redutora expressiva no ensaio FRAP, reforçando seu potencial como agente antioxidante multifuncional. As propriedades antioxidantes dos extratos vegetais são amplamente atribuídas à presença de compostos fenólicos e flavonoides, reconhecidos por sua potente capacidade de neutralização de radicais livres. A eficácia antioxidante dessas moléculas está diretamente relacionada ao número e à disposição dos grupos (–OH) fenólicos em suas estruturas químicas, os quais influenciam sua reatividade frente às espécies reativas de oxigênio. Esses compostos desempenham um papel crucial na estabilização e inativação de radicais livres, atenuando, assim, os danos oxidativos a biomoléculas e estruturas celulares, como os observados em estados de hiperlipidemia (Ramos et al., 2021; Zeb, 2020).

O perfil fenólico do extrato de *G. sylvestre* revelou várias moléculas antioxidantes, como os derivados do ácido protocatecuico, de kaempferol, de quercetina e dos gimnenosídeos, o que corrobora a capacidade antioxidante significativa do extrato. Os derivados glicosilados do kaempferol e da quercetina e o ácido protocatecuico apresentam uma atividade antioxidante bem documentada através de múltiplos mecanismos de ação, tal como amplamente descrito na literatura (Kerna et al., 2024). Estudos recentes destacam a significativa propriedade antioxidante da gymnemagenina e dos ácidos gymnêmicos em modelos *in vitro* e *in vivo* (Ibrahim et al., 2020; Sarkar et al., 2009; Ditchou et al., 2024). O ácido gymnêmico neutraliza eficazmente espécies reativas de oxigênio (ERO), como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, exibindo um efeito dependente de concentração. A gymnemagenina, uma aglicona do ácido gymnêmico, também demonstra atividade antioxidante dependente da concentração, com valores de IC₅₀ de 74,8 µg/mL e 83,8 µg/mL em ensaios DPPH e ABTS, respectivamente (Keerthika e Hya, 2021). Embora não seja possível atribuir o efeito antioxidante do extrato unicamente aos compostos gimnosídeos, é muito provável que estas moléculas apresentem uma parte significativa desse efeito, uma vez que este extrato é uma preparação concentrada de ácido gymnêmico, com um teor de 78,3 %, de acordo com a bula do fornecedor. É importante mencionar que não é possível excluir a possibilidade de uma ação sinérgica de vários fitoquímicos presentes no extrato. Isto foi apoiado por Ditchou et al. (2024), que relataram que a atividade de eliminação de radicais do extrato de *G. sylvestre* (IC₅₀ = 48,34 µg/mL) foi significativamente mais elevada do que a de alguns compostos isolados, que apresentaram graus variados de eficácia (IC₅₀ = 98,30 a 286,13 µg/mL).

A estimativa quantitativa do extrato em termos de ácido gymnêmico é essencial para a padronização e controle de qualidade do extrato de *G. sylvestre*. Embora os resultados do presente trabalho não tenham quantificado o teor de gymnemagenina e de ácidos gymnêmicos, considerando o laudo técnico da preparação comercial, a mesma contém 78,3 % de ácidos gymnêmicos. Ou seja, estas moléculas específicas se encontram em quantidade significativa no extrato e, por conseguinte, é muito provável que o teor de fenólicos totais seja superior ao quantificado por LC-MS/MS.

Os ácidos gymnêmicos possuem estrutura química complexa e elevado peso molecular, o que sugere baixa probabilidade de absorção intestinal na forma intacta, conforme indicado pelas predições do modelo computacional SwissADME. De fato, estes fenólicos podem ser hidrolisados pela microbiota intestinal e por enzimas intestinais, gerando o núcleo de aglicona que pode ser absorvido pelas células intestinais. Vale a pena mencionar que a gymnemagenina, o produto hidrolisado dos ácidos gymnêmicos, é utilizada como biomarcador para estudos farmacocinéticos após a administração oral de extrato de *G. sylvestre* (Kamble et al., 2013).

Isto pode ser corroborado com os resultados da biodisponibilidade do estudo *in silico*, uma vez que todas estas agliconas apresentaram uma elevada probabilidade de serem absorvidas de forma passiva pelo trato gastrointestinal humanas e poderiam contribuir para o efeito sistêmico do extrato (Marrelli et al., 2018; Lunagariya et al., 2014). Além disso, nenhum dos compostos apresentou capacidade de permear a barreira hematoencefálica, reduzindo a probabilidade de efeitos colaterais no sistema nervoso central. De acordo com estudos farmacocinéticos, os níveis plasmáticos de gimnemagenina atingiram uma concentração máxima (C_{max}) de $291 \pm 18,2$ ng/mL entre 2 a 4 horas após a administração oral do extrato de *Gymnema sylvestre* na dose de 400 mg/kg em ratos, com uma meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) estimada em $8,8 \pm 1,15$ horas (Kamble et al., 2013). O perfil de concentração plasmática em função do tempo apresentou picos duplos, os quais podem estar associados a mecanismos como recirculação entero-hepática, absorção diferencial ao longo do trato gastrointestinal, formação de depósitos na parede intestinal e/ou variações na motilidade gastrointestinal (Kamble et al., 2013). Aliado a isso, gimnemagenina é substrato da P-gp e não inibe as principais enzimas do citocromo P450, sugerindo que a molécula não apresenta interações medicamentosas significativas. A análise integrada dos parâmetros farmacocinéticos avaliados permite inferir que a gimnemagenina apresenta biodisponibilidade significativa e potencial para aplicação como fármaco ou nutracêutico de uso oral, apesar de violar dois dos cinco critérios da Regra de Lipinski. Cabe destacar que a ferramenta SwissADME possibilita a predição do potencial de uma molécula como candidato a fármaco oral, com base em suas propriedades físico-químicas (Daiana et al., 2017). Nesse contexto, a biodisponibilidade observada, mesmo diante das violações mencionadas, sugere que outros fatores, como mecanismos de transporte ativo, biotransformações metabólicas ou estratégias específicas de formulação, podem compensar as limitações estruturais da molécula e favorecer sua absorção e eficácia sistêmica.

A hiperlipidemia induzida pelo tiloxapol é um modelo amplamente utilizado para o rastreamento de fármacos hipolipidêmicos (Harnafi et al., 2007) e tem sido associada ao aumento da síntese lipídica e à diminuição da depuração lipídica do sangue para os tecidos através da inibição da lipoproteína lipase (Ramos et al., 2021). Estas ações resultam em níveis elevados de colesterol e triglicerídeos no sangue, seguidos de um aumento da secreção de VLDL pelo fígado, conforme publicado anteriormente (Khlifi et al., 2019). Este distúrbio no perfil lipídico é amplamente reconhecido como um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Para além das medições tradicionais dos lipídios, indicadores clínicos como a razão triglicerídeos/colesterol-HDL (TG/HDL) e o conteúdo de colesterol não-HDL surgiram como preditores confiáveis do risco aterogênico. A razão TG/HDL, em particular, reflete também resistência à insulina (da Luz et al., 2008; McLaughlin et al., 2003). Do mesmo modo,

o colesterol não-HDL, que engloba todas as lipoproteínas aterogênicas (ou seja, LDL, VLDL, IDL, restos de quilomícrons), fornece uma avaliação mais abrangente do risco cardiovascular, especialmente em estados hipertrigliceridêmicos (Liu et al., 2006; Robinson et al., 2013). Ou seja, estes marcadores constituem ferramentas valiosas para avaliar o impacto cardiometabólico das intervenções terapêuticas em estudos pré-clínicos e clínicos.

Os nossos resultados revelaram que a *G. sylvestre* reduziu o aumento do colesterol total e dos triglicerídeos e, conseqüentemente, reduziu o risco de perturbações metabólicas e de problemas cardiovasculares, tal como observado pela redução da relação TG/HDL e dos níveis de colesterol não-HDL. Foram também observados efeitos semelhantes em ratos hiperglicêmicos induzidos por aloxano e estreptozotocina e em adultos suplementados com extrato de *G. sylvestre* (Zamani et al., 2022; Muzafar et al., 2023). Este efeito hipolipidêmico da *G. sylvestre* pode ser atribuído ao seu rico conteúdo em ácidos ginnêmicos, saponinas e flavonóides, que são conhecidos por modular o metabolismo lipídico inibindo a absorção de lípidos e melhorando a sua utilização periférica (Shanmugasundaram et al., 1990; Baskaran et al., 1990; Kaur et al., 2011).

Um dos mecanismos de ação de *G. sylvestre* pode envolver a modulação de receptores nucleares, como o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama e alfa (PPAR γ e PPAR α), conforme já relatado anteriormente (Yin et al., 2012; Kaur et al., 2011). O PPAR γ é um regulador chave da homeostase dos lípidos e da glicose, influenciando a adipogênese, a sensibilidade à insulina e as respostas inflamatórias (Gholami et al., 2020). É predominantemente expresso no tecido adiposo, onde regula a transcrição de genes lipogênicos, como a lipoproteína lipase (LPL), proteínas de ligação a ácidos graxos (FABPs) e adiponectina. O PPAR α desempenha um papel central na regulação dos genes envolvidos na absorção, transporte e β -oxidação de ácidos gordos no fígado e no músculo esquelético (Keter, 2012). Alguns fitoconstituintes presentes em *G. sylvestre*, como a ginnemagenina e os flavonóides, mostraram potencial para ativar ou modular as vias de sinalização PPAR γ e PPAR α , contribuindo assim para a melhora dos perfis lipídicos e da sensibilidade à insulina.

Embora seja difícil definir exatamente os compostos que podem ser responsáveis pelos efeitos hipolipemiantes num alvo específico, o estudo bioinformático permite-nos, pelo menos, inferir as possíveis moléculas responsáveis. De fato, ginnemagenina, kampferol, quercetina e o ácido protocatecuico apresentam capacidade de interação com os receptores PPAR α e PPAR γ , tal como observado por acoplamento molecular. O acoplamento molecular é um método de simulação teórica para estudar as interações receptor-molécula e prever os seus modos de ligação e afinidades. No entanto, é importante ter cautela com os resultados baseados apenas no docking molecular, uma vez que nem sempre estes resultados revelam uma interação

significativa com o alvo que reflete o efeito *in vivo*. Nesse caso, a pioglitazona apresentou maior intensidade de interação com o PPAR γ quando comparada à gimnemagenina. No entanto, simulações de dinâmica molecular (MD) fornecem um comportamento dinâmico e uma complexidade estrutural do complexo PPAR γ -gimnemagenina semelhante ao fármaco de referência. De um modo geral, as propriedades físicas, químicas e farmacocinética, juntamente com análises de interação e simulações de dinâmica molecular (MD), sugerem que a gimnemagenina apresenta um comportamento dinâmico estável, interações específicas e uma acomodação adequada no sítio de ligação dos receptores PPAR γ e PPAR α . Estes resultados apoiam a conclusão de que a interação entre a gymnemagenina e o PPAR α e o PPAR γ são significativas e pode representar um dos mecanismos-chave subjacentes aos efeitos hipolipemiantes da *G. sylvestre*.

É amplamente reconhecido que os efeitos sistêmicos de extratos vegetais podem resultar da atuação conjunta de múltiplos mecanismos de ação. No presente estudo, o efeito hipolipemiante pode também estar relacionados, em parte, à inibição da atividade da lipase e ao bloqueio do transporte de ácidos graxos pelo células intestinais, como publicado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa (Santos et al., 2025).

O modelo de hiperlipidemia induzido pelo tiloxapol também modificou o clearance de glicose sanguínea, associado à resistência à insulina (RI), corroborando publicações anteriores (Souza et al., 2017; Husseny et al., 2017). A resistência à insulina foi suportada pelo teste de tolerância oral à glicose, teste de tolerância oral ao piruvato e índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance). Este último é uma medida reconhecida para o diagnóstico de resistência à insulina em humanos, principalmente crianças e adolescentes, particularmente aqueles com obesidade (Pulla & Fuentesmayor 2021). Outro marcador que sugere resistência periférica à insulina em roedores e também em humanos é a razão triglicerídeo/HDL e o índice TyG (em material suplementar Fig S3), que alguns autores concordam ser um indicador mais aplicável na clínica do que o HOMA-IR (Guerrero-Romero et al., 2010). A resistência à insulina é um fator chave para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, esteatose hepática (NAFLD) e outras alterações metabólicas em animais hiperlipidêmicos (Shimada et al., 2007). A sinalização ineficaz da insulina observada na hiperlipidemia limita a capacidade do fígado e de outros tecidos de manter a homeostase metabólica resultando em hiperglicemia e contribui ainda mais para o aumento dos lípidos plasmáticos (Titchenell et al., 2017).

Por outro lado, o extrato de *G. sylvestre* normalizou o perfil glicêmico, como observado pelos níveis de glicose em jejum, tolerância à glicose, e impediu as alterações da gliconeogênese hepática induzida pela hiperlipidemia. Além disso, o extrato melhorou a

resistência à insulina e reverteu a capacidade de secreção de insulina das células β pancreáticas, como evidenciado pela modulação dos índices HOMA-IR e HOMA- β . Estas alterações contribuíram para o controle notável de triglicerídeos e de glicose elevados em ratos hiperlipidêmicos tratados com *G. sylvestre*. Apesar de não se ter observado um aumento efetivo dos níveis de insulina, o índice HOMA- β revela um aumento da capacidade de secreção das células β pancreáticas. Publicações anteriores relacionaram o aumento dos níveis de insulina pelo extrato, porém, realizaram o diferentes tempos de tratamento e diferentes doses de extrato em relação ao utilizado no presente trabalho (Muzafar et al., 2023).

A insulina atua como uma molécula de sinalização que suprime a atividade da lipase sensível ao hormônio no tecido adiposo e aumenta a atividade da lipase lipoproteica responsável pela hidrólise do excesso de triglicerídeo ligado à lipoproteína em ácidos graxos (Mbaka et al., 2017). É reconhecido que o extrato melhorou a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (especialmente no músculo esquelético e no tecido adiposo), promovendo a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática e aumentando a captação de glicose. O efeito hipoglicêmico de *G. sylvestre* pode também resultar da regulação positiva de p-Akt e GLUT2/4 no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo de camundongos db/db (Li et al., 2019). O aumento da expressão de GLUT nos tecidos também pode ser resultado da ativação de PPAR γ . De fato a ativação do PPAR γ aumenta a sensibilidade das células β pancreáticas pela glicose e melhora a sensibilidade à insulina nos tecidos tornando-o um alvo terapêutico promissor para o controle da glicemia. Esses mecanismos de ação já foram comprovados em estudo *in vitro*, no qual a gimnemagenina melhorou o metabolismo dos triglicerídeos em adipócitos 3T3L1 ao regular positivamente a expressão de genes da lipase, regulando positivamente a expressão do gene PPAR γ que estão associados à adipogênese e à resistência à insulina (DasNandy et al., 2022). Essa ação corrobora também ao observada em camundongos db/db, uma vez que o ácido gimnêmico induziu a oxidação de ácidos graxos e aliviou a inflamação e a resistência à insulina no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo por meio das vias de sinalização mediadas por PPAR δ e NF κ B (Li et al., 2019; Puttanarasaiah et al., 2016).

Desse modo, o potencial anti-hiperlipidêmico multifacetado da *G. sylvestre* na abordagem da hiperlipidemia e da hiperglicemia revela mecanismos pleiotrópicos do extrato. Análises extensivas dos complexos PPAR γ e PPAR α -gymnemagenin sugerem uma estabilidade conformacional notável, apoiando a sua relevância terapêutica. No entanto, para validar estes resultados, são necessários estudos experimentais que envolvam ensaios de ligação direta entre proteínas-alvo purificada e moléculas inibidoras do extrato para avançar no desenvolvimento de do extrato como um produtos farmacêuticos ou ao menos nutracêutico para o tratamento da

hiperlipidemia e da hiperglicemia.

A hipertrigliceridemia, a hipercolesterolemia e a hiperglicemia observadas neste modelo animal estão associadas a modificações oxidativas no fígado e no plasma dos animais, como observado pelo aumento dos marcadores hepáticos de lesão oxidativa (níveis de carbonilação proteica e lipoperoxidação), acompanhados por uma deterioração dos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (grupos sulfidrílo reduzidos e atividade da CAT e SOD) corroborando os resultados de Ramos et al., (2021). O extrato, por sua vez, demonstrou eficácia na inibição dos marcadores de lesão oxidativa no sangue do fígado, pois impediu lesão oxidativa e o comprometimento dos sistemas antioxidantes em animais hiperlipidêmicos, de forma específica as enzimas SOD e CAT. Além disso, melhorou o conteúdo de grupos tiol que ocorrem em níveis elevados no sangue para proteger o organismo contra o estresse oxidativo induzido pela hiperlipidemia (Bracht et al., 2016). Nossas descobertas ressaltam a importância dos antioxidantes no alívio de lesão oxidativa e sugerem que *G. sylvestre* tem propriedades antioxidantes diretas significativas, conforme demonstrado por seus baixos valores de IC₅₀ nos ensaios DPPH e ABTS (como discutido anteriormente), como indiretas como evidenciado pelo aumento das atividades enzimáticas antioxidantes endógenas. Isto pode ser justificado com base na capacidade da *G. sylvestre* de aumentar a expressão do fator nuclear relacionado com o fator eritroide 2 (Nrf2), que regula a expressão do sistema antioxidante e ajuda a restaurar a homeostase redox (Muzaffar et al., 2023). O aumento da atividade da SOD e da CAT e do teor de tióis, juntamente com a redução dos grupos carbonila, revela que a *G. sylvestre* pode melhorar as defesas antioxidantes do organismo, oferecendo um potencial via terapêutica para a hiperlipidemia associada ao estresse oxidativo.

A administração oral do extrato de *Gymnema sylvestre* demonstrou um perfil favorável de segurança e boa tolerabilidade em ratos, conforme evidenciado pelos níveis séricos das enzimas AST e ALT, que permaneceram dentro dos limites fisiológicos. Esses resultados indicam que o extrato, na dose administrada, não induziu hepatotoxicidade, reforçando sua segurança para uso experimental. Estudos conduzidos por Raji et al., (2023) sugeriu que o extrato bruto, o n-hexano e as frações de acetato de etila da *G. sylvestre* apresentavam um elevado grau de segurança com DL₅₀ superior a 5 kg/BW. Assim, pode ser classificado como extrato não tóxico (Classe 5) de acordo com a diretriz da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCED) sobre testes de toxicidade oral aguda com base no LD₅₀. Estes resultados apoiam a sua adequação para outras aplicações farmacológicas, embora, como sempre, o contexto clínico humano e a normalização adequada sejam essenciais.

Uma questão relevante que pode ser formulada é com relação a doses do extrato que são necessárias nos seres humanos para reduzir significativamente os lípidos e a glicose no sangue.

Uma dose de 400 mg/kg parece demasiadamente excessiva, considerando que para um indivíduo de 75 kg corresponderia a uma dose total de 30 g. No entanto, a estipulação baseou-se nas doses determinadas em animais. Para os seres humanos, seria talvez mais adequado aplicar uma fórmula de transladação entre espécies, considerando principalmente área da superfícies corporal de cada espécie (Reagan-Shaw et al., 2007). Se isto for feito para a dose de 400 mg/kg ratos, chega-se a uma dose humana de 32 mg/kg, o que representa uma ingestão total de cerca de 2,4 g para um indivíduo de 75 kg. Trata-se de uma dose totalmente possível, que vale efetivamente a pena ser investigada em trabalhos futuros.

5.CONCLUSÃO

O extrato de *G. sylvestre*, reconhecido como um produto natural, demonstrou a sua capacidade de reduzir a hiperlipidemia, a hiperglicemia e, consequentemente, o estresse oxidativo tecidual fortemente associados às alterações metabólicas. Nossos resultados permitem afirmar que estes efeitos resultam de pelo menos quatro mecanismos de ação distintos: inibição da lipase pancreática, inibição do transporte dos ácidos graxos pelas células intestinais, modulação do metabolismo celular através de uma melhor sensibilidade à insulina e da ativação do PPAR γ , como também da melhora do estado oxidativo tecidual. A gimnemagenina, um dos principais fitoconstituintes do extrato de *G. sylvestre*, foi identificada como um composto bioativo essencial responsável pelos seus efeitos hipolipidêmicos e hipoglicêmicos, principalmente devido à interação com o PPAR α e PPAR γ . Dessa forma, o extrato de *G. sylvestre* pode ser considerado uma preparação pleiotrópica segura, com potencial para atuar através de múltiplos mecanismos no controle e no tratamento da hiperlipidemia, e de doenças associadas como obesidade, diabetes e resistência à insulina. Embora este estudo forneça evidências promissoras, estudos de longo prazo são necessários para avaliar de forma abrangente o potencial anti-hiperlipidêmico de *G. sylvestre* e elucidar seus mecanismos de ação de maneira detalhada.

6.Referências

- Abass, S., Zahiruddin, S., Ali, A., Irfan, M., Jan, B., Haq, Q.M.R., Husain, S.A., Ahmad, S., 2022. Development of synergy-based combination of methanolic extract of andrographis paniculata and berberis aristata against e. coli and s. aureus. Curr. Microbiol. 79, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02911-8>.
- Ahamad, J., Amin, S., Naquvi, K. J., Mir, S. R. Gymnemagenin a Promising Drug Candidate for Management of Hyperglycemia: In-Vitro and In-Vivo Study. *Journal of Angiotherapy*, 2023, 7(1), 1. <https://doi.org/10.25163/angiotherapy.719357>.
- Al-Hiari Y, Shattat G, Al-Qirim T, El-Huneidi W, Sheikha GA, Hikmat S. Antihyperlipidemic properties of novel N- (benzoylphenyl)-5-substituted-1H-indole-2-carboxamides in Triton WR-

1339-induced hyperlipidemic rats. *Molecules*. 2011;16(10):8292–304. <https://doi.org/10.3390/molecules16108292>.

Araújo, S. P., Juvanhol, L. L., Bressan, J., & Hermsdorff, H. H. M. Triglyceride glucose index: A new biomarker in predicting cardiovascular risk. *Preventive Medicine Reports*, 2022, 29, 101941. <https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2022.101941>.

Baskaran K, Kizar Ahamath B, Radha Shanmugasundaram K, Shanmugasundaram ER. Antidiabetic effect of a leaf extract from *Gymnema sylvestre* in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Ethnopharmacology*. 1990 Oct;30(3):295-300. PMID: 2259217. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90108-6](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90108-6).

Bergmeyer, H. U. *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie-Academic Press, London, 1974. ISBN: 352725370X, 9783527253708.

Beshir SA, Hussain N, Elnor AA, Said ASA. Umbrella Review on Non-Statin Lipid-Lowering Therapy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2021;26(5):437-452. <https://doi.org/10.1177/10742484211002943>.

Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., Oliveira, M. B. P. P. Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops and Products*, 2016, 89, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.065>.

Bracht, A., Silveira, S. S., Castro-Ghizoni, C. V., Sá-Nakanishi, A. B., Oliveira, M. R., Bersani-Amado, C. A., Peralta, R. M., Comar, J. F. Oxidative changes in the blood and serum albumin differentiate rats with monoarthritis and polyarthritis. *SpringerPlus*, 2016, 5, 36. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1671-1>.

Buege, J. A., Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 1978, 52, 302-310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).

Correa, G., Garcia-Manieri, J. A. A., Dias, M. I., Pereira, C., Mandim, F., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., Peralta, R. M., Bracht, A., 2024. Gastrointestinal digestion of yerba mate, rosemary and green tea extracts and their subsequent colonic fermentation by human, pig or rat inocula. *Food Research Internation* 114918. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114918>.

Daiana, A., Michielin, O., Zoete, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 2017, 7(1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.

Dallakyan, S., Olson, A. J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1263, 243-250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19.

Da Rocha B., Preuss HG, Bagchi D, Bagchi M, Rao CV, Dey DK, Satyanarayana S. Effects of a natural extract of (-)-hydroxycitric acid (HCA-SX) and a combination of HCA-SX plus niacin-bound chromium and *Gymnema sylvestre* extract on weight loss. *Diabetes Obes Metab*. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1462-8902.2004.00328.x>.

Da Luz, Protasio Lemos; FAVARATO, Desidério; FARIA-NETO JR, Jose Rocha; LEMOS, Pedro; CHAGAS, Antonio Carlos Palandri. High ratio of triglycerides to HDL-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics*, São Paulo, v. 63, n. 4, p. 427–432, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S1807-59322008000400003>.

DasNandy, A., Patil, V. S., Hegde, H. V., Harish, D. R., Roy, S. Elucidating type 2 diabetes mellitus risk factor by promoting lipid metabolism with gymnemagenin: An in vitro and in silico approach. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13, 1074342. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1074342>.

Di Fabio, G., Romanucci, V., De Marco, A., Zarrelli, A. Triterpenoids from *Gymnema sylvestre* and their pharmacological activities. *Molecules*, 2014, 19(8), 10956-10972. <https://doi.org/10.3390/molecules190810956>.

Ditchou, Y. O. N., Leutcha, P. B., Miaffo, D., Mamoudou, H., Ali, M. S., À Ngnoung, G. A. A., Soh, D., Agrawal, M., Darbawa, R., Tchouboun, E. Z. N., Lannang, A. M., Noundou, X. S. In vitro and in silico assessment of antidiabetic and antioxidant potencies of secondary metabolites from *Gymnema sylvestre*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2024, 177, 117043. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117043>.

Dong HN, Wang, Zhao L and Lu F, 2012. Berberine in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a systemic review and meta-analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 1:591-654.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1959.

Goldfarb SJ, Rapid increase in hepatic HMG CoA reductase activity and in vivo cholesterol synthesis after Triton WR 1339 injection, *J. Lipid. Res.* 19 (4) (1978) 489–494. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40720-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40720-5).

Gholami, A., Dabbaghmanesh, M.H., Ghasemi, Y., Talezadeh, P., Koohpeyma, F. Montazeri-Najafabady, N., 2020. Probiotics ameliorate pioglitazone-associated bone loss in diabetic rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* <https://doi.org/10.1186/s13098-020-0587-3>.

Gopalakrishnan, G., Sowmiya, S., Sheik, S. S., Sekar, K. Ramachandran plot on the web (2.0). *Protein & Peptide Letters*, 2007, 14(7), 669-671. <https://doi.org/10.2174/092986607781483912>.

Guerrero-Romero F., Luis E. Simental-Mendía, Manuel González-Ortiz, Esperanza Martínez-Abundis, María G. Ramos-Zavala, Sandra O. Hernández-González, Omar Jacques-Camarena, Martha Rodríguez-Morán, O produto de triglicerídeos e glicose, uma medida simples de sensibilidade à insulina. Comparação com o grampo euglicêmico-hiperinsulinêmico, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 95, Edição 7, 1 de julho de 2010, páginas 3347–3351. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0288>.

Harnafi, H., Bouanani, N. H., Aziz, M., Serghini, C. H., Ghalim, N., Amrani, S. The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 109(1), 156-160. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.017>.

Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 1996, 14(1), 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).

Hurtado-Roca, Y., Bueno, H., Fernandez-Ortiz, A., Ordovas, J. M., Ibanez, B., Fuster, V., ... & Laclaustra, M., 2017. Oxidized LDL is associated with metabolic syndrome traits independently of central obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 66(2), 474-482. <https://doi.org/10.2337/db16-0933>.

Husseney, M. W. A., Mamdouh, M., Shaban, S., Abushouk, A. I., Zaki, M. M. M., Ahmed, O. M., Abdel-Daim, M. M. The effect of diabetes on apoptosis in human endothelial cells: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Journal of Diabetes Research*, 2017, Article ID 8095926. <https://doi.org/10.1155/2017/8095926>.

Ibrahim J, Kabiru AY, Abdurashed-Adeleke T, Lawal B, Adewuyi AH. Antioxidant and hepatoprotective potentials of curcuminoid isolates from turmeric (*Curcuma longa*) rhizome on CCl₄-induced hepatic damage in Wistar rats. *J Taibah Unive Sci*. 2020;14(1):908–15. <https://doi.org/10.1080/16583655.2020.1790928>.

Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 267(3), 727-748. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>.

Kamble, B., Gupta, A., Patil, D., Khatal, L., Janrao, S., Moothedath, I., Duraiswamy, B. Determination of gymnemagenin in rat plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to pharmacokinetics after oral administration of *Gymnema sylvestre* extract. *Biomedical Chromatography*, 2013, 27(5), 669-677. <https://doi.org/10.1002/bmc.2845>.

Kaur J, Nafees S, Anwar M, Akhtar J and Anjum N, 2011. *Glycyrrhiza glabra* (Licorice) and *Gymnema sylvestre* (gurmar). In *Herbs, Shrubs, and Trees of Potential Medicinal Benefits*, CRC Press. Pp: 133-150.

Keerthika, R., Raghu, S. Efficacy of *Gymnema sylvestre* as a potent antioxidant: An *in vitro* study. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 2021, 11, 232-238.

Kerna, N. A., Ngwu, D. C., Akuma, O. M., Holets, H. M., Chawla, S., Flores, J. V., Pruitt, K. D., Carsrud, N. D. V., McKee, D., Okpo, N. C., Jomsky, B. M., Azi, C. I. Quercetin: Exploring its unique flavonol properties, bioavailability, safety profile, and therapeutic potential in high-impact medical conditions. *European Journal of Medical and Health Research*, 2024, 2(3), 187. [https://doi.org/10.59324/ejmhr.2024.2\(3\).23](https://doi.org/10.59324/ejmhr.2024.2(3).23).

Keter LK and Mutiso PC, 2012. Mutiso Ethnobotanical studies of medicinal plant used by Traditional Health Practitioners in the management of diabetes in Lower Eastern Province, Kenya. *Journal of Ethno- Pharmacology* 139:74-80.

Khelifi, R., Lahmar, A., Dhaouefi, Z., Kalboussi, Z., Maatouk, M., Kilani-Jaziri, S., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. Assessment of hypolipidemic, anti-inflammatory and antioxidant properties of medicinal plant *Erica multiflora* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemia and liver function repair in rats: A comparison with fenofibrate. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2019, 107, 104404. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104404>.

Kumar, V., Delhi, N., Bhandari, U., Tripathi, C. D., Khanna, G., & Hospital, S. (2013). Antiobesity Effect of *Gymnema sylvestre* Extract on High Fat Diet-induced Obesity in Wistar Rats Personal pdf file for V . Kumar , U . Bhandari , C . D . Tripathi , G . Khanna Antiobesity Effect of *Gymnema sylvestre* Extract on High Fat Diet-induced Obesi. April 2015. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1349852>.

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A., Ahn, B., Shaltiel, S., Stadtman, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 1990, 186, 464-478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H).

Li, Y., Xiao, Y., Gao, W., Pan, J., Qi, Z., Zhang, Z. Gymnemic acid alleviates inflammation and insulin resistance via PPAR δ - and NF κ B-mediated pathways in db/db mice. *Food & Function*, 2019, 10(9), 5853-5862. <https://doi.org/10.1039/C9FO01419E>.

Liu H., Fumiyuki., Yoshisuke T. Isolamento e Elucidação da Estrutura de Ácidos Gimnêmicos, Princípios Antidoces de *Gymnema sylvestre*. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 40, 2006. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.40.1366>.

Lunagariya NA, Patel NK, Jagtap SC, Bhutani KK. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *EXCLI J.* 2014 Aug 22;13:897-921. PMID: 26417311; PMCID: PMC4464291.

McLaughlin T, Torborg CL, Feller MB, O'Leary DD. Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development. *Neuron*. 2003 Dec 18;40(6):1147-60. [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00790-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00790-6).

Madamanchi, NR, Vendrov, A. e Runge, MS (2005) Estresse Oxidativo e Doença Vascular. *Arteriosclerose , Trombose e Biologia Vascular* , 25, 29-38. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000150649.39934.13>.

Mahboob, M. (2024). Addressing the Public Health Crisis of Dyslipidemia. ~The œjournal of cardiovascular diseases, 19(4) . <http://doi.org/ 10.55958/jcvd.v19i4.163>

Malik, JK, Manvi FV, Alagawadi KR, et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Gymnema sylvestre* leaves extract in rats. *International Journal of Green Pharmacy*. 2007;2:114–115. <http://doi.org/ 10.4103/0973-8258.41184>.

Marklund, S., Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 47, 469-474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>.

Marrelli, M., Morrone, F., Argentieri, M. P., Gambacorta, L., Conforti, F., Avato, P. Phytochemical and biological profile of *Moricandia arvensis* (L.) DC.: An inhibitor of pancreatic lipase. *Molecules*, 2018, 23, 2829. <https://doi.org/10.3390/molecules23112829>.

Montanari C.A., de Molfetta F.A., de Freitas RF, da Silva AB, . Docking and molecular dynamics simulation of quinone compounds with trypanocidal activity. *J Mol Model*. 2009 Oct;15(10):1175-84. <https://doi.org/10.1007/s00894-009-0468-3>.

Mbaka, G.; Ogonnia, S.; Banjo, A. Activity of *Raphia hookeri* root extract on blood glucose, lipid profile and glycosylated haemoglobin on alloxan induced diabetic rats. *Journal of Morphological Sciences* 2017, 29, 0-0. <https://doi.org/10.9734/BJMMR/2012/1468>.

Muzaffar, H., Qamar, I., Bashir, M., Jabeen, F., Irfan, S., Anwar, H. *Gymnema sylvestre* supplementation restores normoglycemia, corrects dyslipidemia, and transcriptionally modulates pancreatic and hepatic gene expression in alloxan-induced hyperglycemic rats. *Metabolites*, 2023, 13(4), 516. <https://doi.org/10.3390/metabo13040516>.

O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., Hutchison, G. R. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 2011, 3(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>.

Ononamadu, C. J., Alhassan, A. J., Ibrahim, A., Imam, A. A., Ihegboro, G. O., Owolarafe, T. A., & Sule, M. S. (2019). Evaluation of in vivo antidiabetic, in vitro α -amylase inhibitory, and antioxidant activities of methanol extract/fractions of *Dacryodes edulis* leaves. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*. <https://doi.org/10.1177/2515690X19843832>

Patel SS, Shah RS, Goyal RK. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of Dihar, a polyherbal ayurvedic formulation in streptozotocin induced diabetic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2009;47(7):564–570. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000021>.

Patil, A. N., Nirmal, S. A., Chavan, A. K. Development and validation of HPTLC method for estimation of gymnemic acid in microencapsulated antidiabetic polyherbal formulations. *Acta Chromatographica*, 2013, 25, 601-613. <https://doi.org/10.1556/AChrom.25.2013.4.1>.

Phillips, J. C., Braun, R., Wang, J., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 2005, 26(16), 1781-1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.

Pothuraju, R., Sharma, R. K., Rather, S. A., & Singh, S. (2016). Comparative evaluation of anti-obesity effect of Aloe vera and *Gymnema sylvestre* supplementation in high-fat diet fed C57BL/6J mice. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5(4), 403–407. <https://doi.org/10.5455/JICE.20160623122710>.

Pulla, J. V., Prieto, C. Índice HOMA-IR como indicador de riesgo de enfermedades endocrino-metabólicas en niños y adolescentes con obesidad. *Revista Vive*, 2021. <https://doi.org/10.33996/REVISTAVIVE.V4I11.86>.

Puttanarasaiah, M., Kumar, M. V., Venkataranganna, K., Manjunath, G., Lakshminarayanashastry, V., Godavarthi, A. Methanolic leaf extract of *Gymnema sylvestre* augments glucose uptake and ameliorates insulin resistance by upregulating glucose transporter-4, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, adiponectin, and leptin levels in vitro. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 2016. <https://doi.org/10.5455/JICE.20160224051727>.

Raji,H., Abdelhak O. A., Barhoumi,A., Ahmed C., Abdellah Z., Asad S., Abdallah M. Elgorban, Meenakshi Verma, Ahmed Benharref, Rajender S. Varma, Antiviral docking analysis, semisynthesis and mechanistic studies on the origin of stereo- and chemoselectivity in epoxidation reaction of α' -trans-Himachalene, *Journal of Molecular Liquids*,2023. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122204>.

Ramos, L. P. A., Justino, A. B., Tavernelli, N., Saraiva, A. L., Franco, R. R., de Souza, A. V., Espindola, F. S. Antioxidant compounds from *Annona crassiflora* fruit peel reduce lipid levels and oxidative damage and maintain the glutathione defense in hepatic tissue of Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 142, 112049. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112049>.

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal*, 2007, 22, 659-661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>.

Reddy, I. V. S. (2022). Madhunasini (*Gymnema sylvestre*): A miracle plant for diabetes. *The Pharma Innovation*, 11(3), 993–996. <https://www.thepharmajournal.com/archives/?ArticleId=11399&issue=3&vol=11&year=2022>

Robinson, J. G.; Ballantyne, C. M.; Hsueh, W. A.; Rosen, J. B.; Lin, J.; Shah, A. K.; Tomassini, J. E.; Lowe, R. S.; Terhakovec, A. M. Age, abdominal obesity, and baseline high-sensitivity C-reactive protein are associated with low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B responses to ezetimibe/simvastatin and atorvastatin in patients with metabolic syndrome and atherosclerotic coronary heart disease risk. *Journal of Clinical Lipidology*, v. 7, n. 4, p.292–303, jul.–ago. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2013.03.007>.

Saleem S, Haider S, Naqvi F, Tabassum S, Haleem DJ. Long term administration of HMG-CoA-reductase inhibitor (simvastatin) affects brain serotonin neurotransmission in male rats. *J Basic Appl Sci* 2011;7:79–83. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0017>.

Santos TFD, Souza GH, Silva BP, Viana Neto GA, Silva MTF, Souza CGM, Bracht L, Comar JF, Peralta RM, Bracht A, Sá-Nakanishi AB. *An in vitro, in vivo and in silico* assessment of fat absorption inhibition by a gymnemic acid rich extract of *Gymnema sylvestre* leaves. *J Ethnopharmacology*. 2025 Jun 21;352:120179. Epub ahead of print. PMID: 40550293. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2025.120179>.

Sarkar, R., Hazra, B., Biswas, S., Mandal, N. Evaluation of the in vitro antioxidant and iron chelating activity of *Gymnema sylvestre*. *Pharmacology Online*, 2009, 3, 851-859.

Shanmugasundaram, K.R. Panneerselvam, C. Samudram, P. Shanmugasundaram, E. R. B. (1989). Enzyme changes and glucose utilisation in diabetic rabbits: the effect of *Gymnema sylvestre*, R.Br. *Journal of Ethnopharmacology*, 7(2), 205–234. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(83\)90021-1](https://doi.org/10.1016/0378-8741(83)90021-1).

Shanmugasundaram, E.R.; Rajeswari, G.; Baskaran, K.; Rajesh Kumar, B.R.; Radha Shanmugasundaram, K.; Kizar Ahmath, B., 1990. Use of *Gymnema sylvestre* leaf extract in the control of blood glucose in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.* 30, 281-294. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90107-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90107-5).

Shimada, M., Kawahara, H., Ozaki, K., Fukura, M., Yano, H., Tsuchishima, M. Usefulness of a combined evaluation of the serum adiponectin level, HOMA-IR, and serum type IV collagen 7S level to predict the early stage of nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Gastroenterology*, 2007, 102, 1931-1938. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01322.x>.

Singh, Vinay Kumar, Umar, S., Ansari, S. A., & Iqbal, M. (2008). *Gymnema sylvestre* for diabetics. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 14(1–2), 88–106. <https://doi.org/10.1080/10496470802341508>.

Singh, D. K., Kumar, N., Sachan, A., & Lakhani, P. (2017). Hypolipidaemic Effects of *Gymnema sylvestre* on High Fat Diet Induced Dyslipidaemia in Wistar Rats. 2–6. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/27430.9859>.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

Silvério, A. S. D., Pereira, R. G. F. A., Lima, A. R., Paula, F. B. A., Rodrigues, R. M., Baldissera Jr, L. The Effects of the Decaffeination of Coffee Samples on Platelet Aggregation in Hyperlipidemic Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2013, 68(3), 268–273. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0365-x>.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, 16(3), 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>.

Sousa, J. A., Pereira, P., Allgayer, M. D. C., Marroni, N. P., de Barros, F. F. A., Picada, J. N. Evaluation of DNA damage in Wistar rat tissues with hyperlipidemia induced by tiloxapol. *Experimental and Molecular Pathology*, 2017, 103(1), 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.06.009>.

Souza, G.H., Silva, B.P., Neto, GAV, Pilau, E., Barros, L., Bracht, L., Comar, J.F., Peralta, R.M., Bracht, A., Sá-Nakanishi, A.B., 2025. *Tamarindus indica* sub-products as potential tools for simultaneous management of diabetes and obesity. *Food & Function*, 2025, Mar 3;16(5):1969-1991. <https://doi.org/10.1039/d4fo04536j>.

Srinuanchai, W., Nooin, R., Jarussophon, S., Kasemwong, K. & Nuchuchua, O. Determination of gymnemic acid level in *Gymnema inodorum* leaves using multiple reaction monitoring mass spectrometry. *J. Chem. Metrol* **13**, 75-79 (2019).

Starcher, B. A Ninhydrin-Based Assay to Quantitate the Total Protein Content of Tissue Samples. *Analytical Biochemistry*, v. 292, n. 1, p. 125–129, 2001. <https://doi.org/10.1006/ABIO.2001.5050>.

Titchenell, P. M., Lazar, M. A., Birnbaum, M. J. Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2017, 28, 497-504. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.003>.

Tiwari, P., Mishra, B.N., Sangwan, N.S. Phytochemical and pharmacological properties of *Gymnema sylvestre*: an important medicinal plant. *Biomed Res Int*. 2014 ; 2014:830285. <https://doi.org/10.1155/2014/830285>.

Torrezan R., Malta A., Rodrigues W.S.N., Araújo A.A.S., Miranda A.R., Moura G.E. Monosodium L-glutamate-obesity onset is associated with disruption of central control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system. *Journal of Neuroendocrinology*. ; 2019. <https://doi.org/10.1111/jne.12717>.

Tuccinardi T, Poli G, Romboli V, Giordano A, Martinelli A. Extensive consensus docking evaluation for ligand pose prediction and virtual screening studies. *J Chem Inf Model*. 2014 Oct 27;54(10):2980-6. PMID: 25211541. <https://doi.org/10.1021/ci500424n>.

Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2010 Jan. 45561. PMID: 19499576; PMCID: PMC3041641. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>

Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C., & Sharma, S. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(4), 236–240. <https://doi.org/doi:10.4103/2231-4040.90879>.

Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 2009, 16, 97-110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>.

Walker, R. B., Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., & Wangila, G. W. (2010). Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>.

World Health Organization. Obesity and Overweight; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021.

Yin, X., Zhang, Y., & Wang, X. (2008). Phosphorylation of IRS proteins: Yin-Yang regulation of insulin signaling. *Vitamins and Hormones*, 80, 351–387. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00613-4](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00613-4)

Yin. L., J.C. Jung, Z. Ali, I.A. Khan, S. Oh, Anti-inflammatory effect of triterpene saponins isolated from blue cohosh (*Caulophyllum thalictroides*), Evid. Base Compl. Alternative Med. 2012 (2012).

Zamani M, Ashtary-Larky D, Nosratabadi S, Bagheri R, Wong A, Rafiei MM, Asiabar MM, Khalili P, Asbaghi O, Davoodi SH. The effects of *Gymnema Sylvestre* supplementation on lipid profile, glycemic control, blood pressure, and anthropometric indices in adults: A systematic review and meta-analysis. *Phytother Res*. 2022 <https://doi.org/10.1002/ptr.7585>.

Zalba, G., José, G. S., Moreno, M. U., Fortuño, M. A., Fortuño, A., Beaumont, F. J., & Díez, J. (2001). Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD (P) H oxidase. *Hypertension*, 38(6), 1395-1399. <http://doi.org/10.1161/hy1201.099611>.

Zhang YF, Xiao S., Sun LJ, Ge ZW, Fang FK, Zhang W.(2013). Triagem rápida de compostos bioativos de produtos naturais integrando cromatografia paralela de 5 canais acoplada à espectrometria de massas on-line e ensaios baseados em microplacas. *Anal. Chim. Acta* 777, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.028>.

Zhang T, Zhao S, Li W, Ma L, Ding M, Li R, Liu Y. High-fat diet from perilla oil induces insulin resistance despite lower serum lipids and increases hepatic fatty acid oxidation in rats. *Lipids Health Dis*. 2014 Jan 15;13:15. <http://doi.org/10.1186/1476-511X-13-15>.

Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13394. <http://doi.org/10.1111/jfbc.13394>.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1: Parâmetros previstos de farmacocinética e similaridade medicamentosa (ADME) dos gymnemosídeos a e b encontrados no extrato.

	Gymnemoside 2	Gymnemoside 3
TPSA	229,74	229,74
Log P_{ow} (iLOGP)	3,25	2,56
Log S (ESOL)	-6,96	-6,96
absorção GI	Baixo	Baixo
BBB permanente	Não	Não
Substrato P-gp	Sim	Sim
Inibidor do CYP1A2	Não	Não
Inibidor do CYP2C19	Não	Não
Inibidor do CYP2D6	Não	Não
Inibidor do CYP2C9	Não	Não
Inibidor do CYP3A4	Não	Não
Lipinski	Não; 3 violações: MW>500, NorO>10, NHorOH>5	Não; 3 violações: MW>500, NorO>10, NHorOH>5
Pontuação de biodisponibilidade	0,11	0,11

Absorção GI - Absorção gastrointestinal; permeante da BBB - permeação da barreira hematoencefálica.

Tabela S2. Pontuações médias ao redocking do ligante de pioglitazona (P1B) no PPAR γ modelado e do ligante de bezafibrato (PEM) no PPAR α modelado por dois softwares diferentes

MOLÉCULA	SCORE AUTODOCK		SCORE GOLD	
	Pontuação (kcal/mol)	RMSD (Å)	Pontuação (kcal/mol)	RMSD (Å)
P1B	-9,02 ± 0,122	0,95 ± 0,174	93,5 ± 0,486	0,92 ± 0,176
PEM	-9,00 ± 0,116	0,95 ± 0,174	83,61 ± 0,801	0,92 ± 0,176

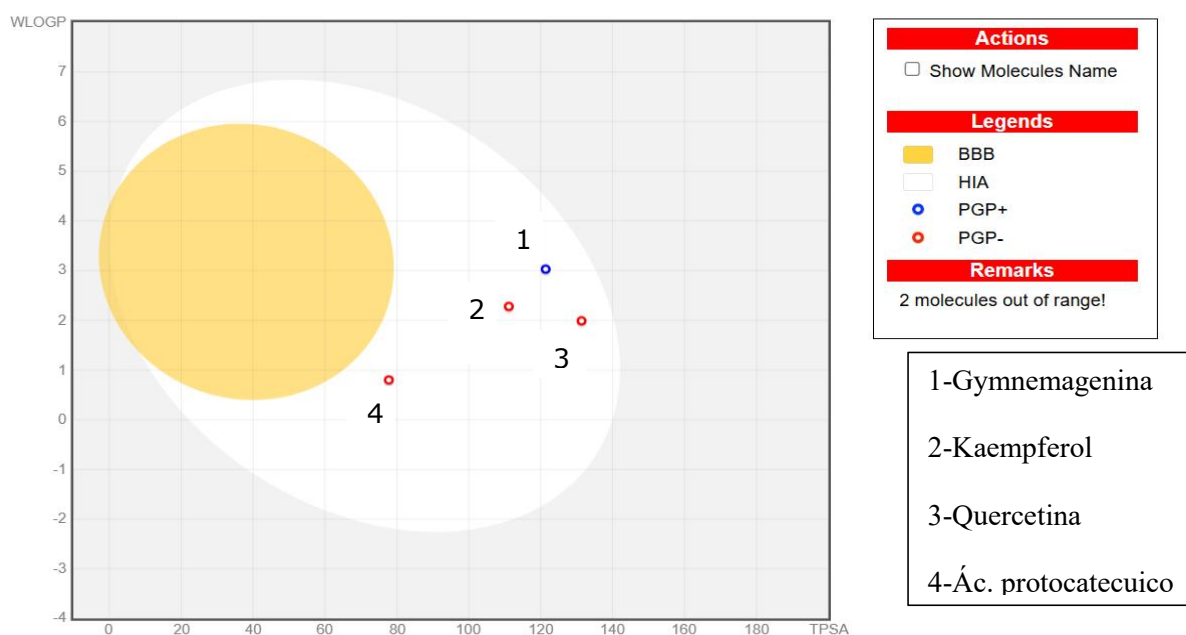


Figura S1. Modelo ovo cozido (BOILED-Egg) que prevê a absorção gastrointestinal e a permeação pela barreira hematoencefálica das moléculas que apresentaram alta biodisponibilidade com base na tabela 2, SwissADME.

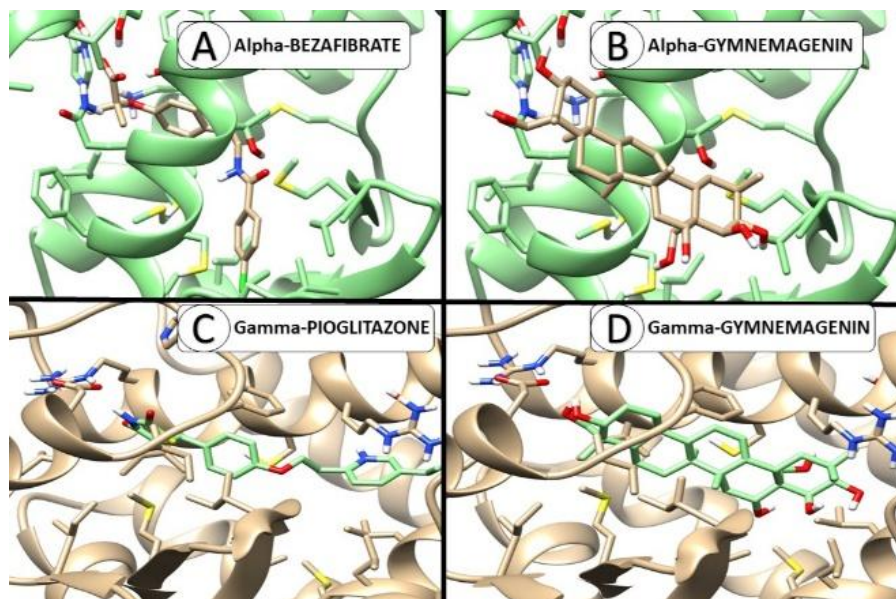


Figura S2: Estrutura 3D de interação entre gymnemagenina ou droga de referência com os respectivos receptores PPAR α e PPAR γ .

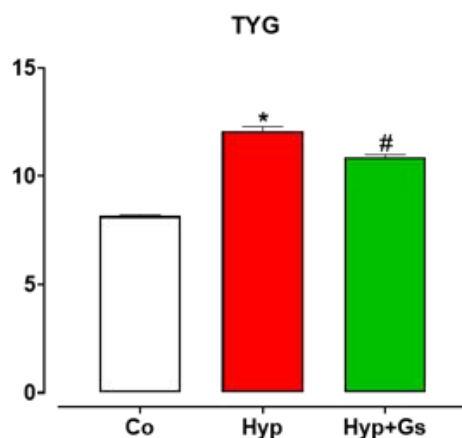


Figura S3. Efeito do extrato de *Gymnema sylvestre* sobre o índice TYG dos animais hiperlipidêmicos. A hiperlipidemia foi induzida pela administração de tiloxapol (400mg/Kg) como descrito na secção de material e métodos. O índice TYG foi calculado pela fórmula: $\ln((\text{nível de triacilglicerídeos} \times \text{níveis de glicose})/2)$. Cada valor representa a média $\pm$ erro padrão médio de 5-6 animais. Co: controle; Hyp: animais hiperlipidêmicos; Hyp+Gs: animais tratados submetidos a hiperlipidemia. * e #: Diferença estatística em relação ao grupo controle e hiperlipidêmico, respectivamente, de acordo com One-Way ANOVA, teste post-hoc de Tukey (Prisma Program 8.0), ($p < 0,05$).

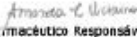
CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Gymnema Sylvestre 75%		
Lote Interno:	24K28-B039-205198	Lote do Fabricante:	4/1
Data de Fabricação:	29/10/2024	Data de Vencimento:	29/10/2029
Origem:	Brasil	Procedência:	Brasil
Data da Análise:	05/12/2024	Número da Ordem:	205198
Condições de Armazenamento:	Temperatura até 25°C - Manter ao Abrigo da Luz		
CAS: --	DCB: -	DCI: -	
Fórmula Molecular:	-	Peso Molecular:	--

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referência
Aspecto macroscópico	Pó higroscópico de aspecto homogêneo.	Conforme		Fabricante
Cor	Pardo a pardo esverdeado.	Conforme		Fabricante
Sabor	Característico.	Conforme		Fabricante
Odor	Característico.	Conforme		Fabricante
Cinzas totais	≤ 40,0	4,1500	%	Fabricante
Cinzas insolúveis em ácido	≤ 5,0	1,4500	%	Fabricante
Densidade aparente	Informativo.	0,5470	g/mL	Fabricante
Umidade	≤ 8,0	3,2000	%	Fabricante
pH	4,00 - 6,50	5,62		Fabricante
Solubilidade	Pouco solúvel em água e insolúvel em etanol.	Conforme		Fabricante
Granulometria	Pó fino a semi fino.	Conforme		Fabricante
Doseamento	Ácido gímênico: ≥ 75	78,3100	%	Fabricante
Arsênio (As)	< 5,0	0,00	mg/ kg	Fabricante
Cádmio (Cd)	< 1,0	0,00	mg/ kg	Fabricante
Chumbo (Pb)	< 5,0	0,00	mg/ kg	Fabricante
Mercurio	< 0,1	0,00	mg/ kg	Fabricante
Testes microbiológicos		-		
Bactérias totais aeróbias	≤ 2000	< 10	UFC/g mL	Fabricante
Totais de fungos e leveduras	≤ 200	40	UFC/g - mL	Fabricante
Escherichia coli	Ausente/ g ou mL	Ausente		Fabricante
Pseudomonas aeruginosa	Ausente/ g ou mL	Ausente		Fabricante
Staphylococcus aureus	Ausente/ g ou mL	Ausente		Fabricante
Salmonella	Ausente/ 10g ou mL	Ausente		Fabricante

Conclusão **APROVADO**


 Farmacêutico Responsável
 João Paulo Garin Mendes
 CRF-GO: Nº 7.355
 Pagron Services Brasil


 Farmacêutico Responsável
 Amanda R. Vitorino
 CRF-SP: Nº 50.036
 Pagron Distribution Brazil
 SAC: (11) 5186-4840