



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia

MARINA MANIERI PACHETI

MODIFICAÇÕES GLICO-OXIDATIVAS EM SISTEMA-MODELO *IN VITRO* E EFEITOS
DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO

Araraquara, SP

2024

MARINA MANIERI PACHETI

**MODIFICAÇÕES GLICO-OXIDATIVAS EM SISTEMA-MODELO *IN VITRO* E
EFEITOS DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Co-orientador: Doutorando Felipe Nunes Cardoso

Araraquara, SP

2024

P116m Pacheti, Marina Manieri.
Modificações glico-oxidativas em sistema-modelo *in vitro* e
efeitos do ácido alfa lipóico / Marina Manieri Pacheti. – Araraquara,
2024.
47 f. : il.

Orientadora: Amanda Martins Baviera.
Coorientador: Felipe Nunes Cardoso.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia) –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade
de Ciências Farmacêuticas.

1. Diabetes *mellitus*. 2. AGE. 3. Bioativo. 4. Potencial
antiglicação. 5. Ácido alfa lipóico. I. Baviera, Amanda Martins,
orient. II. Cardoso, Felipe Nunes, coorient. III. Título.

MARINA MANIERI PACHETI

**MODIFICAÇÕES GLICO-OXIDATIVAS EM SISTEMA-MODELO *IN VITRO* E
EFEITOS DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Área de Concentração: N/A

Data da defesa: 28/05/2024

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Amanda Martins Baviera
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Dr. Paulo Fernando Carlstrom
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Me. André Luiz Ferreira de Freitas
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Me. Tainá Silva de Oliveira
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Dra. Ingrid Delbone Figueiredo
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que me inspiraram a alcançar além das minhas próprias expectativas, que me encorajaram nos momentos de dúvida e celebraram comigo nas conquistas. Que este trabalho seja um testemunho do poder do apoio mútuo e da importância de cultivar relacionamentos significativos. Como disse Helen Keller, 'Sozinhos podemos fazer tão pouco; juntos podemos fazer tanto'. Que estas palavras sirvam como um lembrete do valor da colaboração e da amizade. A todos que contribuíram para esta jornada, meu sincero agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, o qual eu reconheço como o provedor de todas as bênçãos em minha vida

À minha família, que estiveram ao meu lado desde o início desta jornada, quero expressar meu eterno agradecimento. Suas palavras de incentivo, apoio incondicional e amor foram o combustível que impulsionou cada passo deste caminho acadêmico.

À minha mãe e meu pai, que sempre acreditaram em mim, obrigado por serem meus maiores incentivadores. Às vezes, suas palavras de encorajamento eram exatamente o que eu precisava para superar os desafios e seguir em frente.

Ao meu namorado por todo companheirismo, paciência e incentivo

Vocês foram minha âncora nos momentos turbulentos e minha fonte de celebração nos momentos de vitória. Esta conquista é tanto de vocês quanto minha. Que possamos compartilhar muitas mais juntos.

Agradeço a minha orientadora Amanda Baviera pela oportunidade de poder fazer parte do laboratório, pela orientação, paciência e expertise ao longo desse processo

Ao meu coorientador Felipe Nunes pela paciência ao me ensinar, seu apoio fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”, e a todos do laboratório de bioquímica que me acolheram e proporcionaram não apenas educação, mas também oportunidades de crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica crônica, caracterizada por defeitos na produção de insulina pelas células beta do pâncreas e/ou por resistência tecidual insulínica. A principal manifestação do DM é a hiperglicemia que, em longo prazo, contribui para o estabelecimento de um quadro de estresse glico-oxidativo, onde se observa a formação de produtos finais de glicação avançada (AGE, do inglês, advanced glycation end-products). AGE exercem efeitos pró-oxidantes e pró-inflamatórios, além de serem responsáveis pela formação *de cross-linking* proteico e, por isso, resultam no desenvolvimento de grande parte das complicações do DM. Estudos demonstram que o ácido alfa lipóico (AAL) apresenta propriedades antioxidantes e antiglicantes, que possivelmente podem culminar na diminuição da formação dos AGE. O presente estudo teve como objetivo analisar o potencial antiglicação do AAL por meio do sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*, baseado em incubações de albumina sérica bovina (BSA) com metilglioxal (MGO) e na avaliação de marcadores do estresse glico-oxidativo, incluindo AGE fluorescentes, produtos de oxidação de resíduos de tirosina e triptofano e proteínas carboniladas, utilizando-se AAL nas concentrações de 0,5, 1 e 2 µg/mL, durante os tempos de 0, 1, 2, 4 e 8 dias. Como principal resultado, observou-se uma discreta diminuição da oxidação proteica promovida pelo MGO na maior concentração de AAL (2 µg/mL), demonstrado nos resultados de níveis de proteínas carboniladas e fluorescência dos marcadores de oxidação dos resíduos de aminoácidos.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*; AGE; bioativo; potencial antiglicação; ácido alfa lipóico.

ABSTRACT

Diabetes *mellitus* (DM) is a chronic metabolic disease, characterized by impairments in insulin production by pancreatic beta cells and/or tissue insulin resistance. The main manifestation of DM is hyperglycemia that, in the long term, contributes to the establishment of glycoxidative stress, where the formation of advanced glycation end-products (AGE) is observed. AGE exert pro-oxidant and pro-inflammatory effects, in addition to being responsible for the formation of protein cross-linking and, therefore, resulting in the development of most DM complications. Studies demonstrate that alpha lipoic acid (ALA) has antioxidant and antiglycating properties, which may possibly result in a reduction in the formation of AGE. The present study aimed to investigate the antiglycation potential of ALA through the *in vitro* model system of protein glycation, based on incubations of bovine serum albumin (BSA) with methylglyoxal (MGO) and the evaluation of markers of glycoxidative stress, including fluorescent AGE, oxidation products of tyrosine and tryptophan residues and carbonyl proteins, using ALA at concentrations of 0.5, 1 and 2 µg/mL, for periods of 0, 1, 2, 4 and 8 days. As the main result, a slight decrease in the protein oxidation promoted by MGO was observed at the highest concentration of ALA (2 µg/mL), demonstrated in the results of PCO levels and fluorescence of oxidation markers of amino acid residues.

Keywords: Diabetes *mellitus*; AGE; bioactive; antiglycation potential; Alpha lipoic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Glicação de uma proteína pela glicose e subsequente formação de AGE.....	13
Figura 02 - Resultado das alterações provocadas pelo estresse oxidativo: aceleração do envelhecimento e desenvolvimento de doenças.....	15
Figura 03 - Formas oxidadas e reduzidas do ácido alfa-lipóico.....	16
Figura 04 - Fluxograma do processo para quantificação de proteínas carboniladas.....	25
Figura 05 - Efeitos das concentrações de AAL na formação de AGE fluorescentes em condições de incubação de BSA na ausência de metilglioxal.....	28
Figura 06 - Efeitos das concentrações de AAL na formação de AGE fluorescentes em condições de incubação de BSA na presença de metilglioxal.....	29
Figura 07 - Efeitos das concentrações de AAL na formação de ditirosina (A), N'-formilquinurenina (B), quinurenina (C).....	31
Figura 08 - Efeitos das concentrações de AAL nos níveis de proteínas carboniladas após 8 dias de incubação na presença (A) e ausência (B) de metilglioxal.....	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Esquema para a preparação das incubações <i>in vitro</i>	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-DG	3-desoxiglucosona
AG	Aminoguanidina
AAL	Ácido alfa lipóico
AGE	Produtos finais de glicação avançada (do inglês <i>advanced glycation end products</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP	2,4-dinitrofenilhidrazona
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HCl	Ácido clorídrico
HSA	Albumina sérica humana (do inglês <i>human serum albumin</i>)
MGO	Metilglioxal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Nrf2	fator nuclear eritroide 2
PCO	Proteínas carboniladas
TCA	Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1. Diabetes <i>mellitus</i>	11
1.2. AGE, Estresse Oxidativo e Antioxidantes.....	12
1.3. Ácido Alfa Lipoíco.....	16
1.4. Marcadores de resíduos de aminoácido e quantificação de proteínas carboniladas.....	18
2. Objetivos	20
3. Material e método.....	21
3.1. Sistema modelo de glicação proteica <i>in vitro</i>	21
3.2. Determinação de AGE fluorescente	23
3.3. Determinação de marcadores de oxidação de resíduos dos aminoácidos tirosina e triptofano	23
3.4. Quantificação de proteínas carboniladas (PCO)	23
3.5. Análises estatísticas.....	25
4. Resultados e discussão	26
4.1. Estimativa de AGE fluorescente na presença do AAL.....	26
4.2. Marcadores de proteínas carboniladas	33
5. Conclusão	36
Referências	37

ANEXO A - Espectro de absorbância controle e nas concentrações de AAL 2 µg/mL (gráfico 1), AAL 1 µg/mL (gráfico 2), AAL 0,5 µg/mL (gráfico 3), registradas no dia 8 com metilglioxal e/ou BSA. Intensidade de fluorescência X comprimento de onda.....42

ANEXO B - Espectro de emissão controle e nas concentrações de AAL 2 µg/mL (gráfico 1), AAL 1 µg/mL (gráfico 2), AAL 0,5 µg/mL (gráfico 3) registradas no dia 8 na presença de metilglioxal e/ou BSA. Intensidade de fluorescência X comprimento de onda.....44

1. Introdução

1.1. Diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* (DM) é um distúrbio metabólico crônico caracterizado por alterações no controle do metabolismo da glicose, lipídeos e proteínas em decorrência da falta das ações da insulina. É uma doença que impacta seriamente a saúde global, pois afeta grande parte da população. O DM tem como principal manifestação níveis elevados de glicose no sangue (hiperglicemia), os quais são resultado de uma deficiência na produção/secreção de insulina pelas células beta do pâncreas e/ou resistência à ação desse hormônio nos tecidos alvo. A hiperglicemia crônica causa danos subsequentes ao organismo, como neuropatia, nefropatia, retinopatia, doenças cardiovasculares e complicações no sistema, levando a uma qualidade de vida mais baixa. Estes danos, podem ser oriundos de uma produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e produtos avançados da glicação (Brownlee, 2005; Galassettii, 2012; Pasquel *et al.*, 2021; Yun e Ko, 2021).

O DM é um crescente problema de saúde, no Brasil, 13 milhões de pessoas vivem com a doença, o que corresponde a 6,9% da população nacional. (Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes, 2023). São reconhecidas as seguintes formas de disfunções metabólicas associadas ao diabetes: pré-diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 (DM tipo 1; DM tipo 2), além de diabetes gestacional (DMG). Pré-diabetes é uma condição na qual os níveis de glicose no sangue são elevados, mas não suficientemente altos para ser diabetes tipo 2, tem função de indicar o risco aumentado para diabetes e doenças cardíacas. O DM tipo 1 tem como causa a destruição autoimune das células β do pâncreas que leva uma deficiência absoluta na secreção de insulina, com uma apresentação clínica abrupta e com maior propensão à cetoacidose, fazendo-se necessária a insulino-terapia. O DM tipo 2 é o tipo mais comum, geralmente associado à obesidade, sendo caracterizado por resistência tecidual à insulina e deficiência parcial na secreção de insulina pelas células β pancreáticas e, também por alterações na secreção de incretinas, além disso apresenta características clínicas associadas à hipertrigliceridemia. Já o diabetes gestacional é diagnosticado pela primeira vez durante a gravidez e pode gerar complicações como parto prematuro, entre outras. (American diabetes association,

2014, 2014; International diabetes federation, 2018; Ahlqvist *et al.*, 2018; World health organization, 2019; Siller *et al.*, 2020; Leslie *et al.*, 2021)

No ano de 2018, a Federação Internacional de Diabetes estimou que 8,8% da população mundial entre 20 e 79 anos de idade estavam vivendo com diabetes, resultando assim em um aumento na incidência da doença principalmente nos países em desenvolvimento. De acordo com Rooney *et al.* (2023), as estimativas de 2021 apresentaram um aumento substancial de pessoas com pré-diabetes, salientando-se que, nos próximos 25 anos, ainda haverá um aumento gradual e crescente nessa estimativa, caso não houver alguma forma de cuidado e tratamento mais efetivo, principalmente nos países em desenvolvimento.

Esse aumento na prevalência do DM está associado a diversos fatores, os quais são relacionados a rápida urbanização, transição epidemiológica e nutricional, maiores taxas de sedentarismo, excesso de peso, crescimento e envelhecimento populacional (Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes, 2019).

O DM também está associado ao crescente índice de hospitalizações, resultando em um aumento na utilização dos serviços de saúde, pois tem como consequência o maior risco das doenças cardiovasculares, insuficiência renal, cegueira e, até mesmo amputações. Dessa forma, prevê-se um aumento da utilização dos serviços de saúde nos próximos anos em decorrência das complicações diabéticas, principalmente nos países em desenvolvimento (Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes, 2019)

Os principais órgãos que parecem ser afetados pelas complicações do DM são aqueles onde as células não necessitam de insulina para realizar a captação de glicose (sistema nervoso, coração, rins, vasos sanguíneos), tendo como consequência uma alta concentração de glicose intracelular durante estados de hiperglicemia, o que favorece a glicação das proteínas (Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes, 2023).

1.2. AGE, Estresse Oxidativo e Antioxidantes

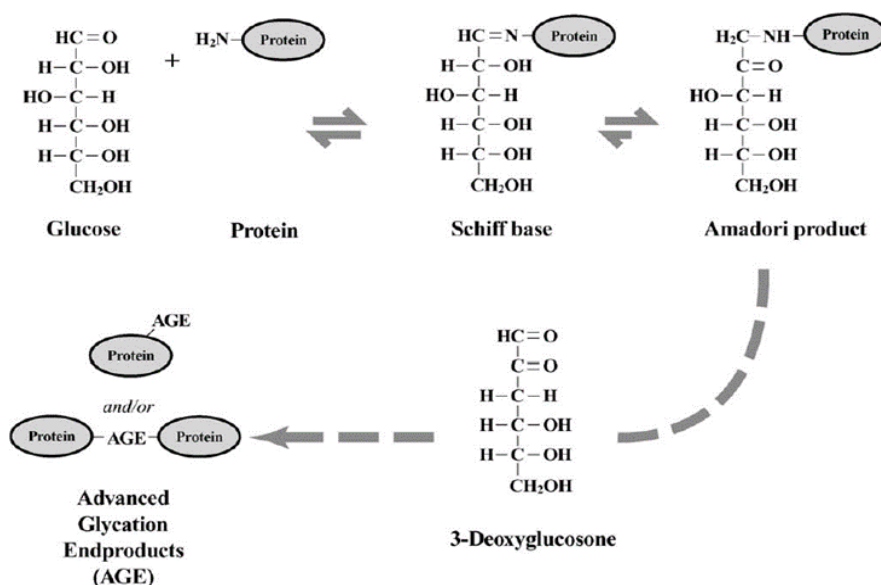
Os AGE correspondem a uma grande variedade de compostos individuais, os quais são produzidos durante as reações não enzimáticas entre as cadeias laterais

de proteínas (incluindo os resíduos de lisina e arginina) e glicose ou até mesmo os produtos de sua degradação (Ames, 1992; Yamagishi *et al.*, 2001; Vlassara, 2002).

Os AGE são moléculas complexas, que causam reticulação de proteínas, exibem escurecimento e alguns geram fluorescência quando excitados. São moléculas de formação lenta, na qual acreditava-se que eram formadas apenas por proteínas extracelulares de vida longa, e comprovou-se que também estão presentes naquelas proteínas de vida curta, até mesmo em fatores de crescimento (Giardino *et al.*, 1994).

A glicação proteica é iniciada por uma reação de adição nucleofílica entre um grupo amino livre de uma proteína e um grupo carbonila de um açúcar redutor, formando uma “base de Schiff” livremente reversível que, quando formada, rearranja-se para uma estrutura mais estável, uma cetoamina (produto de Amadori). Essa glicação é uma reação espontânea que depende do tempo de duração da hiperglicemia, além do tempo de vida das proteínas e da permeabilidade do tecido à glicose livre. Além dessas reações, as proteínas glicadas podem sofrer reações adicionais, envolvendo intermediários dicarbonílicos, tais como 3-desoxiglucosonas (3-DG), originando produtos finais de glicação avançada (AGE), representada na Figura 01, e descrito por Ahmed.

Figura 01 - Glicação de uma proteína pela glicose e subsequente formação de AGE.



Fonte: Ahmed, 2005.

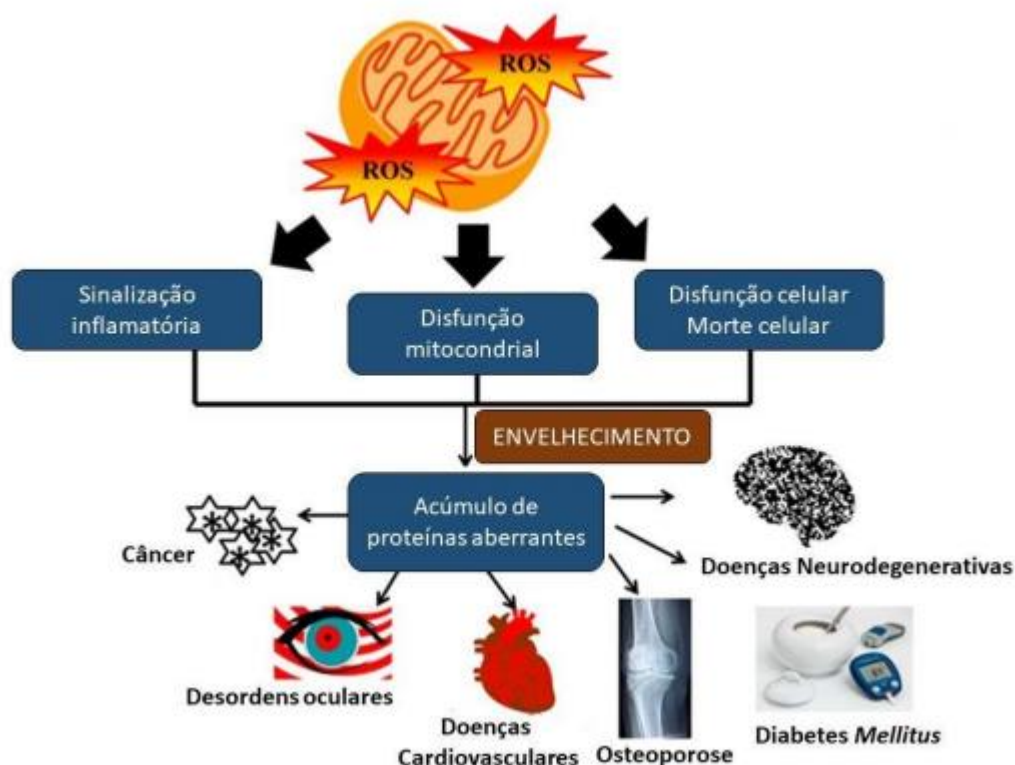
De acordo com Brownlee (1995), vários miligramas de 3-DG são formados por dia em indivíduos não diabéticos e, subsequentemente, detoxificados através da redução à 3-desoxifrutose, sugerindo que o organismo contém uma enzima redutase específica que detoxifica certos precursores de AGE, prevenindo sua formação. A natureza e eficiência dessas enzimas, poderiam ser um determinante importante da taxa de AGE que se formam mediante um determinado nível de glicose no sangue de pessoas saudáveis e/ou diabéticas. Assim, conclui-se que esses aumentos no acúmulo de AGE, acompanhado de danos nos tecidos diabéticos, podem ser gerados pelos aumentos das taxas de formação AGE em relação à glicose no sangue (Barbosa *et al.*, 2008).

A formação dos AGE (Figura 01) pode causar alterações patológicas através de três mecanismos: (1) os AGE alteram as vias de transdução de sinal, envolvendo ligantes da matriz extracelular; (2) AGE alteram o nível de sinais solúveis, tais como as citocinas, hormônios e radicais livres pela interação com receptoras de AGE em células específicas; (3) a formação de AGE intracelulares por excesso de glicose, frutose e intermediários de vias metabólicas altamente reativos podem alterar diretamente as estruturas das proteínas que funcionam nos tecidos alvo (Brownlee, 1995).

O processo de glicação proteica (Figura 01) altera a atividade biológica das proteínas e inicia seu processo de degradação, enquanto a inibição da reação de glicação mitiga complicações diabéticas. Compostos naturais e sintéticos, incluindo flavonoides, fenóis, imidazol, tiazolidina e sulfonato, conseguem diminuir as taxas de glicação de proteínas, assim desaceleram a subsequente formação dos AGE. Dessa forma, a terapia antiglicação torna-se uma presente estratégia terapêutica para evitar a formação de AGE e as complicações diabéticas tardias (Abbas *et al.*, 2015).

Na década de 1950, o médico americano Denham Harman propôs a "Teoria dos Radicais Livres no Envelhecimento", sugerindo que o aumento na produção de radicais livres está associado ao processo de envelhecimento. Esses radicais livres podem causar danos progressivos aos sistemas biológicos devido a sua alta reatividade química. A teoria foi confirmada com evidências de que grande parte desses radicais livres é produzida nas mitocôndrias e sua produção aumenta com a idade (figura 02) (Kagan *et al.*, 2009).

Figura 02 - Resultado das alterações provocadas pelo estresse oxidativo: aceleração do envelhecimento e desenvolvimento de doenças.



Fonte: Adaptado de Tan & Norhaizan (2019).

O processo de glicação e a formação de AGE ocorrem de forma natural no organismo, e estão envolvidos no processo de envelhecimento; porém, em um indivíduo com hiperglicemia crônica e estresse glico-oxidativo, a formação de AGE se torna acelerada, havendo um substancial aumento da concentração de AGE endógenos, os quais podem se somar aos AGE exógenos, isto é, provenientes de alimentos, favorecendo o surgimento e a progressão das complicações do DM. Uma conhecida ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequentemente do estresse oxidativo (Figura 02) é o estímulo à formação de AGE, onde através das vias NADPH oxidase, as proteínas glicadas podem formar ligações covalentes cruzadas irreversíveis (*cross-linking* protéico), obtendo assim um papel importante nas complicações do DM. A combinação das ações dos AGE e EROs em altas concentrações, causando efeitos deletérios sobre biomoléculas, geram o estresse glico-oxidativo (Zieman e Kass, 2004; Barbosa *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo (Figura 02), é o desequilíbrio entre os pró-oxidantes e os antioxidantes, enfatizando que os pró-oxidantes são formados como produtos do

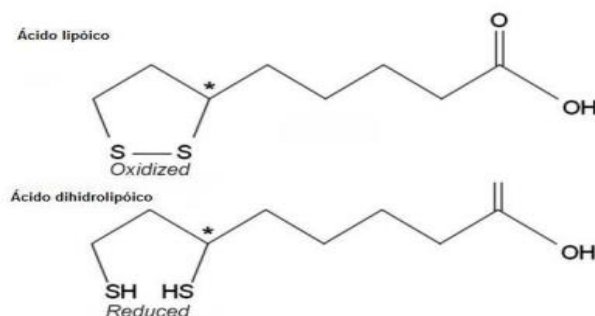
metabolismo aeróbio, no entanto, se houver um processo fisiopatológico no organismo que exacerbe o estresse oxidativo, ocorrerá formação de EROs, fazendo-se necessário o acionamento das defesas antioxidantes, que são eliminadores de EROs. Dentre os antioxidantes existentes encontram-se a vitamina A, tocoferóis, carotenoides, as enzimas antioxidantes, dentre outros, capazes de acelerar a eliminação de radicais livres, inibindo assim os efeitos deletérios do acúmulo de oxidantes no organismo (Rahal *et al.*, 2014).

Uma variedade de estudos demonstrou que o DM aumenta a formação de radicais livres e reduz a capacidade antioxidante, resultando em danos oxidativos nos componentes celulares. Certos antioxidantes, incluindo a vitamina C, parecem eficazes na redução das complicações diabéticas em estudos pré-clínicos (Barbosa *et al.*, 2010).

1.3. Ácido Alfa Lipoico

O ácido alfa-lipoico (AAL) ou ácido tióctico (1,2 ditiolano-3-pentanoico) é um composto dissulfeto com um centro quiral, e pertence à classe dos ácidos graxos com oito carbonos. O AAL possui em sua cadeia dois grupos tióis capazes de sofrerem processo de oxidação ou redução (Figura 03), sua forma reduzida é denominada de ácido di-hidrolipoico. (Rochette *et al.*, 2015)

Figura 03 - Formas oxidadas e reduzidas do ácido alfa-lipoico.



Fonte: Goraca *et al.*, 2011.

O AAL é produzido pelos seres humanos, mas também pode ser encontrado em fontes alimentares. É sintetizado pelo corpo a partir do aminoácido cisteína e foi descoberto pela primeira vez em 1951 a partir de extratos de fígado bovino, pelos bioquímicos americanos L.J. Reed e I.C. Gunsalus. Atualmente, estudos relatam que o AAL é sintetizado em humanos na mitocôndria, a partir do ácido actânico e da L-cisteína (Uchida *et al.*, 2015).

Embora seja sintetizado pelo corpo humano, as quantidades de AAL produzidas não são suficientes para atender às necessidades energéticas das células (Salehi *et al.*, 2019) uma vez que, no ciclo de Krebs, o AAL desempenha papéis importantes em diversas reações químicas, atuando como cofator para alguns complexos enzimáticos envolvidos na geração de energia para a célula, também forma ligações covalentes com proteínas e possui potencial terapêutico. Na natureza, o AAL pode ser encontrado em pequenas quantidades em alimentos como carnes vermelhas, vísceras, espinafre e brócolis, porém a sua forma sintética é a mais utilizada nas suplementações alimentares (Votano *et al.* 2021).

Vitaminas e suplementos dietéticos têm sido sugeridos para auxiliarem no controle do DM de forma complementar à terapia clássica. Estudos têm demonstrado que o uso de antioxidantes, incluindo o AAL, em combinação com medicamentos antidiabéticos orais, tal como a metformina, pode resultar em uma melhoria adicional nos níveis de glicose no sangue e na sensibilidade à insulina (Silva C., 2000).

De acordo com Rochette *et al.* (2015), o AAL é eficaz em estimular a captação tecidual de glicose, via aumento no transporte de glicose pela membrana plasmática celular. O AAL estimula as atividades de componentes da sinalização da insulina, incluindo o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), fosfoniosítideo 3-quinase (PIP3K) e proteína quinase B (PKB), esta última responsável pela promoção da translocação do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT 4) para a membrana plasmática, melhorando subsequentemente a captação intracelular de glicose, contribuindo assim para a redução da glicemia.

Evidências recentes indicam que o AAL exerce certos benefícios aos diabéticos que já tiveram Covid-19 e apresentaram complicações por causa do vírus. Nesses pacientes, o AAL teve a capacidade de reduzir o estresse oxidativo, agindo como um potente antioxidante (Cure e Cumhur, 2020).

O tratamento medicamentoso em associação a antioxidantes, mudanças no estilo de vida e alimentação, obtém-se uma melhora na qualidade de vida do diabético,

tornando fundamental dar seguimento à esta linha de pesquisa (Souza, *et al.*, 2021). Dessa maneira, o presente estudo tem o intuito de dar seguimento, avaliando o potencial anti-glicação de AAL em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*.

1.4. Marcadores de resíduos de aminoácido e quantificação de proteínas carboniladas

Os marcadores de resíduos de aminoácidos permitem a detecção de modificações de glicação e oxidação, que ocorrem nos aminoácidos após a síntese proteica. Essas modificações podem afetar tanto a função quanto a estrutura das proteínas, tornando essencial a sua identificação (Ribeiro *et al.*, 2008).

Além disso, os marcadores de resíduos de aminoácidos são fundamentais no estudo de processos biológicos e patológicos. A identificação de modificações nos resíduos de aminoácidos ajuda a compreender tanto processos biológicos normais quanto patológicos. Por exemplo, a presença de resíduos de aminoácidos modificados por glicação pode indicar níveis elevados de glicose e o risco de complicações diabéticas (Simoies, 2017).

O triptofano, sendo um aminoácido presente em BSA, apresenta potencial oxidante na presença de açúcares ou de intermediários. A oxidação do triptofano resulta na formação de produtos que incluem quinurenina e *N'*-formilquinurenina. Já a ditirosina é formada através da ligação cruzada oxidativa e covalente entre dois resíduos do aminoácido tirosina (Balasubramanian e Kanwar, 2002; Perdivara *et al.*, 2010).

A mensuração de grupos carbonila em proteínas é uma abordagem utilizada para avaliar a oxidação das proteínas em sistemas-modelo de glicação *in vitro*. A existência de grupos carbonila em proteínas é um indicador de danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (Barbosa *et al.*, 2008).

A glicação de proteínas e o processo que leva à formação dos AGE resultam na geração de intermediários altamente reativos, incluindo os compostos dicarbonílicos e os EROs. Logo, o aumento da geração de EROs no organismo e a ação ineficiente dos mecanismos antioxidantes endógenos causam estresse oxidativo, induzindo reações de peroxidação lipídica e glicoxidação, exacerbando a formação de AGE e EROs, intensificando o dano oxidativo. Além disso, doenças inflamatórias de natureza crônica e neurodegenerativas tem em comum o aumento na

geração de grupos carbonilas nas proteínas (Moldogazieva *et al.*, 2019; Schalkwijk *et al.*, 2020).

2. Objetivos

Avaliar o potencial antiglicação do ácido alfa lipóico, frente às reações glicoxidativas utilizando sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* (incubação albumina na presença de metilglioxal) e investigando as alterações em biomarcadores obtidas após 0, 1, 2, 4 e 8 dias.

3. Material e método

3.1. Sistema modelo de glicação proteica *in vitro*

O experimento com o sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* foi conduzido de acordo com Rodrigues *et al.* (2023), com adaptações. A incubação de albumina sérica bovina (BSA, 10 mg/mL) ocorreu em tubos de vidro de 10 mL com rosca externa, na presença de metilglioxal (MGO, 2 mM), em um tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), contendo 0,02% de azida sódica e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), à 37°C (estufa incubadora de CO₂, P Selecta®) por 8 dias. Essas incubações foram conduzidas na presença ou na ausência de diferentes concentrações de ácido alfa lipóico (AAL, 0,5, 1 e 2 µg/mL) ou de aminoguanidina (AG, 1 mM; agente protótipo anti-AGE). O bioativo utilizado foi AAL sintetizado da sigma-aldrich com pureza de ≥ 98.0%.

As condições de incubação foram conduzidas em triplicata, onde cada replicata teve um volume final de 7000 µL, o qual foi obtido à partir da mistura de 5000 µL da solução de trabalho de BSA (14 mg/mL), 850 µL de MGO (1,5 M), 600 µL do principal inibidor AG (5 mM), 200 µL de azida sódica (0,7%), 350 µL de DMSO puro e por fim, 350 µL de amostra de AAL (10 µg/mL), 350 µL de amostra de AAL (20 µg/mL) ou 350 µL de amostra de AAL (40 µg/mL). Tampão fosfato de sódio foi utilizado para completar o volume desejado (Quadro 01).

Quadro 01. Esquema para a preparação das incubações *in vitro*.

	BSA 14 mg/mL (μ L)	MGO 41,18mM (μ L)	AG 11,67mM (μ L)	Azida sódica 0,7% (μ L)	DMSO (μ L)	AAL 10 μ g/mL (μ L)	AAL 20 μ g/mL (μ L)	AAL 40 μ g/mL (μ L)	Tampão (μ L)	Volume total (μ L)
BSA	5000	-	-	200	350	-	-	-	1450	7000
MGO	-	850	-	200	350	-	-	-	5600	7000
AG	-	-	600	200	350	-	-	-	5850	7000
BSA + MGO	5000	850	-	200	350	-	-	-	600	7000
BSA + AG	5000	-	600	200	350	-	-	-	850	7000
MGO + AG		850	600	200	350	-	-	-	5000	7000
BSA + MGO + AG	5000	850	600	200	350	-	-	-	-	7000
AAL 0,5 μ g/mL	-	-	-	200	-	350	-	-	6450	7000
MG + AAL 0,5 μ g/mL	-	850	-	200	-	350	-	-	5600	7000
BSA + AAL 0,5 μ g/mL	5000	-	-	200	-	350	-	-	1450	7000
BSA + MG + AAL 0,5 μ g/mL	5000	850	-	200	-	350	-	-	600	7000
AAL 1 μ g/mL	-	-	-	200	-	-	350	-	6.450	7000
MG + AAL 1 μ g/mL	-	850	-	200	-	-	350	-	5600	7000
BSA + AAL 1 μ g/mL	5000	-	-	200	-	-	350	-	1450	7000
BSA + MG + AAL 1 μ g/mL	5000	850	-	200	-	-	350	-	600	7000
AAL 2 μ g/mL	-	-	-	200	-	-	-	350	6.450	7000
MG + AAL 2 μ g/mL	-	850	-	200	-	-	-	350	5600	7000
BSA + AAL 2 μ g/mL	5000	-	-	200	-	-	-	350	1450	7000
BSA + MG + AAL 2 μ g/mL	5000	850	-	200	-	-	-	350	600	7000

Fonte: Autoria própria.

Alíquotas das incubações dos dias 0, 1, 2, 4 e 8 foram separadas para a posterior utilização nas análises de formação de AGE fluorescentes e marcadores de oxidação dos resíduos de aminoácidos. Alíquotas foram analisadas em relação aos espectros de absorbância (via espectrofotômetro UV-Vis BioTek®, modelo PowerWave XS2) e de fluorescência após excitação à 355 nm (via espectrofluorímetro de placas, BioTek®, modelo Synergy H1 Hybrid) em intervalo de comprimento de onda de 300 a 500 nm a fim de verificar a existência de possíveis interferências.

3.2. Determinação de AGE fluorescente

AGE fluorescentes foram identificados usando um espectrofluorímetro de placas, modelo Synergy H1 Hybrid da marca BioTek®. Para isso, foram selecionados os comprimentos de onda de excitação de 355 nm e emissão de 430 nm (Séro et al., 2013).

O potencial anti-AGE de AAL foi avaliado comparando a fluorescência média dos AGE gerados na incubação de BSA + MGO com a fluorescência média dos AGE gerados na incubação de BSA + MGO + AAL, em todas as concentrações apresentadas.

Os resultados de AGE foram obtidos através da diferença da fluorescência das incubações que continham AG ou AAL na presença de BSA ou BSA + MGO, e a fluorescência das incubações que não continham proteína junto com AG ou AAL em relação à fluorescência das incubações contendo AG ou AAL na ausência de proteína.

3.3. Determinação de marcadores de oxidação de resíduos dos aminoácidos tirosina e triptofano

Tal como os AGE fluorescentes, os marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos foram monitorados espectrofluorimetricamente, em seus respectivos comprimentos de onda de excitação/emissão: ditirosina (330/415 nm) como marcador de oxidação dos resíduos de tirosina; *N'*-formilquinurenina (325/434 nm) e quinurenina (365/480 nm), como marcadores da oxidação dos resíduos de triptofano (Sadowska-Bartosz *et al.*, 2014).

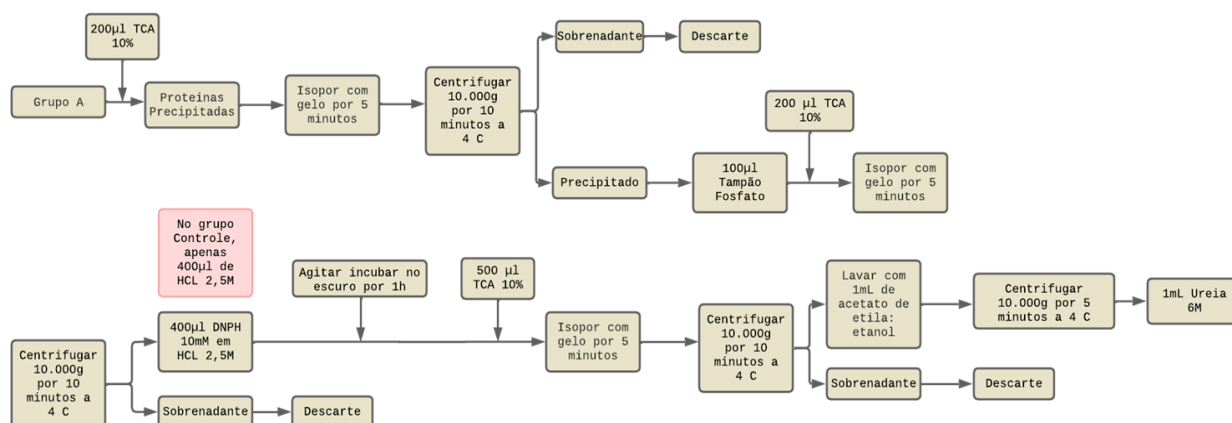
Para tanto, os valores de ditirosina, *N'*-formilquinurenina e quinurenina foram obtidos através da subtração aritmética da fluorescência das incubações contendo AG ou AAL, na presença de BSA + MGO menos a fluorescência das incubações com AG ou AAL na ausência de proteína, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência.

3.4. Quantificação de proteínas carboniladas (PCO)

Os níveis de grupos carbonila foram determinados mediante a reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e a subsequente formação de dinitrofenilhidrazona, cuja absorbância foi monitorada a 370 nm (Levine *et al.*, 1994).

O desenvolvimento da análise ocorreu inicialmente com a adição de 100 μL das amostras das incubações em dois tubos: um destinado a caracterização da amostra (A) e o outro ao grupo controle (C). Em ambos os tubos, foram adicionados 200 μL de ácido tricloroacético (TCA, 10%) para precipitar as proteínas. Após uma breve homogeneização, os micros tubos foram mantidos em gelo por 5 minutos e, em seguida, centrifugados a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados, e os precipitados foram ressuspensos com 100 μL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), seguido pela adição de 200 μL de TCA (10%). Após outra homogeneização, aguardou-se por 5 minutos no gelo e se procedeu a uma nova centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante, 400 μL de DNPH (10 mM) em HCl (2,5 M) foram adicionados aos tubos (A) para reagir com os grupos carbonilas formados nas proteínas, enquanto aos tubos (C) foram adicionados 400 μL de HCl (2,5 M). Ambos foram agitados até que os precipitados estivessem completamente dispersos e, em seguida, foram incubados no escuro por 1 hora. Depois, adicionou-se 500 μL de TCA (10%) a todos os tubos, seguido de agitação, um período de repouso de 5 minutos no gelo e uma nova centrifugação a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Os líquidos sobrenadantes foram descartados, e os pellets foram lavados duas vezes com 1 mL de uma solução de acetato de etila: etanol (1:1), seguido de agitação e nova centrifugação por 5 minutos a 10.000 g a 4°C. Os sólidos formados foram ressuspensos em 1 mL de ureia (6 M), este processo está ilustrado na figura 4. A absorbância dos líquidos sobrenadantes foi medida utilizando espectrofotometria. Por fim, utilizando a diferença de absorbância entre os tubos (A) e (C) de cada amostra, foram calculados os resultados da concentração dos grupos carbonila, utilizando o coeficiente de extinção molar do DNPH ($\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Meeprom *et al.*, 2013).

Figura 04 - Fluxograma do processo para quantificação de proteínas carboniladas



Fonte: Autoria própria.

3.5. Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram expostos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 9 (Versão 9.0.0, GraphPad Software, Inc, EUA). Para avaliar as discrepâncias entre os grupos, empregou-se a análise de variância One-Way (ANOVA) seguida do teste de comparação de Newman-Keuls utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. O critério de significância estabelecido foi de $p < 0,05$, indicando diferenças estatisticamente significantes entre os blocos comparados.

4. Resultados e discussão

4.1. Estimativa de AGE fluorescente na presença do AAL

A utilização do sistema modelo *in vitro* de modificações glico-oxidativas possibilita investigar as etapas do processo de glicação das proteínas, incluindo a reação entre glicose ou compostos dicarbonílicos e grupos amino primários presentes nas cadeias laterais das proteínas. Esses modelos permitem uma análise controlada da geração de produtos finais de glicação avançada (AGE), sendo úteis na avaliação do potencial antiglicação de substâncias e/ou compostos bioativos naturais ou sintéticos, referindo-se a glicação ou inibição na formação dos AGE (HSIA *et al.*, 2013; SIDDIQUI *et al.*, 2016). O sistema com metilglioxal (MGO) é utilizado para estudar uma forma de glicação específica, causada por esse composto dicarbonílico, uma vez que o MGO é um dos principais precursores de AGE (Schalkwijk *et al.*, 2020).

O MGO é o agente de glicação mais potente para humanos. Acredita-se que níveis elevados de glicose desempenham um papel primário na glicação não enzimática de proteínas, lipídeos e DNA, gerando um grupo heterogêneo de moléculas (AGE). A formação dos AGE é acelerada principalmente pela ação dos metabólitos da glicose, na qual o MGO é gerado de forma significativa, sendo mais reativo do que a glicose frente a glicação, pois tem a capacidade de gerar adutos de glicação de maneira rápida em proteínas celulares e extracelulares, lipídeos e DNA, com o potencial de alterar significativamente suas funções (Schalkwijk *et al.*, 2020).

O potencial antiglicação de compostos bioativos naturais e/ou sintéticos, como o que foi avaliado no nosso estudo com o bioativo AAL, de acordo com a literatura, pode ocorrer através da desaceleração da glicação relacionada às doenças, tal como o DM. (Kishi *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 2017).

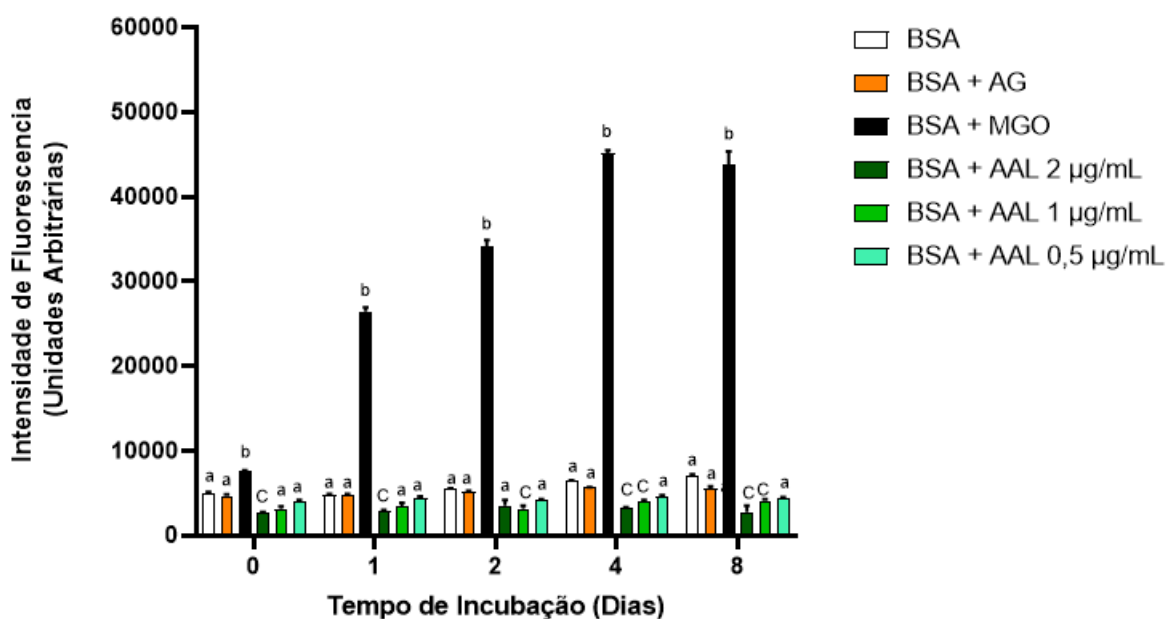
O bioativo AAL foi escolhido devido ao seu potencial terapêutico em relação ao DM, o qual foi relatado em estudos prévios. O AAL pode desempenhar atividade antiglicação através de mecanismos envolvidos no aumento na velocidade de captação de glicose em tecidos que irão oxidar esse monossacarídeo, em especial músculos esqueléticos, resultando assim em uma inibição e/ou redução na formação

de AGE em tecidos que captariam essa glicose de maneira independente de insulina (rins, nervos, retina, endotélio vascular) e sofreriam com as consequências do estresse glicativo (Barreiros *et al.*, 2005; Kishi *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 2017).

Arasteh *et al.* (2014) descrevem que a albumina sérica humana (HSA) desempenha várias funções vitais, incluindo transporte de hormônios, ácidos graxos e outros, além de desempenhar um importante papel na manutenção da pressão osmótica do sangue. A capacidade de interação da HSA com a glicose é de aproximadamente dez vezes maior do que a capacidade da hemoglobina. Logo, nos sistemas-modelo *in vitro* de glicação proteica, a albumina sérica bovina (BSA) é escolhida devido à sua similaridade com HSA.

Durante o experimento conduzido no presente estudo, foram realizadas incubações contendo a proteína BSA sem MGO e na presença de concentrações crescentes de AAL (0,5, 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$), onde se observou a ausência de aumento nos níveis de fluorescência dos AGE com o passar dos dias de incubação, porém houve uma queda na fluorescência identificada ao longo dos dias 0, 1, 4 e 8 da maior concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ de AAL, estando abaixo do resultado encontrado da BSA+AG. O comportamento também foi observado com a BSA incubada sozinha, sem MGO e sem AAL (Figura 05), o que demonstra que o AAL não induziu a formação de AGE.

Figura 05 - Efeitos das concentrações de AAL na formação de AGE fluorescentes em condições de incubação de BSA na ausência de metilglioxal.

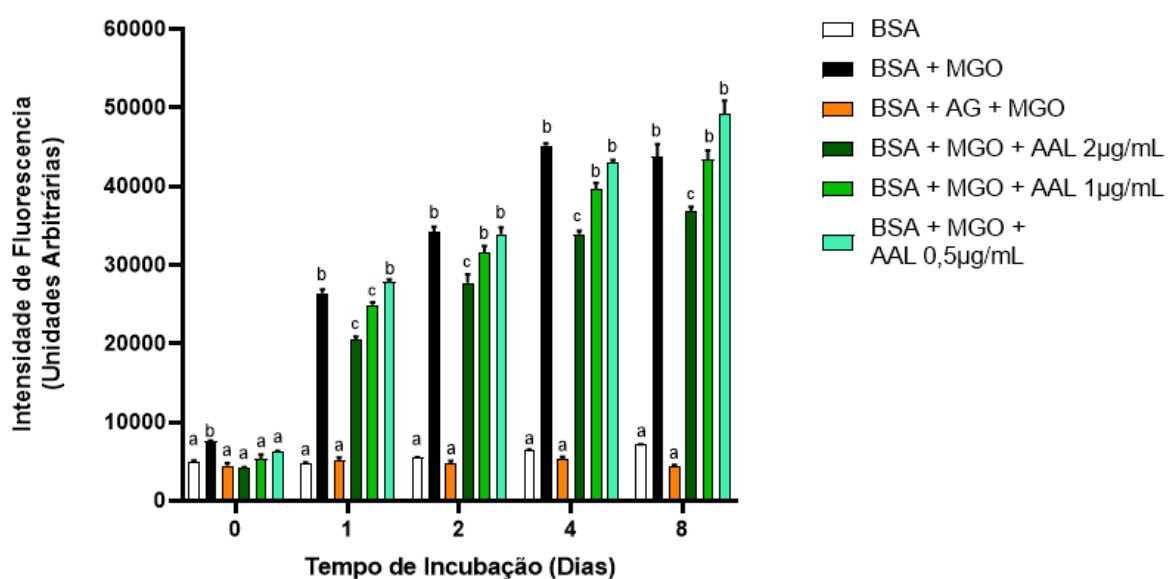


Valores expressos como médias $\pm$ padrão da média (triplicata). Resultados analisados através do teste de variância One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Letras distintas significam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria.

Quanto às incubações relativas à BSA realizada na presença de MGO, nos dias 0, 1, 2, 4 e 8, em contraposição aos resultados das incubações feitas com BSA na ausência de MGO, foram analisados os aumentos das fluorescências relativas aos AGE nos seguintes grupos, em comparação aos valores de AGE observados nas incubações de BSA sozinha: BSA + MGO, BSA + MGO + AG, BSA + MGO + AAL 0,5 µg/mL, BSA + MGO + AAL 1 µg/mL e BSA + MGO + AAL 2 µg/mL (Figura 06).

Figura 06 - Efeitos das concentrações de AAL na formação de AGE fluorescentes em condições de incubação de BSA na presença de metilglioxal.



Valores expressos como médias $\pm$ padrão da média (triplicata). Resultados analisados através do teste de variância One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Letras distintas significam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria.

De acordo com Khalifah et al. (1999), a aminoguanidina (AG) é um inibidor da formação de AGE através do seu potencial em sequestrar os intermediários dicarbonílicos reativos, gerados no curso de sua formação. Por esse motivo, os resultados observados na Figura 05 já eram esperados, pois enquanto BSA + MGO aumentou os níveis de AGE em 1,5 vezes (dia 0), 5,5 vezes (dia 1), 6,2 vezes (dia 2), 7,0 vezes (dia 4) e 6,1 vezes (dia 8) em relação à fluorescência de AGE da BSA isolada, no grupo BSA+AG+MGO, observou-se que a AG diminuiu significativamente a formação de AGE fluorescentes em 40% no dia 0, em 80% no dia 1, em 86% no dia 2, em 88% no dia 4 e em 89% no dia 8, resultando assim na inibição da formação de AGE. Tal como resultado, AG desempenhou um elevado potencial de inibição na

formação de AGE *in vitro*, enquanto apenas em concentrações mais altas foi possível notar a semelhante capacidade anti-AGE do AAL.

Hardik Ghelani *et al.*, (2018) investigaram o efeito protetor do AAL contra a glicação da mioglobina induzida pela glicose e a inibição na formação de AGE *in vitro*. Os resultados mostraram que a incubação de AAL com mioglobina e glicose reduziu significativamente os níveis de frutossamina e a formação de AGE, além de diminuir a liberação de ferro livre da mioglobina. O AAL também protegeu a mioglobina contra danos oxidativos, evidenciado pela redução de grupos carbonilas em proteínas e promoveu aumento de grupos tióis proteicos. Esses achados sugerem que a suplementação com AAL *in vivo* pode ser benéfica na prevenção de complicações diabéticas e cardiovasculares mediadas por AGE.

Outro estudo que investigou os efeitos do AAL (Thirunavikkarasu, 2005); o estudo teve seu foco na prevenção da glicação de proteínas e na melhoria da utilização de glicose em ratos alimentados com altas taxas de frutose, também foram realizados estudos de glicação proteica *in vitro*. Os resultados mostraram que o AAL reduziu significativamente a glicação proteica e a formação de AGE *in vitro*, além de aumentar a utilização de glicose no diafragma dos ratos *in vivo*. Como antioxidante, o AAL inibiu a produção de espécies reativas de oxigênio, desempenhando um papel fundamental na proteção contra danos celulares associados à glicação. Esses achados sugerem que o AAL pode ser uma terapia promissora para o diabetes e suas complicações.

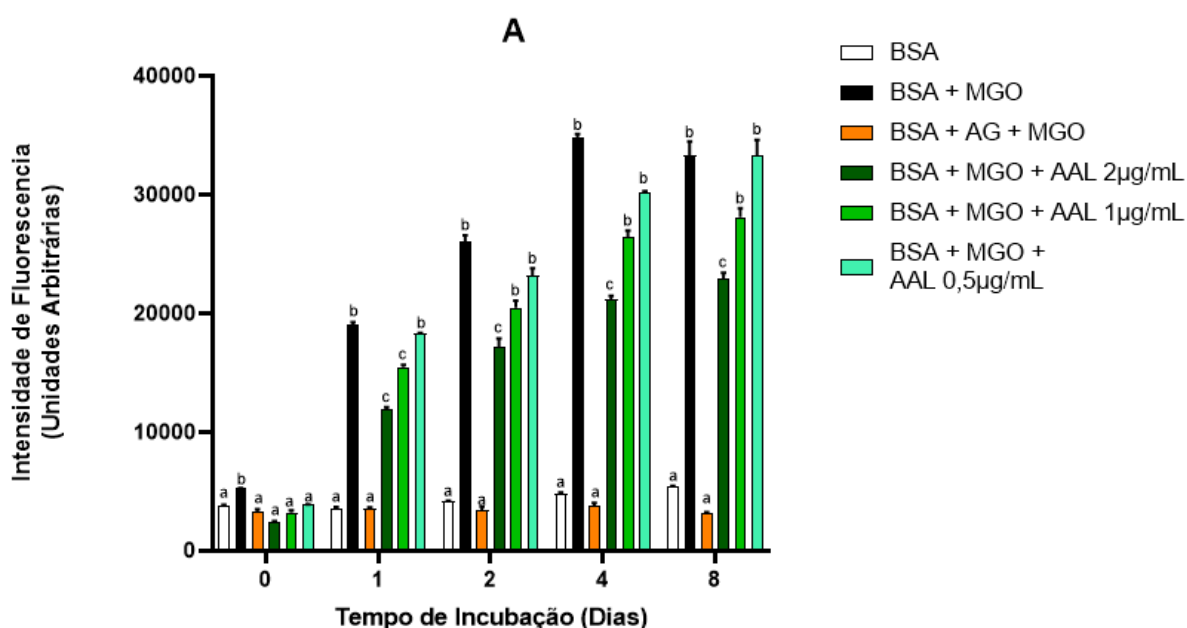
Nota-se que o AAL pode desempenhar sua capacidade anti-AGE mais expressiva em fases que antecedem o processo de glicação proteica, quando submetido a sistemas-modelo onde o agente que promove a glicação é a glicose, ou seja, sua atividade parece se encontrar em momentos do processo de glicação proteica que antecedem a geração do MGO. Isso sugere que o AAL pode interferir nas etapas iniciais da glicação, possivelmente através da sua capacidade antioxidante e de quelante de metais, impedido a formação de intermediários reativos e a subsequente formação de AGE (Fournet *et al.*, 2018)

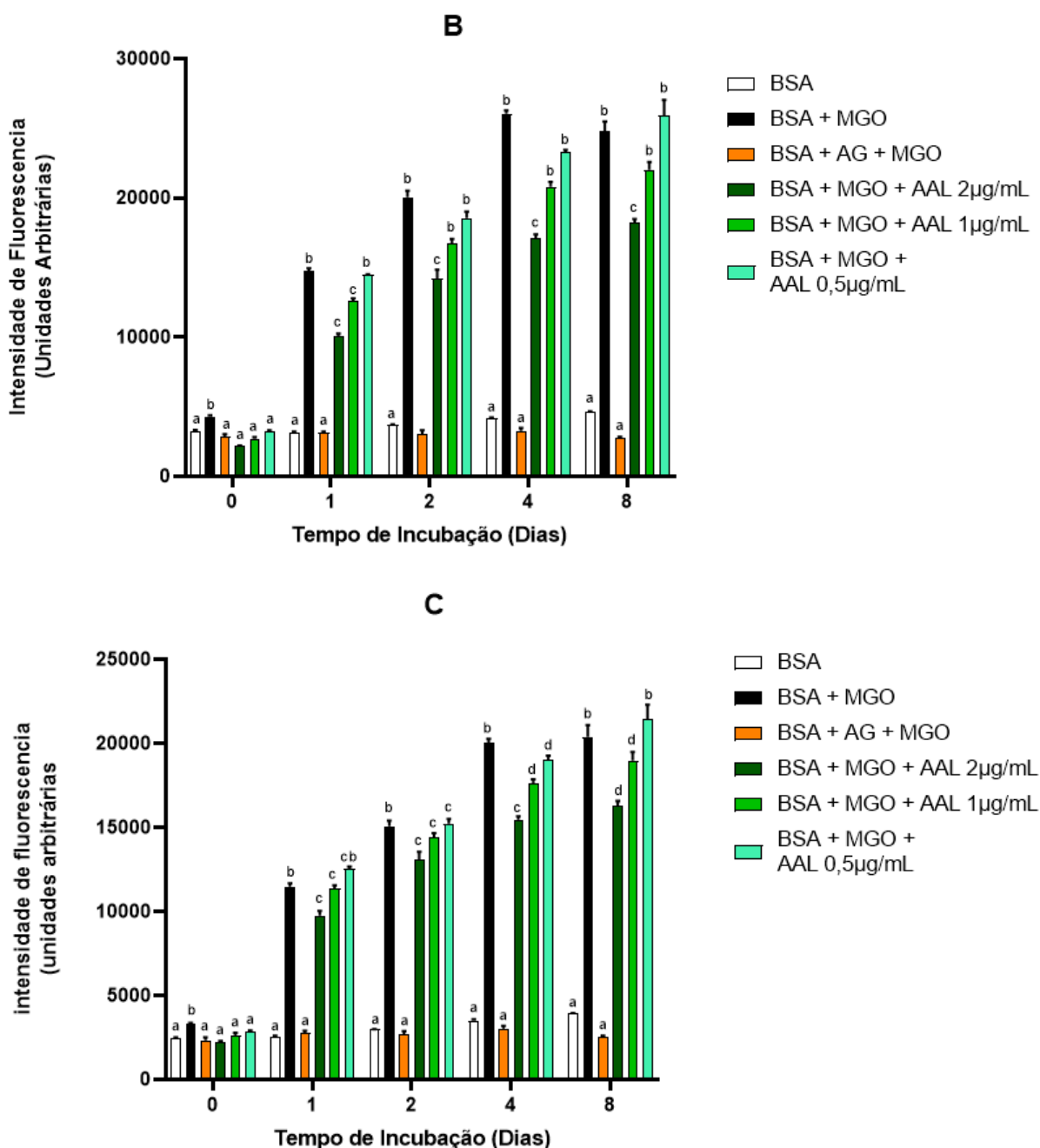
Para avaliar as modificações oxidativas dos resíduos de aminoácidos de tirosina e triptofano, este estudo realizou o monitoramento das intensidades de fluorescência dos produtos ditirosina, *N'*-formilquinurenina e quinurenina, podendo ser observados na Figura 06. Segundo Meeprom *et al.* (2013), como a glicação proteica estimula os danos oxidativos, fazendo com que o cenário de condições fisiológicas

normais de oxidação dos resíduos de aminoácidos em proteínas se torne mais acelerado em indivíduos diabéticos, se faz necessário avaliar estas alterações oxidativas dos resíduos de aminoácidos através de um monitoramento contínuo.

Contudo, no decorrer dos 8 dias analisados, os marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos demonstraram um perfil semelhante ao apresentado na fluorescência dos AGE, diferenciando-se apenas nas incubações com BSA + MGO + AAL 0,5 µg/mL, onde se observou um aumento na fluorescência. Com os resultados encontrados a partir do dia 1, o MGO mostrou uma indução no aumento da fluorescência desses marcadores de oxidação dos resíduos de aminoácidos, o qual apresentou uma redução estatisticamente significativa nos tratamentos de BSA + MGO + AAL 2 µg/mL (Figura 07).

Figura 07 - Efeitos das concentrações de AAL na formação de ditirosina (A), *N'*-formilquinurenina (B), quinurenina (C).





Valores expressos como médias $\pm$ padrão da média (triplicata). Resultados analisados através do teste de variância One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Letras distintas significam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria.

Votano *et al.* (2021), abordaram a formação de radicais livres no organismo e seu papel no estresse oxidativo, associado a diversas doenças crônicas. O AAL é destacado por seus efeitos antioxidantes e atividade antidiabética. O estudo buscou analisar detalhadamente os mecanismos pelos quais o AAL exerceu esses efeitos, com base em revisão bibliográfica. Os resultados indicaram que o AAL neutraliza os

radicais livres e melhora a ação de antioxidantes endógenos, além de reduzir a resistência à insulina. Embora não seja um medicamento, sua integração pode ser benéfica para o bem-estar do organismo.

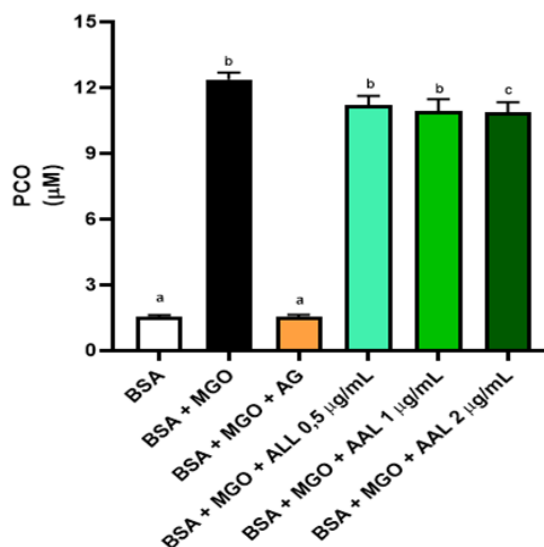
Em adição a investigação dos parâmetros de estresse oxidativo, Zonooz *et al.* (2021), realizaram estudos com foco na suplementação com AAL, na qual demonstraram que o ALA reduziu significativamente os níveis de malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica, em comparação com o grupo controle. Não houve efeito significativo da suplementação com AAL em outras enzimas antioxidantes ou parâmetros de estresse oxidativo. Assim, observa-se que a suplementação com AAL, especialmente em doses inferiores a 800 mg/dia, pode ser uma opção eficaz para controlar a peroxidação lipídica.

4.2. Marcadores de proteínas carboniladas

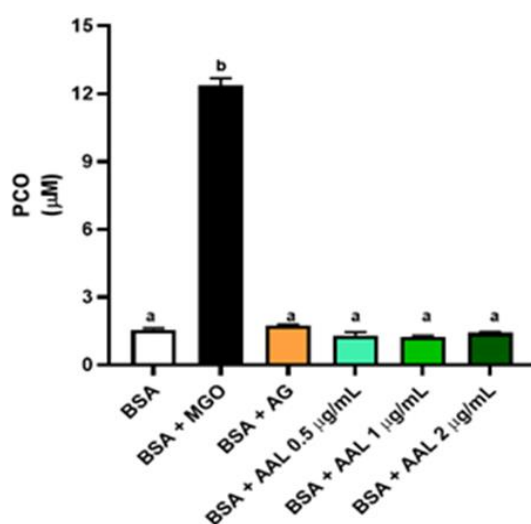
Os grupos carbonilas presentes nas proteínas reagem com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando derivados de 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP), os quais podem ser monitorados espectrofotometricamente em 370 nm (Figura 08), sendo capaz de determinar e quantificar proteínas carboniladas (PCO), fornecendo uma medida de estresse oxidativo e da oxidação de proteínas (Halliwell, 1999).

Figura 08 - Efeitos das concentrações de AAL nos níveis de proteínas carboniladas após 8 dias de incubação na presença (A) e ausência (B) de metilglioxal.

A



B



Valores expressos como médias $\pm$ padrão da média (triplicata). Resultados analisados através do teste de variância One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Letras distintas significam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria.

Os experimentos conduzidos no presente estudo demonstraram que incubações contendo BSA e BSA + MGO + AG apresentaram o mesmo nível de proteínas carboniladas, reafirmando assim o potencial de inibição da aminoguanidina na formação de PCO (Figura 8A) (Colzani *et al.*, 2016).

Quanto as seguintes condições de incubação: BSA + MGO + AAL 0,5 µg/mL e BSA + MGO + AAL 1 µg/mL, estas resultaram em níveis iguais de PCO quando comparadas à condição BSA + MGO (Figura 8A), indicando baixa eficiência destas concentrações em relação à prevenção da oxidação das proteínas. Sendo assim, para melhor constatação da eficácia de AAL em relação à proteção contra a oxidação das proteínas, outros estudos devem ser realizados.

De acordo com alguns dados na literatura, a eficiência dos triterpenos em relação a inibição da formação dos AGE ocorre devido à interação com macromoléculas envolvidas no processo de glicação, através da modulação da atividade e/ou expressão de enzimas, inibindo a formação dos AGE, ou até mesmo pela capacidade de eliminar radicais livres (Sudhahar *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010; Jang *et al.*, 2010; Yin, 2012). No presente estudo, observou-se que, após 8 dias de incubação, as três concentrações de AAL avaliadas mantiveram níveis de PCO semelhantes à condição de BSA isolada (Figura 08B), quando incubadas com a proteína na ausência de MGO, sugerindo que o AAL não desencadeia reações que resultam na formação das proteínas carboniladas. Dessa forma, indo ao encontro dos experimentos anteriores, obtém-se como hipótese que o AAL sozinho não induz processos glicativos, porém ele também não exibiu um significativo potencial antiglicação nos parâmetros avaliados, sendo necessário mais estudos para melhor avaliá-lo.

5. Conclusão

O sistema-modelo de glicação *in vitro*, adotado no Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas, possibilitou simular reações envolvidas no estresse glico-oxidativo e, ao mesmo tempo, avaliar o potencial antiglicação de AAL, onde se constatou que este bioativo não promove a geração de AGE fluorescentes e de danos oxidativos, não sendo uma substância prejudicial à estrutura de biomacromoléculas.

Contudo, o AAL apresentou uma baixa capacidade protetora contra as agressões glico-oxidativas promovidas pelo MGO presente no meio reacional nas condições testadas no sistema-modelo de glicação *in vitro* conduzido com BSA.

Sendo assim, concluiu-se que, apesar da literatura indicar que AAL tenha um potencial terapêutico eficaz aplicado ao DM, esse potencial pode ser uma consequência de ações sobre vias que provavelmente não envolvem de forma direta e indireta a glicação de estruturas proteicas por compostos dicarbonílicos altamente reativos.

Referências

- ABBAS, G. et al. Antiglycation therapy: Discovery of promising antiglycation agentes for the management of diabetic complications. **Pharmaceutical Biology**, p. 1-9, 2015.
- AHLQVIST, E. et al. Novels subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 6, p.361-369, 2018.
- AHMED, N. Advanced glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 67, p.3-21, 2005.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Padrões de atendimento médico em diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, p.S14-S80, 2014.
- AMES, J. M. The Maillard reaction. In: HUDSON, B. J. F. (ed.). **Biochemistry of food proteins**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 99-153.
- ARASTEH, A. Glycated albumin: An overview of the *In Vitro* models of an *In Vivo* potential disease marker. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 13, p. 49 – 58, 2014.
- BALASUBRAMANIAN, D; KANWAR, R. Molecular pathology of dytyrosine cross-links in proteins: structural and functional analysis of four proteins. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.234, p. 27-38, 2002.
- BARBOSA, J. H. P; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivo Brasileiro Endocrinolia Metabolismo**, v. 52, p. 940-950, 2008.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629 – 643, 2010.
- BARREIROS, R. C; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C. E. P. Fructose in humans: metabolic effects, clinical utilization, and associated inherent errors. **Rev. Nutr.** v. 18, suppl. v3, p. 377-389, 2005.
- BASHAN, N. et al. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. **Physiological Reviews**, v. 89, p.27 – 71, 2009.
- BROWNLEE, M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. **Annual Review of Medicine**, v.46, p.223-34, 1995.
- BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechnism. **Diabetes**, v. 54, p.1615 – 1625, 2005.

COLZANI, M; et al. Method to produce fully characterized ubiquitin covalently modified by 4-hydroxy-nonenal, glyoxal, methylglyoxal, and malondialdehyde. **Free Radical Research**, p. 328-336, 2016.

CURE, E; CUMHUR, M. C. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers may be harmful in patients with diabetes during COVID-19 pandemic. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v.14, p. 349 – 350, 2020.

FOURNET, M; BONTÉ, F; DESMOULIERE, A; Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. **Aging Dis. Free Radical Research**, 2018.

GALASSETTI, P. Inflammation and oxidative stress in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. **Experimental Diabetes Research**, v.2012, p.2, 2012.

GIARDINO, I; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M. Nonenzymatic glycosylation *in vitro* and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. **Journal Clinical Invest**, v. 94, p. 110-117, 1994.

GORACA, A. et al. Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. **Pharmacological Reports**, v.63, p. 849-858, 2011.

HALLIWELL, B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). **Free Radical Research**, v. 31, p. 261 – 272, 1999.

HSIA, S. et al. Capsaicin, an active ingredient from chillipeppers, attenuates glycation stress and restores sRAGE levels in diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 406 – 417, 2016.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Journal of Diabetes**, v. 10, p.353 – 356, 2018.

JANG, H. Y. et al. Capsicum annum L. Methanolic extract inhibits ovalbumin-induced airway inflammation and oxidative stress in a mouse model of asthma. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 1144 – 1151, 2011.

KAGAN, V.E. et al. Mitochondrial targeting of electron scavenging antioxidants: Regulation of selective oxidation vs random chain reactions. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.61, n.14, p.1375-1385, 2009.

KHALIFAH, R. G.; BAYNES, J. W.; HUDSON, B. G. Amadorins: Novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.257, p. 251 -258, 1999.

KISHI, Y. et al. Ácido alfa lipóico: efeito na captação de glicose, via do sorbitol e metabolismo energético na neuropatia diabética experimental. **Diabetes**. 1999; 48 :2045–2051.

LESLIE, R. D. et al. Adult-onset type 1 diabetes: Current understanding and challenges. **Diabetes Care**, v. 44, p. 2449 – 2456, 2021.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 346-357, 1994.

MEEPROM, A. et al. Isoferulic acid, a new anti-glycation agent, inhibits fructose and glucose-mediated protein glycation in vitro. **Molecules**, v. 18, p. 6439 – 6454, 2013.

MOLDOGAZIEVA, N. T. et al. Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, v.2019, p. 2 - 14, 2019.

PASQUEL, F, J. et al. Management of diabetes and hyperglycaemia in the hospital. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v.9, p.174-88, 2021.

PERDIVARA, I. et al. Mass spectrometric identification of oxidative modifications of tryptophan residues in proteins: chemical artifact or post-translational modification? **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1114 -1117, 2010.

RAHAL, A. et al. Oxidative stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research Internacional**, v.2014, p.1-19, 2014.

RIBEIRO, L. et al. Técnica de indicador de oxidação de aminoácidos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 973-982, out./dez. 2008.

ROCHETTE, L. et al. Ácido alfa lipóico: mecanismos moleculares e potencial terapêutico na diabetes. **Jornal Canadense de Fisiologia e Farmacologia**, v.93, p.1021-1027, 2015.

RODRIGUES, W. D. et al. In vitro antiglycation potential of Erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.). **Antioxidants**, v. 12, p. 522, 2023.

ROONEY, M. R. et al. Global prevalence of prediabetes. **Diabetes Care**, v.46, p.1388-1394, 2023.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; GALINIAK, S.; BARTOSZ, G. Kinetics of glycoxidation of bovine serum albumin by glucose, fructose and ribose and its prevention by food components. **Molecules**, v.19, p. 18829 – 18849, 2014.

SALEHI, B. et al. Insights on the use of α -Lipoic acid for therapeutic purposes. **Biomolecules**, v. 9, p. 356, 2019.

SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. A. Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases. **Physiological Reviews**, v. 100, p. 407 – 461, 2020.

SÉRO, L.; et al. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify age inhibitors in crude plant extracts. **Molecules**, v.18, p. 14320 – 14339, 2013.

SIDDIQUI, M. A. et al. In vitro dual inhibition of protein glycation, and oxidation by some Arabian plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 1 – 10, 2016.

SILER, A. F. et al. Running Title: Challenges in Diagnosis of Pediatric Diabetes. **Diabetes Technology Ther.**, v. 21, p.66-72, 2019.

SILVA, C.; GUIRRO-SILVA, C.; GUIRRO R. Efeito da metformina e do ácido lipóico nas reservas de glicogênio de músculos denervados e de ratos diabéticos. **Medicina**, Ribeirão Preto, 33: 490-498, out./dez, 2000.

SIMÕES, S. M. Biomarcadores de stress oxidativo. 2017. Tese (Mestrado). Instituto superior de ciências da saúde Egas Moniz, Portugal.

SOUZA, D. B. G. B. et al. Ácido alfa lipóico em diabetes *mellitus*. **RRS – FESGO**, v. 04, p. 88 – 93, 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019-2020**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diabetes: **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2023. São Paulo: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2023.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; VARALAKSHMI, P. Role of lupeol linoleate on lipemic – oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. **Life Sciences**, v. 78, p. 1329 – 1335, 2006.

TAN, B.L.; NORHAIZAN, M.E. Carotenoids: How Effective Are They to Prevent Age Related Diseases? **Molecules**, v.24, n.9, p.1801, 2019.

THIRUNAVIKKARASU, V.; ANITHA, A. T.; ANURADHA C. V. Lipoic acid improves glucose utilisation and prevents protein glycation and AGE formation. **Pharmazie**. PMID: 16259126, 2005.

UCHIDA R. et al. Enantioselective Pharmacokinetics of α -Lipoic acid in rats. **Int J Mol Sci** 2015; 16: 22781-22784, 2015.

VIOLI, F. et al. Should antioxidant status be considered in interventional trials with antioxidants? **Heart**, v. 90, p. 598 – 602, 2004.

VLASSARA, H.; PALACE, M. R. Diabetes and advanced glycation endproducts. **Journal of Internal Medicine**, v. 251, p. 87-101, 2002.

VOTANO, A. et al. Importance of Alpha Lipoic Acid (ALA): Antidiabetic and Antioxidant Effects. **Frontiers in Medical Case Reports**, 2021.

WANG, Z. H. et al. Anti-glycative effects of oleanolic acid and ursolic acid in kidney of diabetic mice. **European Journal Pharmacology**, v.628, p. 255 – 260, 2010.

WORD HEALTH STATISTICS. Estatísticas mundiais de saúde 2019: monitorização da saúde para os ODS, objetivos de desenvolvimento sustentável. **World Health Organization**, 2019.

YAMAGISHI, S. I.; TAKEUCHI, M.; MAKITA, Z. Advanced Glycation End Products and the **Pathogenesis of Diabetic Nephropathy**, v.134, p.30-35, 2001.

YEH, W. et al. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. **Journal of food and drug analysis**, 2017.

YIN, M. Anti-glycative potential of triterpenes: A mini review. **BioMedicine**, v.2, p. 2 – 9, 2012.

YUN, J. S.; KO, S. H. Current trends in epidemiology of cardiovascular disease and cardiovascular risk management in type 2 diabetes. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 123, p.154-938, 2021.

ZIEMAN, S. J.; KASS, D. A. Advanced glycation end product crosslinking in the cardiovascular system. **Springer Link**, v. 64, p. 459-470, 2004.

ZONOOZ, S. et al. Effect of alpha-lipoic acid on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis. **Journal Of Functional Foods**, v.87, 2021.

ANEXO A - Espectro de absorvância controle e nas concentrações de AAL 2 $\mu\text{g/mL}$ (gráfico 1), AAL 1 $\mu\text{g/mL}$ (gráfico 2), AAL 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (gráfico 3), registradas no dia 8 com metilglioxal e/ou BSA. Intensidade de fluorescência X comprimento de onda.

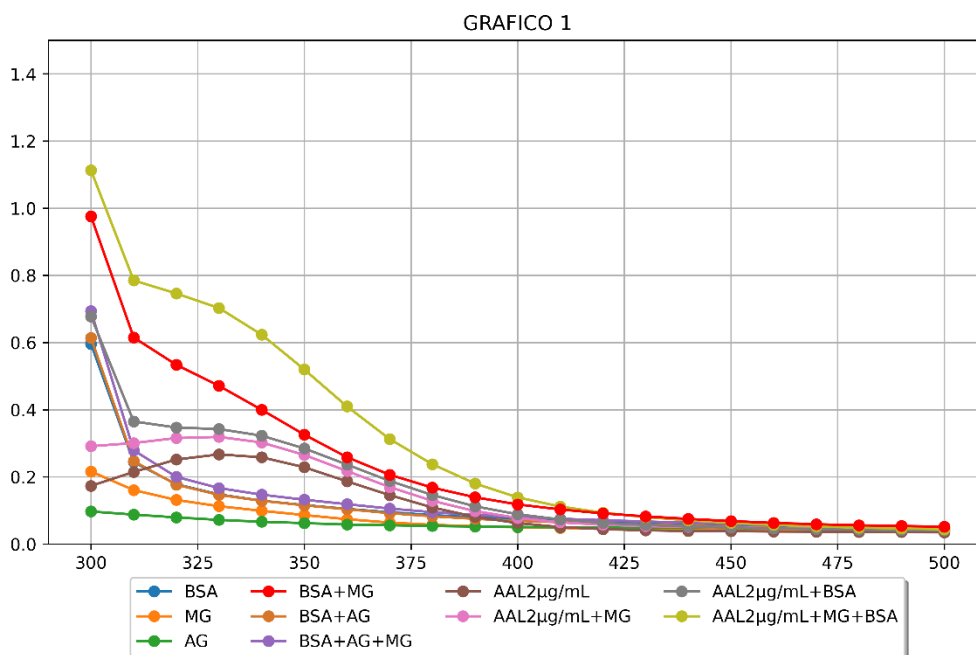
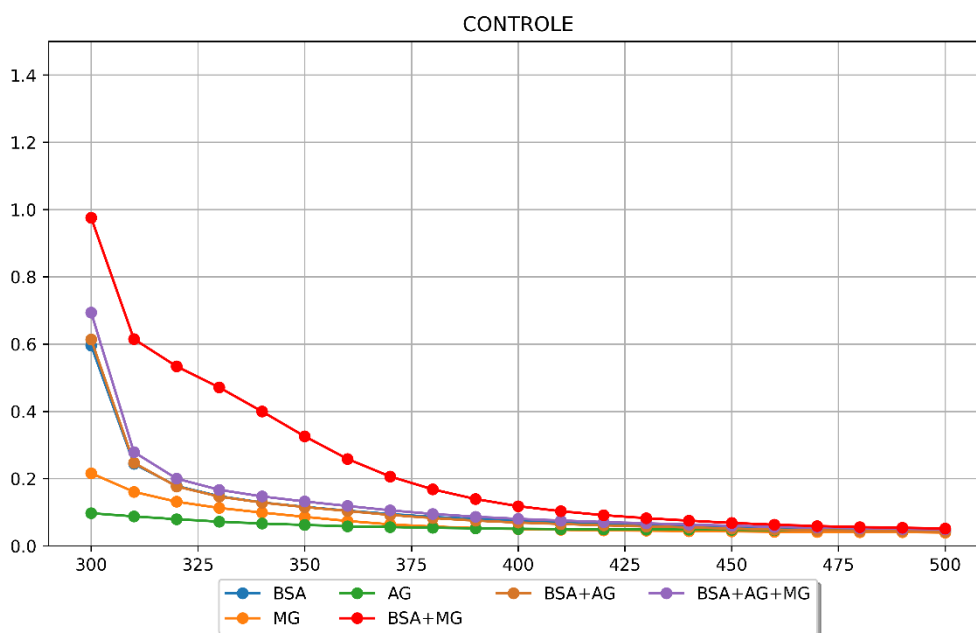


GRAFICO 2

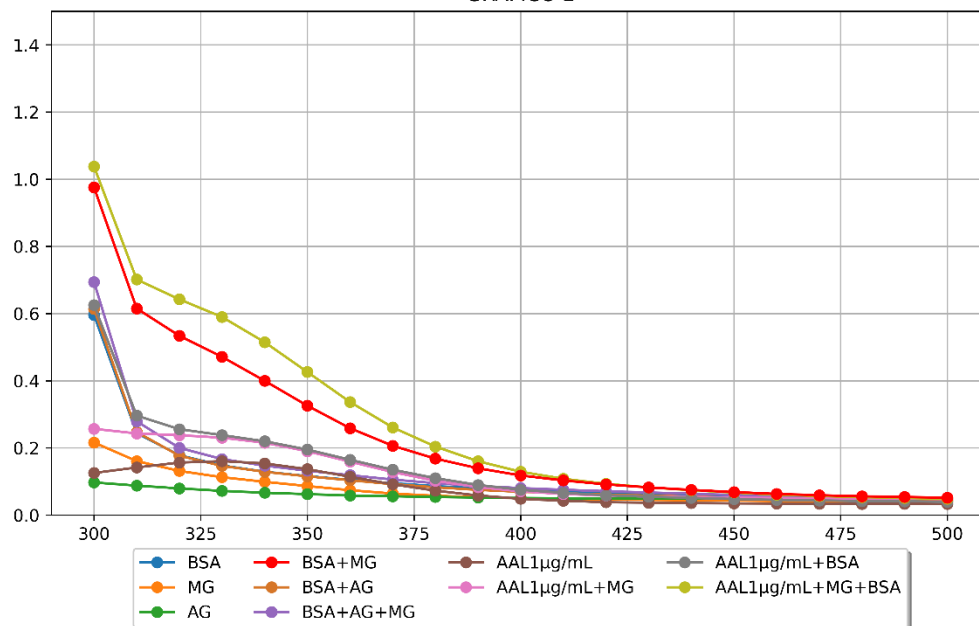
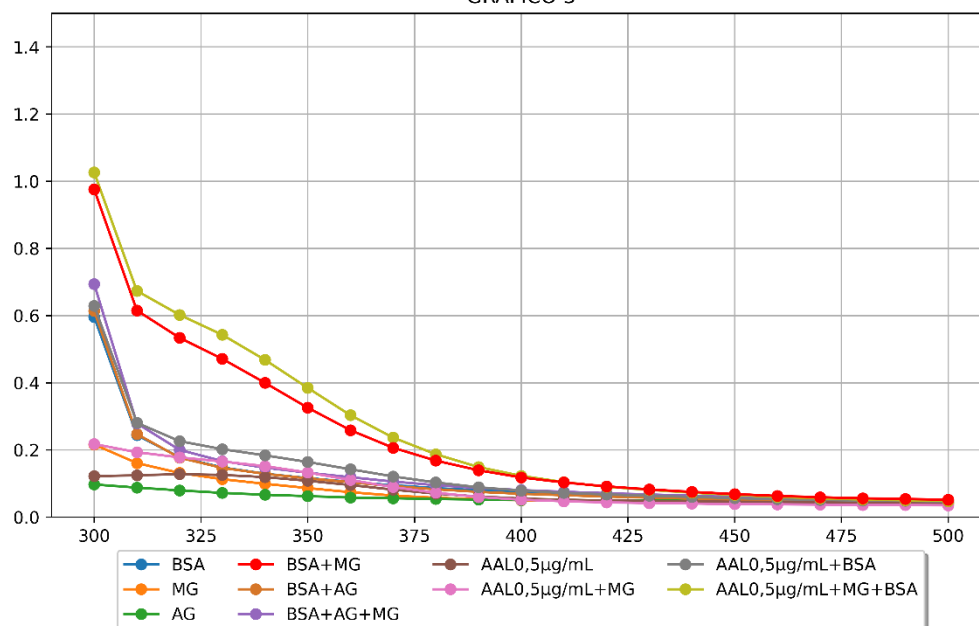
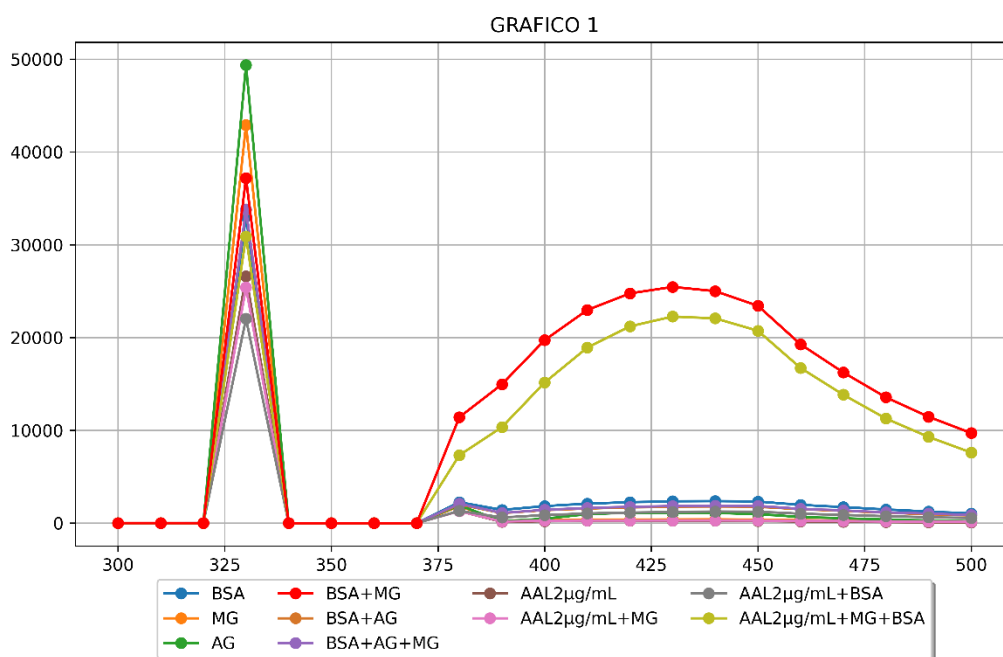
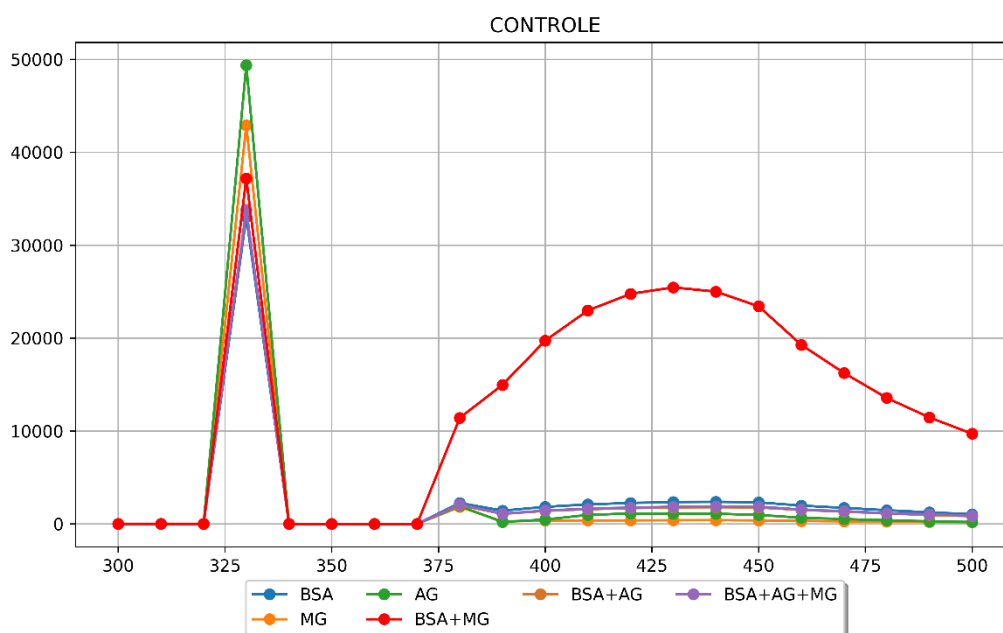


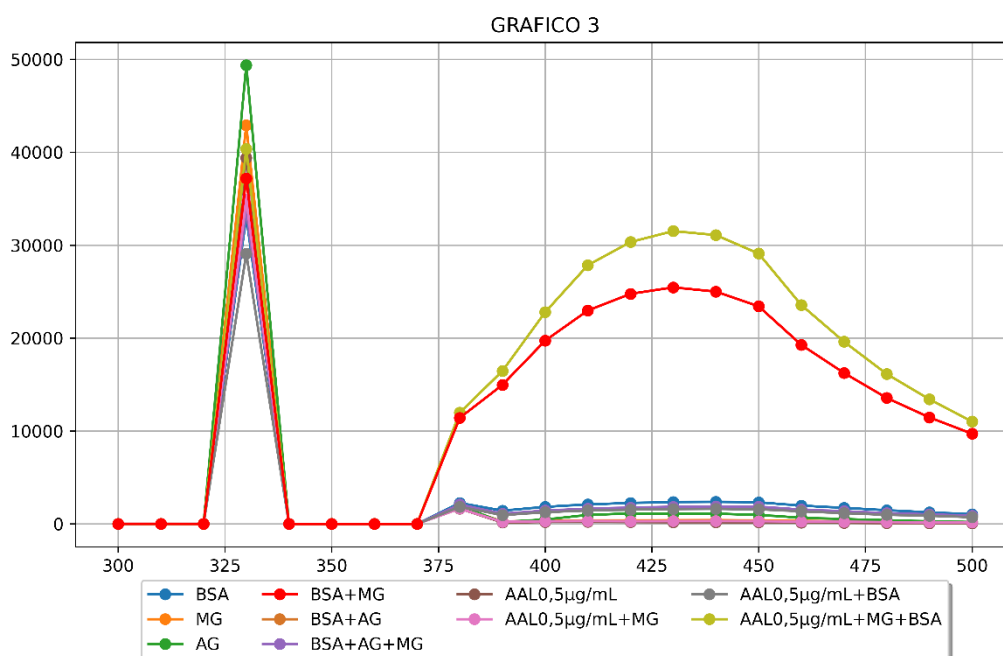
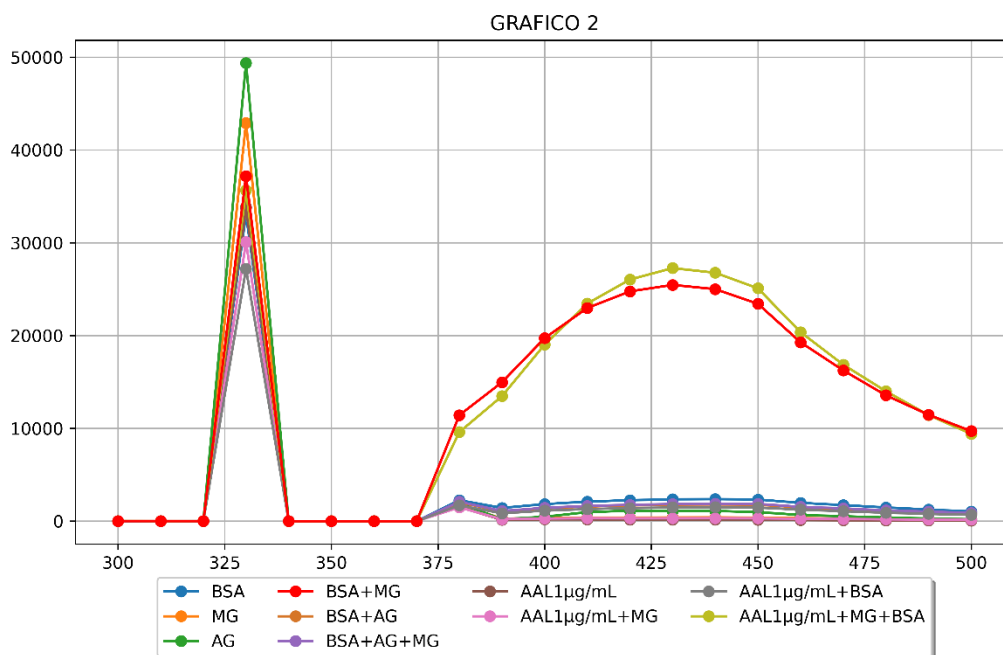
GRAFICO 3



Fonte: Autoria própria.

ANEXO B - Espectro de emissão controle e nas concentrações de AAL 2 $\mu\text{g/mL}$ (gráfico 1), AAL 1 $\mu\text{g/mL}$ (gráfico 2), AAL 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (gráfico 3) registradas no dia 8 na presença de metilglioxal e/ou BSA. Intensidade de fluorescência X comprimento de onda.





Fonte: Autoria própria.