



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

BEATRICE MORCELI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIGLIFICAÇÃO DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DOS FRUTOS DA PIMENTA
Capsicum chinense* Jacq. VIA SISTEMAS-MODELO *in vitro

Araraquara, SP

2022

BEATRICE MORCELI

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIGLIFICAÇÃO DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO DOS FRUTOS DA PIMENTA
Capsicum chinense Jacq. VIA SISTEMAS-MODELO *in vitro***

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

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara, SP

2022

Agradecimentos

Aconteceu, um pequeno passo, mas tão significativo para mim;

Gratidão a quem me ilumina todos os dias, me dando forças, proteção e bençãos, Deus, o meu guia;

Gratidão as minhas inspirações eternas, meus pais, Marcos e Soraia, que não medem esforços, colo, conselhos, e tudo o que podem para que eu estivesse aqui hoje;

Gratidão à minha luz, minha metade, Giulia Morceli, que está sempre ao meu lado, minha irmã, meu apoio em todos os momentos, minha calma para encarar os momentos difíceis, meu exemplo de força, perseverança e coragem, a personificação de que sim, lugar de mulher é onde ela quiser estar, onde ela sonhar, onde ela conquistar;

Gratidão à Ju Kanashiro, por todo incentivo, compreensão, carinho, apoio, presença em todas as horas, fossem elas felizes ou árduas, mas sempre com um sorriso fazendo tudo ficar bem melhor;

Gratidão aos meus amigos; à “família” AFEF e à Ana Luísa, por ter sido a melhor dupla, dos melhores projetos e com quem aprendi tanto. E obrigada a cada um que conheci durante esses 5 anos, especialmente à Jessica e Gabi, por terem sido a leveza, o apoio, a amizade em todos os dias da graduação e além dela, companheiras da Unesp para a vida;

Gratidão ao Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, pelas conversas, bom-humor, transmissão de seus conhecimentos tão pacientemente a mim e a todos os alunos; dedicação e oportunidade que me concedeu. Sempre levarei comigo toda imensidão que é a Botânica, a natureza com seu potencial extraordinário;

Gratidão ao Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas, que me recebeu, acreditou, e ensinou muito. A Profa. Dra. Amanda Martins Baviera, pela confiança, pelos ensinamentos grandiosos, verdadeiro exemplo de inteligência e humanidade. Levarei sempre comigo as experiências e aprendizados;

Gratidão a Faculdade de Ciências Farmacêuticas e a UNESP, pela oportunidade, excelência em ensino, posição de grandes mestres, e formadora de profissionais e pessoas sensíveis, capazes;

O meu agradecimento à FAPESP, pelo apoio científico e suporte financeiro;

Este Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, é dedicado especialmente ao meu PAI, **Marcos Antonio Morceli**, excepcional Engenheiro Eletricista, minha luz e a razão de eu ter alcançado e conseguido concluir o ensino superior, sua força e dedicação a todo momento pelas filhas. Minha inspiração de inteligência, resiliência, capacidade, bondade, paciência e alegria inigualável. Pra sempre terei orgulho do melhor pai do mundo que sempre foi e continuará sendo eternamente. Obrigada por tudo e sempre!

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós” – Antoine de Saint-Exupéry

Resumo

A manutenção da hiperglicemia por longos períodos é um dos principais fatores responsáveis pelo estresse glico-oxidativo, o qual participa no desenvolvimento das complicações do diabetes mellitus (DM). Cresce o interesse na prospecção por opções terapêuticas complementares às terapias convencionais para o DM que visem o combate ao estresse glico-oxidativo. A espécie de pimenta *Capsicum chinense* Jacq. vem sendo estudada devido as suas propriedades medicinais. Este estudo teve por objetivo investigar as propriedades antioxidantes e antiglicação *in vitro* do extrato hidroetanólico dos frutos de *C. chinense* (CcExt). CcExt foi obtido via moagem dos frutos, extração por maceração (etanol a 70%), rotaevaporação e liofilização. O estudo do potencial antiglicação de CcExt foi realizado via sistema-modelo *in vitro* de modificações glico-oxidativas, incubando-se albumina sérica bovina (BSA) na presença de metilglioxal (8 dias) ou glicose (30 dias); foram conduzidas incubações na presença de aminoguanidina (AG; agente antiglicação) ou CcExt (62,5, 125, 250 µg/mL). Foram analisadas a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGE), níveis dos produtos de oxidação de tirosina (ditirosina) e triptofano (N'-formilquinurenina e a quinurenina), e formação de *cross-linking* proteico. O estudo do potencial antioxidante *in vitro* do extrato foi feito via *bleaching* da crocina e ensaio de captura do ânion radical superóxido. A análise de propriedades químicas foi feita por cromatografia em camada delgada (CCD). O metilglioxal promoveu modificações glico-oxidativas em BSA mais intensas em relação à glicose. O efeito protetor de CcExt foi observado na incubação com ambos os agentes promotores da glicação, diminuindo a formação de AGE fluorescentes, produtos de oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano e formação de *cross-linking*. CcExt protegeu o clareamento da crocina, mostrando sua atividade antioxidante frente a captura de radicais peroxila. A CCD permitiu a otimização das condições de fase móvel em modo normal (sílica gel) de bandas e números de bandas referentes aos metabólitos presentes no extrato. O extrato dos frutos de *C. chinense* apresenta atividades antioxidante e antiglicação em sistemas-modelo *in vitro*, o que torna preparações dessa espécie vegetal uma opção promissora para estudos futuros de terapias complementares para o DM com bioativos naturais, visando a atenuação do estresse glico-oxidativo.

Palavras-chave: glicação proteica; diabetes mellitus; extratos naturais; propriedades terapêuticas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral da reação de glicação proteica com formação dos produtos finais de glicação avançada.	15
Figura 2. Vias de formação e de degradação do metilgloxal.....	19
Figura 3. Estrutura química da crocina.....	26
Figura 4. Reações envolvidas no ensaio de clareamento da crocina. A, representa um antioxidante (amostra).	27
Figura 5. Reação entre a proteína carbonilada e a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH).....	35
Figura 6 Cromatoplasmas do extrato de <i>Capsicum chinense</i> (CcExt) em sílica gel (0,20 mm)	40
Figura 7 Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox.	43
Figura 8 Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com CcExt.....	44
Figura 9 Conversão de hipoxantina a xantina, resultando na produção de ácido úrico	47
Figura 10 Produção de formazana a partir do NBT	48
Figura 11 Estrutura dos flavonóides, como a quercetina.....	49
Figura 12 Representação do perfil de captura do $O_2^{\cdot -}$ pelo Trolox.....	50
Figura 13 Representação do perfil de captura do $O_2^{\cdot -}$ pela Quercetina	50
Figura 14 Intensidade de fluorescência relativa aos AGEs nas incubações de BSA (A) e BSA na presença de glicose (B) na ausência ou presença de AG ou de CcExt.	54
Figura 15 Intensidade de fluorescência relativa aos AGEs nas incubações de BSA (A) e BSA na presença de MGO (B) na ausência ou presença de AG ou de CcExt.	55
Figura 16 Espectro de emissão do CcExt na concentração de 125 μ g/mL, nos tempos 24 horas (A) e 48 horas (B) de incubação.....	59
Figura 17 Intensidade de fluorescência relativa à quinurenina nas incubações de BSA com glicose ou com MGO, na ausência ou presença de AG ou de CcExt.	61

Figura 18 Intensidade de fluorescência relativa à N'-formilquinurena nas incubações de BSA com glicose ou com MGO, na ausência ou presença de AG ou de CcExt.	62
Figura 19 Intensidade de fluorescência relativa à ditirosina nas incubações de BSA com glicose ou com MGO, na ausência ou presença de AG ou de CcExt.	63
Figura 20 Formação de cross-linking proteico nas incubações de BSA com glicose, na ausência ou presença de AG ou de CcExt.....	67
Figura 21 Formação de cross-linking proteico nas incubações de BSA com MGO na ausência ou presença de AG ou de CcExt.....	68
Figura 22 Níveis de proteínas carboniladas nas incubações de BSA (A) e BSA na presença de glicose (B), na ausência ou presença de AG ou de CcExt	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fases móveis utilizadas na Cromatografia em Camada Delgada (CCD), identificadas em grupos de A-F, e proporções dos eluentes que as compõem.	25
Tabela 2 Massas (g) referentes ao processo de obtenção do extrato hidroetanólico dos frutos de Capsicum chinense (CcExt).....	37
Tabela 3 Equação de competição cinética entre CcExt e Trolox (padrão), comparação entre valores de coeficiente angular e EC_{50} , e comparação entre as capacidades de captura do radical peroxila em equivalentes de Trolox.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG – Aminoguanidina

AGEs – Produtos Finais de Glicação Avançada (do inglês *Advanced Glycation End Products*)

AAPH - azocomposto dicloridrato de 2,2'-azobis- (2-metilpropanoamidina)

BSA – Albumina Sérica Bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

CcExt - Extrato hidroetanólico dos frutos da pimenta *Capsicum chinense*

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

DM – Diabetes mellitus

DMSO - dimetilsulfóxido

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina

ERO – Espécies Reativas do Oxigênio

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

Gli – Glicose

HbA1c – Hemoglobina glicada

HOCl – ácido hipocloroso

MGO - Metilglioxal

NADH - nicotinamida adenina dinucleotideo

NBT – Azul de nitrotetrazólio

NO – óxido nítrico

PCO – Proteína Carbonilada

RAGE – Receptor de Produtos Finais de Glicação Avançada (do inglês *Receptor for Advanced Glycation End Products*)

TCA – Ácido Tricloroacético

XO – Xantina oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Diabetes mellitus.....	13
1.2 Glicação Proteica e Produtos Finais de Glicação Avançada.....	14
1.3 Estresse oxidativo no DM, espécies reativas de oxigênio e lipoperoxidação	15
1.4 Agentes promotores da glicação, metilglioxal e glicose	17
1.5 Os antioxidantes, os antiglicantes e as estratégias terapêuticas complementares.....	20
1.6 Pimenta <i>Capsicum chinense</i>	20
1.7 Ácidos Fenólicos	21
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Reagentes utilizados	22
3.2 Obtenção e liofilização do material vegetal e extrato hidroetanólico da pimenta <i>Capsicum chinense</i>	23
3.3 Análise e estudo do potencial antioxidante e propriedades químicas do extrato de <i>Capsicum chinense</i>	24
3.3.1 Análise do extrato de <i>Capsicum chinense</i> por cromatografia em camada delgada (CCD)	24
3.3.2 Estudo do potencial antioxidante do extrato de <i>Capsicum chinense</i> : ensaio de clareamento (<i>bleaching</i>) da crocina.....	26
3.3.3 Estudo do potencial antioxidante do extrato de <i>Capsicum chinense</i> : ensaio de captura do ânion radical superóxido.....	29
3.4 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas proteicas <i>in vitro</i>	30
3.4.1 Proteína albumina sérica bovina incubada na presença de glicose	30
3.4.2 Proteína albumina sérica bovina incubada na presença de metilglioxal	32
3.4.3 Estimativa dos níveis de AGEs fluorescentes.....	32
3.4.4 Estimativa dos níveis dos produtos de oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano	33

3.4.5 Determinação de <i>cross-linking</i> proteico.....	33
3.4.6 Determinação dos níveis de proteínas carboniladas (PCO).....	34
3.5 Análise estatística	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Obtenção do material vegetal e extrato hidroetanólico dos frutos da pimenta <i>Capsicum chinense</i>	36
4.1.1 Rendimento do CcExt.....	37
4.2 Análise do potencial antioxidante e propriedades químicas do extrato de <i>Capsicum chinense</i>	38
4.2.1 Análise do extrato de <i>Capsicum chinense</i> por cromatografia em camada delgada (CCD)	38
4.2.2 Ensaio de clareamento (<i>bleaching</i>) da crocina.....	42
4.2.3 Ensaio de captura do Ânion Superóxido	46
4.3 Estimativa dos níveis de AGEs fluorescentes.....	51
4.4 Estimativa dos níveis dos produtos de oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano	60
4.5 Determinação da formação de <i>cross-linking</i> proteico	65
4.6 Determinação de proteínas carboniladas (PCO)	70
5. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXO.....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica crônica caracterizada por deficiência na produção e secreção de insulina pelas células beta pancreáticas e/ou pela resistência insulínica nos tecidos alvo. Uma de suas principais manifestações é representada pelos elevados níveis de glicose no sangue (hiperglicemia). O DM é uma condição que preocupa os órgãos mundiais de saúde pública devido ao contínuo aumento de sua prevalência e sua incidência. A hiperglicemia crônica, uma característica típica do DM não controlado, contribui para o estabelecimento do estresse glico-oxidativo, o qual participa da promoção das complicações microvasculares e macrovasculares da doença (FOWLER, 2008; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021).

Com base na etiologia da síndrome, o DM pode ser classificado em quatro tipos: DM tipo 1 (geralmente mediado por processo de autoimunidade, causando a destruição das células beta do pâncreas e, conseqüentemente, deficiência total ou absoluta na produção de insulina); DM tipo 2 (resistência tecidual à insulina combinada a prejuízos na produção e secreção de insulina, também conhecida como disfunção pancreática); outros tipos específicos de diabetes mellitus (defeitos genéticos na função das células beta pancreáticas e/ou na ação da insulina), e DM gestacional (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019).

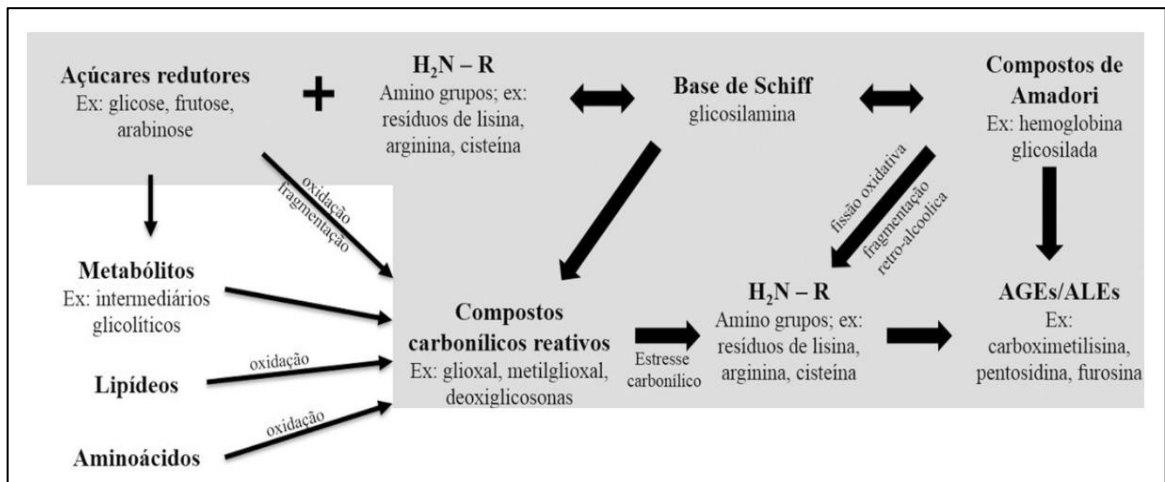
De acordo com Zagury et al (2006), os principais sintomas do DM são: polidipsia, poliúria, polifagia, emagrecimento, visão turva, fadiga. Se não houver um tratamento adequado da doença, há aumento no risco de desenvolvimento das complicações diabéticas, que incluem retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas, bem como as doenças cardiovasculares. Evidências indicam que uma das principais causas das complicações do DM está relacionada à manutenção da hiperglicemia por longos períodos, culminando em estresse glico-oxidativo, o qual contribui para a patogênese das complicações diabéticas (NOWOTNY et al., 2015).

1.2 Glicação Proteica e Produtos Finais de Glicação Avançada

A glicação proteica ocorre via reação não enzimática entre os grupos amino primários das cadeias laterais dos aminoácidos e os grupos carbonila de carboidratos redutores, resultando na formação de bases de Schiff (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009). Uma série de reações subsequentes leva à formação dos produtos finais de glicação avançada (AGE, do inglês *advanced glycation end products*), os quais podem alterar a estrutura das proteínas, prejudicando suas funções biológicas, além de estarem associados ao aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, caracterizando assim um estado de estresse glico-oxidativo que contribui para a promoção de danos aos tecidos no DM.

Em síntese, a glicação proteica envolve três principais etapas: (i) a formação de uma base de Schiff instável e sua rápida conversão em produtos de Amadori (cetoaminas), (ii) a formação de intermediários carbonílicos reativos, e então, (iii) a formação dos AGEs. A glicação tem início com a reação de adição nucleofílica entre um grupo amino primário presente em proteínas, ou até em ácidos nucleicos e lipídeos (cuja oxidação leva a formação de ALEs, do inglês *advanced lipoxidation end products*) e grupos carbonila de carboidratos, formando uma base de Schiff (imina) (etapa reversível). Por ser uma base instável, esta sofre rearranjo espontâneo para uma cetoamina relativamente estável, conhecida como produto de Amadori. Os produtos de Amadori sofrem reações de oxidação e desidratação que podem formar compostos reativos: glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglucosona, conhecidos como compostos dicarbonílicos. Posteriormente, esses compostos dicarbonílicos podem reagir com diversas outras biomoléculas, especialmente proteínas, e os produtos destas reações podem passar por uma série de reações, tais como desidratação, rearranjos, ciclização e oxidação, que levam a formação dos AGEs, que são produtos finais estáveis (Figura 1). Alguns AGEs, tais como vesperlisina A, vesperlisina B, entre outros, são capazes de emitir fluorescência quando excitados, e seus níveis podem ser estimados fluorimetricamente (PENNACHI, 2011; EMEL'YANOV, 2017).

Figura 1. Visão geral da reação de glicação proteica com formação dos produtos finais de glicação avançada.



Fonte: BARBOSA et al., 2016.

Os AGE são gerados em condições fisiológicas normais, porém sua formação é acelerada em indivíduos com hiperglicemia crônica. A glicação, por alterar as estruturas de proteínas e, portanto, suas funções, impacta o funcionamento celular. Essa alteração proteica estrutural e funcional ocorre devido a diversos eventos, incluindo geração exacerbada de espécies reativas de oxigênio, formação de *cross-linking* intra e entre proteínas, ou até a interação dos AGE com seus receptores (RAGE, do inglês *receptor for AGE*). As proteínas glicadas podem formar ligações covalentes cruzadas irreversíveis entre si, estas conhecidas como *cross-linking*, que possuem um importante papel no estabelecimento das complicações do DM (ZIEMAN e KASS, 2004; NEMET et al., 2011).

1.3 Estresse oxidativo no DM, espécies reativas de oxigênio e lipoperoxidação

O oxigênio (O₂) é fundamental à vida humana, no entanto, também pode ser tóxico quando transformado em radical. Através de processos celulares enzimáticos e não enzimáticos, o O₂ pode receber um elétron, formando as espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como o ânion radical superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (•OH), sendo este o radical mais lesivo que se conhece,

devido ao fato de que o organismo não apresenta um mecanismo de defesa para sua ação deletéria, portanto, contribuindo para que ocorram inativação de enzimas, danos às proteínas, modificações nas fitas de DNA e lipoperoxidação (LPO) (VASCONCELOS et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio, especialmente $\cdot\text{OH}$, podem ocasionar ataques e consequentemente modificações oxidativas aos ácidos nucleicos, proteínas e outras biomoléculas, tais como os lipídeos, sendo que nestes a reação é denominada peroxidação lipídica, ou LPO. Nesta reação, a etapa inicial conta com a participação de uma espécie reativa, como o $\cdot\text{OH}$, que ao abstrair um átomo de hidrogênio, geralmente de um ácido graxo poli-insaturado, resulta em um elétron desemparelhado no carbono da estrutura. Por rearranjo molecular, o radical sofre estabilização, ocasionando a formação de um dieno conjugado, o qual na presença de oxigênio reage com O_2 formando o radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$). O $\text{ROO}\cdot$ é o responsável pela reação de propagação em cadeia, onde ao reagir com o $\text{H}\cdot$ que compõem moléculas de lipídeos adjacentes, é capaz de o abstrair, fazendo com que o carbono radicalar resultante sofra rearranjos e interação com O_2 , e consequentemente ocorra a formação de outro $\text{ROO}\cdot$ e assim sucessivamente (VASCONCELOS et al., 2007).

No organismo, a LPO pode ocorrer enzimaticamente (ciclo-oxigenases e peroxidases) ou não enzimaticamente (auto-oxidação), como o mecanismo citado anteriormente e que envolve a participação de ERO, e outros radicais livres. Pode ocorrer peroxidação em fosfolipídeos e em lipoproteínas, e estas modificações oxidativas podem ocasionar mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, com risco de ruptura das membranas celulares, resultando em morte celular. As membranas biológicas, compostas de bicamadas de fosfolipídeos, são os principais alvos de ataque dos radicais, sofrem LPO, que uma vez ocorrendo de maneira descontrolada causa perda de sua estrutura e funcionalidade, culminando na etiologia de diversas doenças. Pelas complicações da LPO, tem-se estimulado estudos que abordem a eficácia e mecanismos de ação dos antioxidantes, o que ressalta a importância dos estudos do potencial do extrato de *Capsicum chinense* (CcExt) frente ao $\text{ROO}\cdot$.

Desta forma, a LPO pode apresentar, na presença de substâncias antioxidantes, uma fase final de neutralização dos radicais formados por ação de antioxidantes lipossolúveis (por exemplo, α -tocoferol, β -caroteno) ou pela reação de

radicais lipídicos resultando em produtos que não são radicalares (VASCONCELOS et al., 2007).

Sendo assim, as ERO podem ser bastante prejudiciais para as células, cujos danos podem representar a causa direta de estados patológicos, como o papel determinante de ERO no início e progressão das complicações cardiovasculares associadas ao DM, por exemplo. Somam-se às ERO e seus potenciais deletérios, o ácido hipocloroso (HOCl) e o óxido nítrico (NO), este último pode ligar-se ao oxigênio ou ao $O_2^{\cdot-}$ formando espécies reativas de nitrogênio (ERN). Portanto, o estresse oxidativo ocorre quando a velocidade de produção de ERO e ERN ultrapassa a velocidade de remoção destes pelos mecanismos de defesa celular, que incluem várias enzimas antioxidantes, bem como os antioxidantes não enzimáticos, tais como vitaminas C e E e os flavonoides vegetais (SMITH et al., 2007).

1.4 Agentes promotores da glicação, metilglioxal e glicose

Os mecanismos de formação de AGE incluem a via de estresse carbonílico, na qual a oxidação de lipídeos ou de açúcares, incluindo a glicose, gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos. Subprodutos gerados a partir de intermediários da glicólise e a autooxidação de glicose, por exemplo, produzem metilglioxal e glioxal, os quais interagem com aminoácidos para formar AGEs (BARBOSA, 2008).

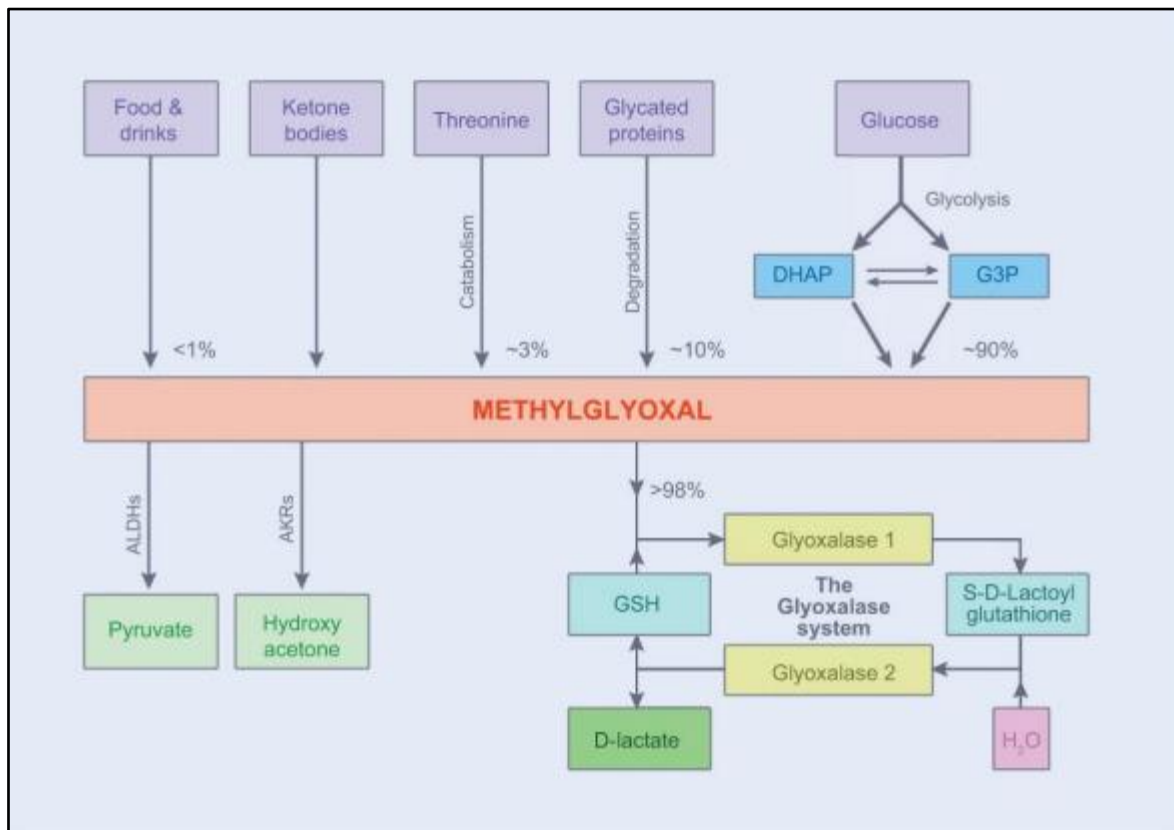
O metilglioxal (MGO) é um composto dicarbonílico advindo do metabolismo da glicose, surgindo como um subproduto da via glicolítica. As reações entre proteínas e agentes promotores da glicação, culminando na formação dos AGE, contribuindo assim para disfunção proteica, é mais rapidamente observada na presença de MGO, sendo um agente promotor da glicação muito potente em humanos.

A formação de AGE é resultado da ação de vários metabólitos reativos que têm principalmente a glicose como precursor, sendo o MGO o principal precursor na formação de AGE. Embora a concentração de MGO no plasma seja 25.000 vezes menor do que a da glicose, o MGO é 50.000 vezes mais reativo, em relação à capacidade de glicação de biomoléculas. Assim, o MGO pode promover a geração

muito rápida de adutos advindos da glicação de proteínas intracelulares e extracelulares, lipídeos e DNA, modificando suas funções. O MGO é formado principalmente pela degradação não enzimática das trioses fosfatos, geradas na via glicolítica (gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato), sendo, portanto, um subproduto do metabolismo da glicose (Figura 2). Por ser altamente reativo, o MGO reage principalmente com resíduos de arginina em proteínas, sendo a hidroimidazolona 1 (MG-H1) o principal AGE derivado de MGO (SCHALKWIJK e STEHOUWER, 2020).

Tem sido sugerido que baixos níveis de glioxalase 1 (enzima que participa da detoxificação endógena do MGO) (Figura 2) culmina em elevados níveis deste composto dicarbonílico, causando assim o estresse dicarbonílico, o qual contribui para as diversas complicações observadas na obesidade e no DM, incluindo inflamação, resistência à insulina, nefropatia diabética e complicações cardiovasculares (RABBANI e THORNALLEY, 2019). Existem evidências científicas consideráveis de pesquisas experimentais e pré-clínicas de que o aumento dos níveis intracelulares de MGO, como uma consequência da hiperglicemia crônica, aumenta as chances de desenvolvimento das complicações vasculares do DM, assim como importantes evidências vêm surgindo em relação ao papel do MGO em provocar anormalidades estruturais e funcionais na molécula de insulina, o que pode contribuir no curso do desenvolvimento de resistência insulínica (SCHALKWIJK e STEHOUWER, 2020).

Figura 2. Vias de formação e de degradação do metilglioxal.



Fonte: Adaptado, SCHALKWIJK e STEHOUWER, 2020.

Mesmo que o metilglioxal apresente um potencial mais elevado de glicação de biomoléculas, a glicose representa um agente glicativo de grande importância, o que se deve a maior concentração deste carboidrato no sangue e intracelularmente. (BARREIROS et al., 2005; EMEL'YANOV, 2017).

Um dos produtos mais conhecidos do processo de glicação proteica é a hemoglobina glicada (HbA1c), resultado de ligação entre a hemoglobina A (HbA) e a glicose (carboidrato). A concentração de HbA1c no sangue dependerá dos níveis médios de glicemia e do tempo de vida das hemácias (ANDRIOLO e VIEIRA, 2008; SUMITA e ANDRIOLO, 2006). A análise dos níveis de HbA1c é um dos exames de maior relevância para indivíduos com DM, pois é um importante biomarcador laboratorial para o diagnóstico e monitoramento terapêutico do DM (tipos 1 e 2) e na avaliação de risco das complicações do DM (SUMITA e ANDRIOLO, 2006).

1.5 Os antioxidantes, os antiglicantes e as estratégias terapêuticas complementares

Estudos têm demonstrado os benefícios de terapias combinadas entre agentes antidiabéticos e preparações de origem natural com atividade antidiabética e antioxidante, sendo estas estratégias interessantes na prevenção e/ou atenuação dos efeitos relacionados ao estresse glico-oxidativo. Segundo Bruckbauer et al. (2013), efeitos combinados sinérgicos e/ou aditivos foram observados nas combinações de metformina e ativos naturais, promovendo melhorias na sensibilidade à insulina, verificando-se também em estudos a redução na produção hepática de glicose (WANG et al., 2015).

Atualmente, o combate ao estresse glicativo tem demonstrado ser uma estratégia eficaz para combater o desenvolvimento de doenças. A inibição da glicação pode suprimir a ativação do inflamassoma a fim de diminuir o desenvolvimento de reações inflamatórias. As ações anti-inflamatórias e antioxidantes dos ácidos fenólicos e flavonoides, podem inibir determinadas etapas na geração de AGE, seja por suas propriedades antioxidantes, seja via bloqueio do receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE). Muitos estudos confirmaram que diversas substâncias polifenólicas possuem propriedades antiglicação *in vivo* e *in vitro*. Tem sido demonstrado que uma diminuição na produção de compostos carbonílicos parece ser eficaz na promoção de proteção cardiovascular ou de retardar o desenvolvimento do DM e suas complicações, através da atividade antiglicação de determinados compostos fenólicos (YEH et al., 2017).

1.6 Pimenta *Capsicum chinense*

As pimentas do gênero *Capsicum* estão entre as especiarias mais consumidas, além apresentar uma diversidade de propriedades benéficas. Possuem significativa aplicação na culinária, na indústria alimentícia, na farmacologia e na medicina, com indícios de suas propriedades benéficas no tratamento do DM (CHAVES et al., 2017). As pimentas têm altos valores vitamínicos além de serem fonte de antioxidantes

naturais, tais como vitamina C, carotenoides, vitamina E, vitaminas do complexo B, além de compostos fenólicos (PINTO et al., 2013).

A *Capsicum chinense* Jacq é uma espécie de pimenta do gênero, encontrada em regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. Esta espécie apresenta diferentes cultivares, sendo constituída por diversos metabólitos secundários bioativos, incluindo o alcaloide capsaicina, principal ingrediente pungente das pimentas que está sendo cada vez mais usada como componente ativo em produtos farmacêuticos, por seu potencial em inibir diretamente a reação de glicação proteica (HSIA, 2016). Algumas variedades da espécie *C. chinense* são a pimenta biquinho, de pungência doce e aroma forte, e a pimenta bode, que possui pungência forte; estudos indicam a presença de ações anti-inflamatória e analgésica para ambas as variedades (LEAL, 2012).

1.7 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são caracterizados como compostos antioxidantes presentes em frutas, legumes, café, vinho e pimentas. Sua atividade antioxidante pode ser relacionada a sua lipofilicidade, quando presente, e pela presença de grupos hidroxila no anel aromático, e podem ser divididos em dois grupos: os flavonoides (os quais são ativos na defesa contra ROS) e os não flavonoides (ODJAKOVA, 2012). Existem também estudos com compostos fenólicos de origem vegetal demonstrando a sua eficácia antiglicação (GOVINDARAJ e PILLAI, 2015).

Estes achados despertam o interesse para a realização de estudos do potencial antiglicação e/ou anti-AGEs e antioxidante de preparações vegetais ricas em compostos fenólicos, tal como pimentas do gênero *Capsicum*, via utilização de sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*, o qual permite avançar na compreensão do potencial protetor de preparações ricas em compostos fenólicos. A vantagem na descoberta do potencial farmacológico de compostos em produtos de origem vegetal e suas ações benéficas à saúde está centrada na prospecção de novas opções terapêuticas complementares ao auxílio das terapias convencionais, sendo de baixo custo e de fácil obtenção.

2. OBJETIVOS

Avaliar a ação antiglicação e antioxidante do extrato hidroetanólico dos frutos de *Capsicum chinense* Jacq através de sistemas-modelo *in vitro*. O estudo do potencial antiglicação é realizado em sistema-modelo *in vitro* de modificações glico-oxidativas proteicas, o qual se baseia na incubação de albumina sérica bovina com metilglioxal ou com glicose, mimetizando as modificações proteicas promovidas pela glicose em estados hiperglicêmicos. Faz-se o monitoramento de marcadores, tais como a formação de AGE fluorescentes, produtos de oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano, níveis de proteínas carboniladas e formação de ligações cruzadas entre proteínas (*cross-linking* proteico), com avaliação temporal das alterações causadas pelo estresse glico-oxidativo. O estudo do potencial antioxidante é realizado em sistema-modelo *in vitro* de geração de espécies reativas, tais como o ensaio de captura do ânion radical superóxido e o ensaio do clareamento (*bleaching*) da crocina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes utilizados

Os reagentes utilizados no estudo foram: etanol (70%), pimentas *Capsicum chinense*, água ultrapura, dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich), albumina sérica bovina (BSA, pó liofilizado livre de ácidos graxos) ($\geq 96\%$), metilglioxal e glicose (Sigma-Aldrich), fosfato de sódio monobásico (Synth), fosfato de sódio dibásico (Sigma-Aldrich), azida sódica (Merck), aminoguanidina (Sigma-Aldrich), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich), Coomassie blue, metanol, ácido acético (Qhemis), água ultrapura, álcool etílico absoluto, acetato de etila, tolueno, ácido fórmico, hexano, isopropanol, iodo, dicloridrato de 2,2'-azobis- (2-metilpropanoamidina) (AAPH), crocina, trolox, metassulfato de fenazina (PMS), azul de tetrazólio (NBT), nicotinamida adenina dinucleotideo (NADH), quercetina, 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Merck), ácido clorídrico (HCl).

3.2 Obtenção e liofilização do material vegetal e extrato hidroetanólico da pimenta *Capsicum chinense*

O material vegetal, frutos da pimenta biquinho (*Capsicum chinense* Jacq.) foram adquiridos de cinco fornecedores distintos do comércio local da cidade de Araraquara, SP. O material foi identificado pelo Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento. Após aquisição do material vegetal, realizou-se a limpeza em água e detergente neutro e então, posterior enxágue em água corrente. Em seguida os frutos foram secos em temperatura ambiente, e retiradas suas folhagens e estruturas morfológicas não interessantes para o estudo (pedúnculos e os resquícios dos cálices).

Os frutos das pimentas foram previamente armazenados sob temperatura de -20°C e em seguida, sob temperatura de -80°C. Posteriormente, para a remoção de água dos frutos, as amostras foram submetidas ao processo de liofilização, a uma pressão de 0,011 mbar e temperatura de -60°C, durante 48 horas. Após o processo de liofilização, as amostras dos frutos das pimentas secas foram trituradas em moinho, obtendo-se um resíduo seco, na forma de pó, o qual foi recolhido para o preparo do extrato hidroetanólico. O método de extração para a obtenção do extrato hidroetanólico de frutos de *C. chinense* (CcExt) foi a maceração, método a frio em que se utiliza o líquido extrator, sendo o solvente utilizado neste experimento o etanol a 70%, para a obtenção do extrato hidroetanólico dos frutos da pimenta.

O extrato obtido por maceração foi preparado adicionando-se as pimentas secas previamente trituradas em um frasco âmbar, contendo etanol a 70%, fechado hermeticamente e mantido à temperatura ambiente (26°C), protegido da luz, e com agitação manual diária (o contato entre o solvente e a matéria-prima foi mantido durante 48 horas, em uma primeira etapa). Assim decorrido, a mistura resultante da extração foi separada por filtração, à vácuo, armazenando o líquido extraído contendo o solvente etanol a 70% em frasco de vidro âmbar sob refrigeração.

Ao pó intumescido restante foram adicionados mais 1000 mL de etanol 70%, sendo a etapa de maceração repetida por mais 48 horas. Os sobrenadantes foram

recolhidos em frasco âmbar e mantidos sob refrigeração. O resíduo de pó entumescido, ao final do processo de extração por maceração, foi descartado.

Para a remoção do etanol, as amostras do CcExt foram levadas ao rotaevaporador, à temperatura de 45°C, frequência de 120 rpm e pressão de 200 mbar, durante sessões de 50 minutos a cada 500 mL de amostra do extrato. As amostras do extrato, livres de etanol, foram recolhidas em tubos do tipo falcon de 50 mL e armazenadas a -80°C preparando-as para a etapa seguinte de liofilização.

As amostras de CcExt, após rotaevaporação, foram submetidas a liofilização, para remoção de água. A liofilização foi conduzida a uma pressão de 0,011 mbar e temperatura de -60°C, durante 96 horas, resultando no CcExt, de consistência seca (pó), livre de solventes. O extrato obtido foi armazenado em dessecador para que fossem evitados eventuais ganhos de umidade até a realização dos experimentos.

3.3 Análise e estudo do potencial antioxidante e propriedades químicas do extrato de *Capsicum chinense*

3.3.1 Análise do extrato de *Capsicum chinense* por cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada é uma técnica de simples execução, de baixo custo e de grande importância para a separação rápida e análise qualitativa ou quantitativa de pequenas quantidades de amostra, sendo utilizada para determinação da pureza de compostos, identificação de componentes em uma mistura comparando-os com padrões, e ainda para isolar componentes puros de uma mistura (BECKER, 1997). O objetivo destas análises foi a otimização de fase móvel em CCD e a obtenção de perfil cromatográfico do extrato. Sendo assim, inicialmente pesou-se 5 mg do CcExt em um tubo *ependorf*, e a essa massa adicionou-se 500 µL de álcool etílico absoluto, submetendo-se posteriormente o tubo em banho de ultrassom (Unique®) por 30 minutos até completa solubilização do extrato. Após a solubilização, uma solução inicial de concentração 10 mg/mL foi obtida, e desta solução foram retiradas duas

alíquotas com o objetivo de obter-se duas amostras nas concentrações de 5 mg/mL e 10 mg/mL. A primeira alíquota retirada foi de 250 µL e armazenada no frasco “a”, e a este frasco então adicionou-se mais 250 µL de álcool etílico absoluto, obtendo-se então uma amostra “a” de volume final de 500 µL e concentração de 5 mg/mL. A segunda alíquota retirada da solução inicial foi de 250 µL e transferida ao frasco “b”, obtendo-se a amostra “b” de volume igual a 250 µL e concentração de 10 mg/mL.

A caracterização das amostras do CcExt, nas concentrações de 5 mg/mL e 10 mg/mL, foi realizada por cromatografia em camada delgada, de acordo com Alves (2012), com modificações, utilizando para fins comparativos diferentes eluentes (fases móveis) descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Fases móveis utilizadas na Cromatografia em Camada Delgada (CCD), identificadas em grupos de A-F, e proporções dos eluentes que as compõem.

Grupos	Fase móvel	Proporção utilizada (v/v)*
A	acetato de etila: tolueno: ácido fórmico	56: 24: 20
B	tolueno: acetato de etila: metanol: ácido acético	53: 40: 5: 2
C	hexano: acetato de etila	70: 30
D	hexano: acetato de etila: isopropanol	60: 37: 3
E	acetato de etila: etanol	90:10
F	acetato de etila	100

* proporção dos eluentes utilizados, levando em consideração o volume final de 6 mL de fase móvel total a ser adicionada na cuba de saturação da CCD.

As amostras do CcExt, nas concentrações de 5 mg/mL e 10 mg/mL foram aplicadas em volumes de 10 µL e 20 µL nas bases (à 0,5 cm da parte inferior) das placas cromatográficas (fase estacionária) de sílica gel C18, 0,20 mm com indicador fluorescente UV254 (MACHEREY-NAGEL ®), através de aplicações sucessivas das amostras com um pequeno capilar, formando-se manchas circulares em sequência, e posteriormente estas placas foram inseridas nas cubas de cromatografia contendo um grupo de eluentes (solventes), que foram descritos na Tabela 1, em cada uma delas.

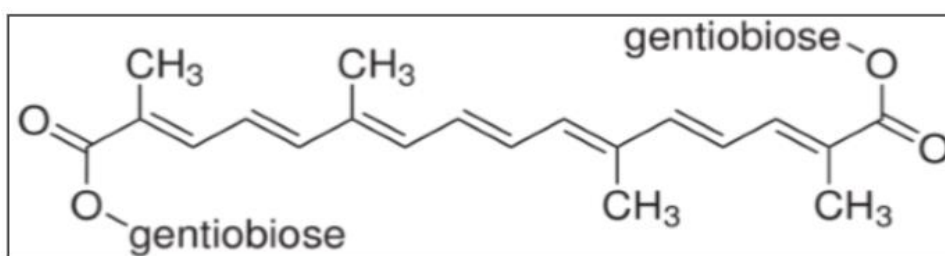
Quando os solventes atingiram distância total de eluição (a 0,5 cm da parte superior), as placas foram retiradas das cubas cromatográficas, e a seguir foram analisadas. Quando os componentes são substâncias coloridas, as manchas são visíveis. Quando os compostos são incolores a placa deve ser “revelada” usando um “revelador”. Sendo assim, para visualização das bandas obtidas, as placas foram analisadas na luz ultravioleta (UV-365 nm), detectando-se algumas bandas. Para a revelação das bandas que não foram visualizadas na luz UV, as placas foram inseridas e permaneceram por 15 minutos em cubas que foram previamente saturadas com iodo (adicionou-se em cada uma delas cerca de 4g de iodo), formando-se vapores de iodo que reagem com compostos orgânicos formando complexos de cor amarela nas placas.

O fator de retenção (R_f) dos metabólitos secundários foi utilizado como referência para análise do comportamento das substâncias presentes nas amostras avaliadas.

3.3.2 Estudo do potencial antioxidante do extrato de *Capsicum chinense*: ensaio de clareamento (*bleaching*) da crocina

O ensaio de clareamento (*bleaching*) da crocina, realizado de acordo com Tubaro et al. (1998), com modificações de Assis et al. (2015), baseia-se na competição entre a crocina (Figura 3) e a amostra (CcExt) em reagir com o radical peroxila ($\text{ROO}^\bullet$).

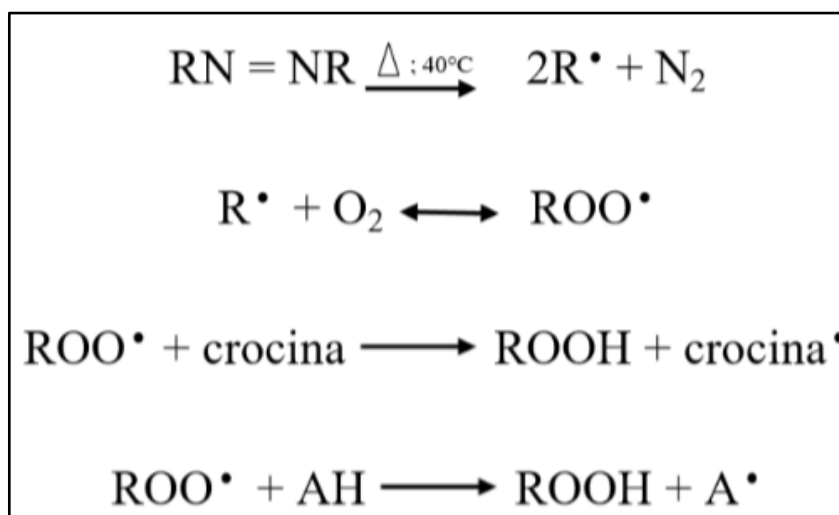
Figura 3. Estrutura química da crocina



Fonte: NIE et al., 2019.

O monitoramento da diminuição da absorbância da crocina foi realizado em 443 nm durante 10 minutos. A reação é iniciada pela adição do azocomposto dicloridrato de 2,2'-azobis- (2-metilpropanoamidina) (AAPH), o qual a 40°C, por termólise, permite a formação de um radical livre, em meio aerado. O O₂ presente no meio da reação reage com o radical e gera o ROO•; o ROO• retira um átomo de hidrogênio e gera um radical na crocina, levando ao rompimento de suas duplas ligações, provocando seu clareamento, e diminuição de sua absorbância na região do visível. Na presença de substâncias antioxidantes, essa diminuição da absorbância se torna menor e por isso registra-se um novo valor na variação da absorbância em função do tempo, ou seja, na velocidade do clareamento (*bleaching*) da crocina. Desta forma, os antioxidantes competem com a crocina pelos radicais ROO•, sendo assim, a inibição de sua oxidação depende da capacidade das amostras na captura das espécies radicalares (Figura 4).

Figura 4. Reações envolvidas no ensaio de clareamento da crocina. A, representa um antioxidante (amostra).



Fonte: ASSIS et al., 2015, com adaptação.

O ensaio foi realizado em volume total de 2 mL, em tampão fosfato de sódio 0,12 M, pH 7,0 com 24,4 µg/mL de crocina (a partir de uma solução estoque de 5861,76 µg/mL em DMSO) e diferentes concentrações de Trolox (antioxidante padrão, análogo solúvel da vitamina E, nas concentrações de 9,38; 6,26; 3,13; 1,88; 1,25; 0,63

e 0,25 µg/mL) e nas concentrações de 675, 500, 375, 250, 125 e 62,5 µg/mL do (CcExt). A reação teve início com adição de 50 µL (12,5 mM, concentração final) de AAPH (solução estoque 0,5 M, preparada diariamente, em tampão fosfato de sódio 0,12 M, pH 7,0 e mantido gelado, em banho de gelo), a absorbância foi monitorada à 443 nm, sob agitação e temperatura de 40°C constantes.

A velocidade do clareamento da crocina é linear após 1 minuto da adição do AAPH, e foi monitorada durante 10 minutos no espectrofotômetro (Jasco® V-630). Foi realizado para cada concentração de amostra um ensaio sem crocina, considerando-o como branco da reação, a fim de evitar possíveis interferências na absorbância.

Por competição cinética, o clareamento da crocina pela geração do ROO• (v_0) diminui na presença de composto antioxidante. O antioxidante compete com a crocina pelo ROO• e uma nova velocidade de clareamento (v) corresponde a:

$$v = v_0 \times \frac{k_c [C]}{k_c [C] + k_a [A]}$$

Onde: $v_0 = k_1 \times [\text{ROO}^\bullet] \times [C]$; $k_c = k_1 \times [\text{ROO}^\bullet]$; $k_a = k_2 \times [\text{ROO}^\bullet]$;

$[\text{ROO}^\bullet]$ = concentração do radical peroxila;

v_0 = velocidade da reação da crocina com ROO• ;

k_1 = constante de velocidade para a reação entre ROO• e crocina;

k_2 = constante de velocidade para a reação entre ROO• e antioxidante;

$[C]$ = concentração da crocina;

$[A]$ = concentração de amostra (Trolox ou CcExt).

A velocidade de *bleaching* da crocina (v_0) diminui na presença de um antioxidante e um novo valor (v) é avaliado de acordo com a seguinte relação:

$$\frac{v_0}{v} = \frac{k_c [C] + k_a [A]}{k_c [C]} = 1 + \frac{k_a}{k_c} \times \frac{[A]}{[C]}$$

O valor de k_a/k_c , calculado a partir da inclinação de regressão linear do gráfico v_0/v versus $[A]/[C]$, indica a capacidade relativa de um antioxidante interagir com o $ROO^\bullet$. Os dados foram analisados usando o programa OriginPro 8.5.

3.3.3 Estudo do potencial antioxidante do extrato de *Capsicum chinense*: ensaio de captura do ânion radical superóxido

O estudo do potencial antioxidante pelo ensaio de captura de ânion radical superóxido foi efetuado em tampão pirofosfato de sódio (25 mmol/L e pH 8,3). Primeiramente, foram adicionados 150,0 μ L de tampão; amostra (CcExt, Trolox e Quercetina) em volume necessário para obtenção das concentrações estudadas; 10,0 μ L de metassulfato de fenazina (PMS; 372 μ M) e 25,0 μ L de azul de tetrazólio (NBT; 600 μ M). Incubou-se a placa por 2 minutos em ausência de luz e em temperatura ambiente e, posteriormente, foram adicionados 15,0 μ L de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH; concentração igual a 1560 μ M), desta forma a placa seguiu para incubação de 5 minutos, em temperatura ambiente e na ausência de luminosidade. Na placa, durante o ensaio, realizou-se o controle (100%), ou seja, na ausência de amostra e o “branco” da reação, o qual não foi adicionado o volume de NADH, com o objetivo de medir a resposta do procedimento adotado para impurezas ou espécies interferentes nos reagentes, além de indicar a interferência de outras espécies na amostra.

A fim de se obter um volume final de reação igual a 300,0 μ L, foi adicionada água ultrapura. As absorbâncias geradas pela reação foram monitoradas à 560 nm, em espectrofotômetro de placas (BioTek® PowerWave XS2), com o propósito de monitorar a formazana gerada, a qual é possível de ser observada pela coloração púrpura formada. A formazana é proporcional à quantidade de ânion radical superóxido em solução, sendo assim as moléculas antioxidantes são capazes de interagir com o ânion radical superóxido inibindo a formação de formazana.

Para o CcExt foram avaliadas concentrações de 62,5 a 1000 μ g/mL. E para os padrões, as concentrações estudadas foram de 1,0 a 40 μ g/mL para a

Quercetina, e para o Trolox de 0,0625 a 1,50 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Com a obtenção dos valores de absorbância, foi realizado o cálculo da porcentagem da captura do ânion superóxido. Com os resultados, foram obtidas para cada substância estudada, as curvas analíticas e os respectivos valores de EC₅₀, os quais demonstram a quantidade de substância necessária para a captura de 50 % dos radicais em solução. Os dados foram analisados usando o programa OriginPro 8.5.

3.4 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas proteicas *in vitro*

3.4.1 Proteína albumina sérica bovina incubada na presença de glicose

Para a avaliação das consequências das modificações glico-oxidativas proteicas, bem como para o estudo do potencial do CcExt em inibir estes processos, foram realizados ensaios baseados na incubação da proteína albumina sérica bovina (BSA) na presença de glicose (Gli) *in vitro*, na ausência ou presença do CcExt, nas concentrações de 62,5, 125 e 250 µg/mL.

O sistema-modelo de promoção de modificações glico-oxidativas proteicas *in vitro* foi conduzido de acordo com dos Santos et al. (2019) e Motta et al. (2020). Previamente ao início das incubações, realizou-se a solubilização do CcExt em dimetilsulfóxido (DMSO; 5% nas incubações). Sendo assim, inicialmente pesou-se 15,0 mg de massa do extrato em um tubo *ependorf*, e a essa massa adicionou-se volume de 3,00 mL de DMSO, submetendo-se posteriormente o tubo em banho de ultrassom (Quimis®) por 30 minutos até completa solubilização do extrato. Neste momento, foi obtida uma solução de trabalho de extrato de 5 mg/mL.

A solução de trabalho de extrato de 5 mg/mL foi usada para obter outras duas soluções, mais diluídas (em DMSO), de concentrações 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL. As soluções de trabalho de 5 mg/mL, 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL foram utilizadas,

respectivamente, para a obtenção das concentrações de extrato de CcExt 250, 125 e 62,5 µg/mL no meio de incubação.

Observando-se que o extrato foi solubilizado adequadamente, em todas as soluções de trabalho acima descritas, prosseguiu-se para a etapa de realização do estudo do potencial antiglicação de CcExt em sistema-modelo *in vitro* de modificações glico-oxidativas proteicas. O sistema-modelo de modificações glico-oxidativas proteicas *in vitro* foi realizado da seguinte forma: albumina sérica bovina (BSA, 10 mg/mL) foi incubada sob condições estéreis na presença de glicose (Gli, 0,5 M), em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo 0,02% de azida sódica, a 37°C (Incubadora CO₂ J.P. SELECTA®), durante 30 dias em ambiente aeróbico fechado, na ausência ou presença de CcExt, nas concentrações de 62,5, 125 e 250 µg/mL, ou na ausência ou presença de aminoguanidina (AG, 1 mM; substância protótipo antiglicação ou anti-AGE). Cada condição de incubação foi conduzida em triplicata.

Foram preparadas soluções de trabalho de cada componente a ser utilizado no meio de incubação: 25 mg/mL de BSA, 1,25 M de glicose, 2 mM de AG, 4 mg/mL de azida sódica.

Alíquotas destes ensaios foram coletadas para serem utilizadas nas determinações dos seguintes marcadores: AGE fluorescentes, produtos de oxidação dos resíduos dos aminoácidos tirosina e triptofano, formação de *cross-linking* proteico e determinação de proteínas carboniladas. No tempo 0 (isto é, antes do início das incubações à 37°C) e nos tempos 10, 20 e 30 dias de incubação, alíquotas das incubações foram retiradas para a estimativa de AGE fluorescentes, estimativa dos produtos de oxidação dos resíduos de tirosina (ditirosina) e triptofano (N'-formilquinurenina e a quinurenina). Amostras das incubações obtidas após 30 dias de incubação foram usadas para análise da formação de *cross-linking* proteico e determinação dos níveis de proteínas carboniladas.

3.4.2 Proteína albumina sérica bovina incubada na presença de metilglioxal

O sistema-modelo de promoção de modificações glico-oxidativas proteicas *in vitro* foi conduzido de acordo com Meeprom e colaboradores (2015) e Motta et al. (2020), com modificações. O ensaio foi realizado tal qual o descrito anteriormente, onde a BSA foi incubada na presença de Gli, no entanto, o agente glicativo empregado foi o metilglioxal (MGO).

A BSA (10 mg/mL) foi incubada sob condições estéreis na presença de MGO na concentração de 2 mM, em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) contendo 0,02% de azida sódica, a 37°C, durante 8 dias (192 horas) em ambiente aeróbico fechado, na ausência ou presença de CcExt, ou na ausência ou presença de AG (1 mM). Foram conduzidas incubações na ausência ou na presença CcExt, nas concentrações de 62,5, 125 e 250 µg/mL. DMSO (5% nas incubações) foi utilizado como solvente para CcExt e também para a diluição necessária para a obtenção das três concentrações do extrato estudadas. As incubações foram realizadas em triplicata. Alíquotas deste ensaio também foram coletadas para serem utilizadas nas determinações dos marcadores: AGE fluorescentes e produtos de oxidação dos resíduos dos aminoácidos tirosina e triptofano, onde no tempo 0 (isto é, antes do início das incubações à 37°C) e nos tempos 24, 48, 96 e 192 horas de incubação, alíquotas das incubações foram retiradas para a estimativa de AGE fluorescentes, estimativa dos produtos de oxidação dos resíduos de tirosina (ditirosina) e triptofano (N'-formilquinurenina e a quinurenina), e formação de *cross-linking* proteico.

3.4.3 Estimativa dos níveis de AGEs fluorescentes

A produção de AGE foi estimada via fluorescência, onde alíquotas das amostras incubadas com BSA na ausência ou na presença de Gli ou de MGO, na ausência e na presença do CcExt em concentrações de 62,5, 125 e 250 µg/mL, e na ausência ou na presença de AG, foram submetidas à excitação em comprimento de onda de 355 nm e a emissão monitorada em 430 nm.

Os efeitos anti-AGE da AG e do CcExt foram observados pela porcentagem de inibição em relação ao ensaio conduzido somente com BSA + Gli ou BSA + MGO (MEEPROM et al., 2013; PALERMO, 2017; DOS SANTOS et al., 2019; MOTTA et al., 2020).

3.4.4 Estimativa dos níveis dos produtos de oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano

O aminoácido triptofano pode sofrer oxidação na presença de açúcares ou de intermediários formados na reação de Maillard (PERDIVARA et al., 2010); N'-formilquinurenina e a quinurenina são compostos formados após a oxidação do triptofano, podendo ser utilizados como marcadores da agressão oxidativa à BSA pelos açúcares (BALASUBRAMANIAN e KANWAR, 2002; PERDIVARA et al., 2010).

Os seguintes comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, foram usados para monitoramento desses marcadores: 325/344 nm para N'-formilquinurenina, 365/480 nm para quinurenina e 330/415 para ditirosina, produto de oxidação do aminoácido tirosina (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2019; MOTTA et al., 2020).

3.4.5 Determinação de *cross-linking* proteico

A investigação da formação de ligações cruzadas (*cross-linking*) em proteínas foi realizada em alíquotas obtidas a partir de amostras do tempo 30 dias de incubação na presença de Gli, e a partir de amostras dos tempos 0 e 192 horas de incubação com MGO. Essas alíquotas foram obtidas a partir de incubações onde BSA estava presente no meio. As seguintes condições foram estudadas:

- | | | |
|-----------|--------------|--|
| · BSA | · BSA+AG | · BSA+CcExt (250, 125, 62,5 µg/mL) |
| · BSA+Gli | · BSA+Gli+AG | · BSA+Gli+CcExt (250, 125, 62,5 µg/mL) |
| · BSA+MGO | · BSA+MGO+AG | · BSA+MGO+CcExt (250, 125, 62,5 µg/mL) |

Para o estudo da formação do *cross-linking* proteico, foi realizada eletroforese de proteínas em condições desnaturantes, tal como descrito por Motta et al. (2020) e Dias et al. (2021). As amostras foram submetidas à separação eletroforética de proteínas em gel de acrilamida:bisacrilamida (gel a 10%) sob condições desnaturantes, na presença de dodecil sulfato de sódio, SDS (eletroforese do tipo SDS-PAGE), o que permitiu a separação de proteínas de acordo com o seu tamanho (peso molecular).

Foram adicionados 3 microlitros das incubações à 9 microlitros de tampão da amostra (62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 10% de glicerol, 2% de SDS, 100 mM de ditioneitol e 0,1% de azul de bromofenol) (LAEMMLI, 1970). Em cada poço do gel, foram aplicados volumes contendo 5 microgramas de proteína (volume de 2 microlitros), submetidos em seguida à separação eletroforética. A corrida eletroforética foi conduzida a 60 V nos primeiros 30 minutos e 120 V pelos próximos 90 minutos, em cuba contendo o tampão de corrida eletroforética (Tris 25 mM, glicerol 192 mM, 0,1% SDS; pH 8,3), pelo período total de duas horas.

Ao término da separação eletroforética de proteínas, o gel foi corado em solução contendo o corante de proteínas *Coomassie blue*, por 30 minutos, em seguida foram realizadas 3 lavagens com solução descorante (10% metanol 10% de ácido acético, em água ultrapura), substituída a cada 10 minutos. Após isso, o gel permaneceu *overnight* na solução descorante, para obtenção de uma melhor visualização das bandas proteicas no gel.

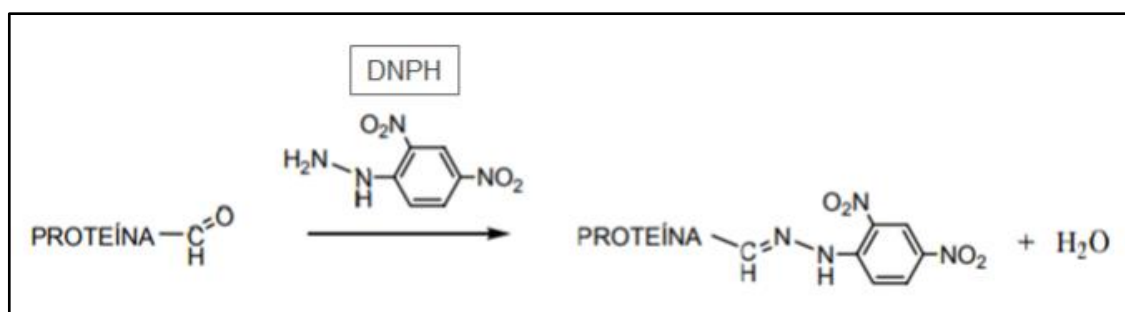
Os géis foram registrados, gerando-se imagens sobre o perfil de separação eletroforética das amostras do tempo 30 dias de incubação com Gli, e dos tempos 0 e 192 horas de incubação com MGO. As imagens foram salvas em formato *jpeg*.

3.4.6 Determinação dos níveis de proteínas carboniladas (PCO)

O conteúdo de grupamentos carbonilas nas proteínas foi determinado de acordo com Levine et al. (1994), com modificações de acordo com Dias et al. (2021).

O método se baseia na reação dos grupamentos carbonílicos com o reagente DNPH, formando uma hidrazona que pode ser determinada espectrofotometricamente a 370 nm (Figura 5).

Figura 5. Reação entre a proteína carbonilada e a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)



Fonte: adaptado de LEVINE et al., 1994.

Neste ensaio foram analisadas as propriedades do CcExt, nas concentrações 250, 125 e 62,5 µg/mL, em prevenir a formação de PCO no tempo 30 dias de incubação.

Para cada alíquota de amostra (100 µL), foram utilizados dois tubos de polipropileno, um denominado Amostra (A) e outro Controle (C). Aos tubos A, foram adicionados 400 µL de DNPH (12 mM) e aos tubos C, foram adicionados 400 µL de HCl (2,5 M). Após homogeneização realizou-se incubação, a temperatura ambiente, durante 1 hora no escuro, homogeneizando a cada 15 minutos. Em seguida, 500 µL de TCA 10% foram adicionados a todos os tubos, que passaram por homogeneização e centrifugação (10000 g, 10 min, em banho de gelo a 4°C) (Figura 11). Os sobrenadantes dos tubos foram desprezados com a devida cautela para que os pellets formados não fossem perdidos.

O *pellet* de proteínas formado em cada tubo (Figura 12) foi lavado com 1 mL da mistura etanol/acetato de etila (1:1) três vezes realizando-se a cada vez a centrifugação (1000 g, 10 min, 4°C) e em seguida desprezando os sobrenadantes. Após a última centrifugação (1000 g, 10 min, 4°C), acrescentou-se 1 mL de ureia (6 M) aos tubos até a solubilização dos *pellets* e os sobrenadantes foram utilizados para medida da absorbância a 370 nm, em cubetas de quartzo para UV. Os resultados foram obtidos com base na diferença entre as absorbâncias A e C de cada alíquota e a concentração de grupos carbonilas foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar da hidrazona ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$):

$$\text{PCO } (\mu\text{M}) = \frac{A - C}{22000} \times 1000000$$

3.5 Análise estatística

Os resultados apresentam-se como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), e os dados foram avaliados usando o programa GraphPad Prism9, através da análise de variância One Way (ANOVA), e análise de diferença pelo teste de Newman-Keuls, para comparação intergrupo. O teste t de Student foi considerado para comparação intragrupo, comparando-se todos os tempos com o tempo 0. O nível de significância estatística adotado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção do material vegetal e extrato hidroetanólico dos frutos da pimenta *Capsicum chinense*

As pimentas biquinho (*C. chinense*) foram adquiridas de cinco estabelecimentos distintos da cidade de Araraquara, SP, totalizando 1500 g de massa dos frutos *in natura*.

Após a limpeza das pimentas, estas foram liofilizadas, e a massa das pimentas resultante após esse processo foi de 300 g. Em seguida, as pimentas foram trituradas em moinho, e considerando a separação das estruturas que não foram totalmente moídas e eventuais perdas na transferência entre frascos, a massa obtida foi igual a 269,5 g de frutos secos e moídos.

Foi realizada a preparação do CcExt por maceração dos frutos secos e moídos em solução de etanol a 70%; o resíduo sólido final do fruto, obtido após a filtração do extrato, foi descartado. A solução extrativa contendo substâncias bioativas da pimenta em etanol a 70% foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração, com um volume final de 2,5 litros.

As amostras do extrato dos frutos de *C. chinense* foram levadas ao rotaevaporador, para a remoção do etanol, em duas etapas. Na primeira etapa foram rotaevaporados 1,1 L de solução de extrato com solvente, obtendo-se ao final 340 mL de solução de extrato sem solvente e 745 mL de etanol. O extrato resultante desta etapa, contendo somente água, seguiu para liofilização, e após a eliminação da água presente, foram obtidos 20,8 g de extrato hidroetanólico dos frutos de *Capsicum chinense* (CcExt) (Tabela 2).

Tabela 2 Massas (g) referentes ao processo de obtenção do extrato hidroetanólico dos frutos de *C. chinense* (CcExt)

Pimentas <i>Capsicum chinense</i>	Massas (g)
Frutos <i>in natura</i>	1500,0
Frutos liofilizados	300,0
Frutos liofilizados e moídos	269,5
CcExt	20,8*

* massa de CcExt obtida apenas na etapa 1 de rotaevaporação. O extrato não liofilizado da segunda etapa está armazenado à -80°C para testes posteriores.

Na segunda etapa foram realizados os mesmos procedimentos com 1,4 litros restantes de líquido extraído com o solvente que estava sob refrigeração, obtendo-se os volumes de 393 mL de extrato sem solvente, e 940 mL de etanol. O extrato desta etapa encontra-se armazenado à temperatura de -80°C, para perspectivas futuras no laboratório.

4.1.1 Rendimento do CcExt

O rendimento do CcExt foi determinado de acordo com Santos (2020), com base na seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{massa do extrato}}{\text{massa da amostra}} \times 100$$

Assim, o rendimento em massa de CcExt, a partir da massa dos frutos secos e moídos, foi de 7,7%. Comparando o rendimento obtido no presente trabalho com os achados de Santos (2020), o qual obteve um rendimento de 8,42% na preparação de extrato etanólico de *Capsicum chinense*, é possível concluir que o rendimento obtido no presente estudo se apresenta semelhante aos padrões esperados. O rendimento de extração pode variar por diversos fatores, incluindo método e tempo de extração, parte do material vegetal utilizado, temperatura, e principalmente pelo tipo de solvente utilizado (Machado et al., 2013).

As hipóteses para tal rendimento obtido, se baseiam em perdas não significativas durante as transferências de solução entre frascos, entre processos de liofilização, e recolhimentos das amostras do rotaevaporador.

Analizando estudos realizados para obtenção de extratos de pimentas *Capsicum* obtidos com solventes polares, é visto que estes apresentaram maior rendimento em relação aos extratos produzidos com solventes apolares, portanto a escolha do solvente etanol a 70% para tal procedimento foi adequada. Em estudos feitos por De Aguiar et al. (2014), foi analisado o rendimento de preparação de extratos de pimenta-biquinho com diferentes métodos e solventes, e verificou-se que solventes polares apresentaram maior rendimento de extração em relação aos solventes apolares, concluindo que a pimenta-biquinho deve apresentar maior concentração de substâncias com alta polaridade, tais como compostos fenólicos, açúcares e vitaminas.

4.2 Análise do potencial antioxidante e propriedades químicas do extrato de *Capsicum chinense*

4.2.1 Análise do extrato de *Capsicum chinense* por cromatografia em camada delgada (CCD)

As plantas medicinais são vastamente utilizadas na forma de extratos; métodos analíticos para validação dessas formas farmacêuticas, apesar de ainda escassos, estão sendo cada vez mais estudados e existem métodos de grande importância para análise de extratos naturais (ALVES, 2012). A cromatografia, por exemplo, é um

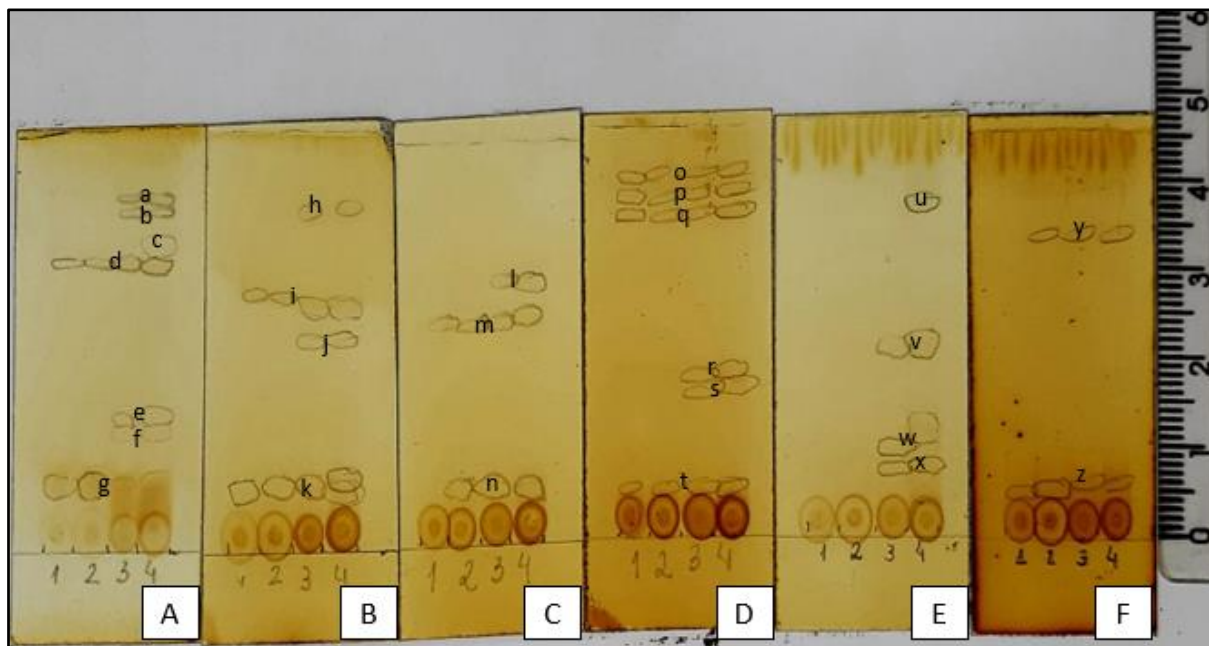
método para separação de misturas e uma das técnicas adequadas para análise de amostras de extratos, como as do presente estudo.

A cromatografia é um método utilizado para análise, identificação ou separação dos componentes de uma mistura, e sua definição pode ser atribuída à separação de dois ou mais compostos diferentes por distribuição entre fases, uma das quais é estacionária e a outra fase móvel. A amostra (mistura) é adsorvida em uma fase estacionária (fixa), e uma fase móvel flui continuamente sobre a amostra adsorvida. Pela escolha apropriada da fase estacionária e da fase móvel, além de outras variáveis, pode-se fazer com que os componentes da amostra sejam arrastados ordenadamente. Aqueles que interagem pouco com a fase fixa são arrastados facilmente e aqueles com maiores interações ficam mais retidos. As interações envolvidas podem ser, por exemplo: formação de sais, coordenação, ligação hidrogênica, dipolo-dipolo, forças de dispersão de London (BECKER, 1997).

Na cromatografia em camada delgada (CCD), utilizada neste trabalho, a fase líquida (móvel) ascende por uma camada fina do adsorvente estendida sobre um suporte (de alumínio, no caso deste estudo). Sobre a placa há uma camada fina de adsorvente (sílica). Após a aplicação da amostra, a placa é colocada verticalmente em um recipiente fechado (cuba cromatográfica) que contém uma pequena quantidade de solvente. O solvente (eluente) este eluirá pela camada do adsorvente por ação capilar.

À medida que o solvente sobe pela placa, a amostra é compartilhada entre a fase líquida móvel e a fase sólida estacionária, e durante este processo, os diversos componentes da mistura são separados. As substâncias menos polares eluem mais rapidamente que as substâncias mais polares. Esta diferença na eluição resultará em uma separação dos componentes da amostra como demonstrado na Figura 6.

Figura 6 Cromatoplasacas do extrato de *Capsicum chinense* (CcExt) em sílica gel (0,20 mm)



Amostra: 1: CcExt na concentração de 5 mg/mL e volume de aplicação de 10 μ L; **Amostra 2:** CcExt 5 mg/mL e 20 μ L; **Amostra 3:** CcExt 10 mg/mL e 10 μ L; **Amostra 4:** CcExt 10 mg/mL e 20 μ L. Fase móvel - **(A)** acetato de etila: tolueno: ácido fórmico 56 : 24 : 20; **(B)** tolueno: acetato de etila: metanol: ácido acético 53: 40: 5: 2; **(C)** hexano: acetato de etila 70 : 30; **(D)** hexano: acetato de etila: isopropanol 60: 37: 3; **(E)** acetato de etila : etanol 90:10; **(F)** acetato de etila. Bandas e Fator de Retenção (R_f) – (a): 0,83; (b): 0,79- 0,81; (c): 0,73; (d): 0,66- 0,68; (e): 0,31- 0,35; (f): 0,27-0,29; (g): 0,16- 0,18; (h): 0,82; (i): 0,59-0,61; (j): 0,51; (k): 0,13- 0,17; (l): 0,65; (m): 0,54-0,56; (n): 0,13- 0,15; (o): 0,87-0,89; (p): 0,80-0,82; (q): 0,76-0,78; (r): 0,40; (s): 0,36; (t): 0,13-0,15; (u): 0,78; (v): 0,44; (w): 0,19- 0,25; (x): 0,13- 0,15; (y): 0,73- 0,75; (z): 0,08- 0,13. Revelação com iodo e luz ultravioleta (UV). Fonte: própria autora, 2021.

Conforme representado na Figura 6, é possível observar a presença de diversas substâncias, cada uma comportando-se segundo suas propriedades de solubilidade e adsorção, a depender dos grupos funcionais presentes na sua estrutura. Cada “banda” formada em diferentes “alturas” nas placas, corresponde a um componente presente na mistura original, ou seja, na amostra do extrato de *Capsicum chinense* aplicada.

O parâmetro utilizado para a análise da distância percorrida pelas bandas foi o fator de retenção (R_f), definido como a razão entre a distância percorrida pela mancha da amostra a ser analisada e a distância percorrida pelo eluente.

Portanto:

$$R_f = d_c / d_s$$

Onde: d_c = distância percorrida pelos componentes da mistura.

d_s = distância percorrida pelo eluente.

No caso do presente estudo, este valor foi apenas tomado como guia para um comparativo entre as distâncias das bandas observadas nas placas, já que existem vários compostos com o mesmo R_f , e devido ao fato dos componentes do extrato analisado ainda não serem elucidados. Desta forma, é possível obter perfis cromatográficos do extrato.

De acordo com a Figura 6, com as bandas obtidas nas placas de A à F, é possível observar que a concentração e volume de amostra mais adequado, ou seja, que permitiu melhor influência no tamanho e número de bandas observadas foi a amostra 3, do CcExt na concentração de 10 mg/mL e no volume de aplicação na placa de 10 μ L, uma vez que, quando aplicou-se um volume maior, de 20 μ L, como no caso das placas A à E, amostra 2 de aplicação, ocorreu um espalhamento exacerbado da banda indicando, portanto, que um volume menor e mais concentrado (como o da amostra 3 - CcExt 10 mg/mL e 10 μ L) seria a mais adequada para a formação das bandas a análise dos resultados, e a considerada em um possível estudo posterior.

Dentre as diferentes condições atribuídas a cada placa cromatográfica, a condição da placa "D" (hexano: acetato de etila : isopropanol 60 : 37: 3) demonstrou-se adequada para a separação das substâncias presentes na amostra do extrato de *C. chinense*, sendo possível com ela verificar a formação de consideráveis bandas, sugestivo de diferentes substâncias na composição da amostra, visto os diferentes valores de R_f . A condição da placa "A" (acetato de etila : tolueno : ácido fórmico 56 : 24 : 20) também possibilitou a observação de mais bandas de substâncias.

Sendo assim, para a espécie de pimenta estudada, os compostos mais frequentes no extrato analisado parecem ser separados por estes solventes, e os resultados das placas apontam que é possível obter uma separação por fase sólida, cromatografia em coluna, utilizando-se sílica e solventes orgânicos para a amostra de

extrato testada, o que sugere ser uma opção para a próxima etapa de obtenção das frações do extrato. Em um posterior fracionamento, estas condições de análise de CCD utilizadas e que demonstraram resultados positivos, especialmente as mencionadas (hexano: acetato de etila: isopropanol e acetato de etila: tolueno: ácido fórmico) poderiam ser empregadas analisadas para um comparativo de perfil, avançando nas metodologias utilizadas.

4.2.2 Ensaio de clareamento (*bleaching*) da crocina

As capacidades de inibição do clareamento da crocina pelas amostras de Trolox (padrão antioxidante) e do CcExt estão representadas na Figura 7 e 8. Essa capacidade foi analisada pela equação cinética de competição:

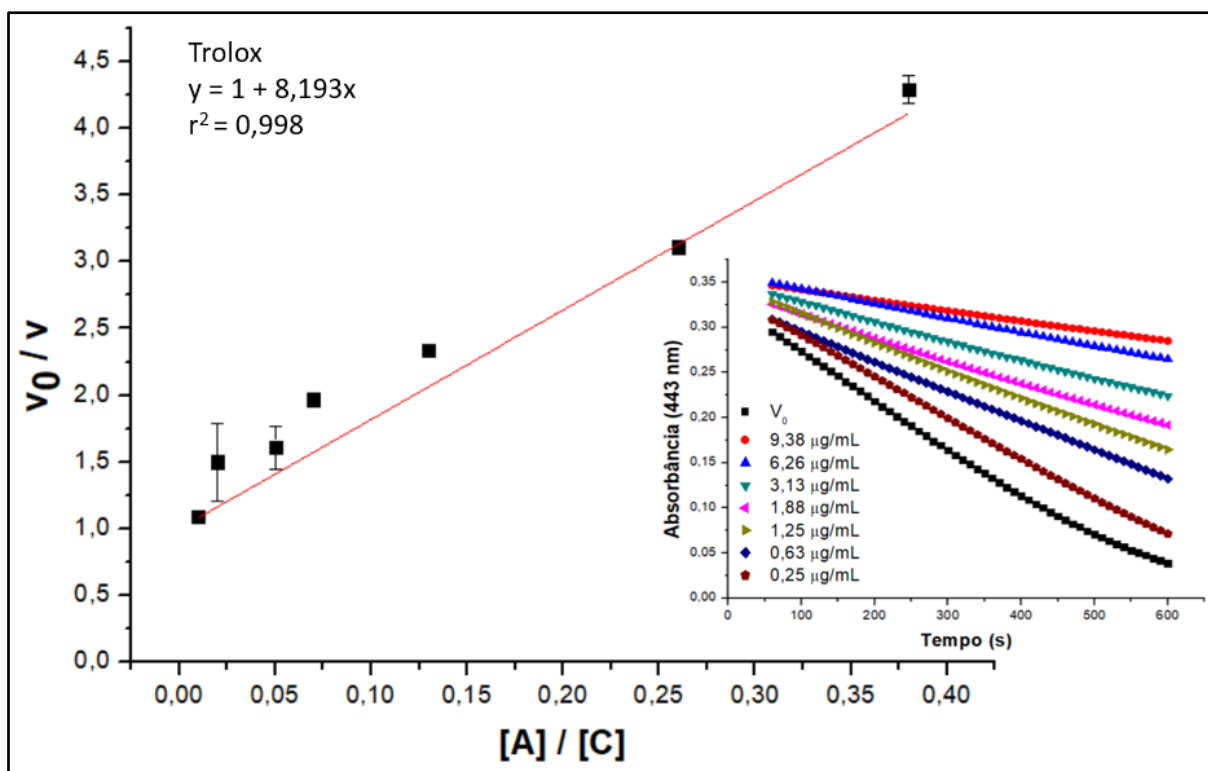
$$V_0/V = 1 + \text{coeficiente angular} \cdot [A]/[C],$$

V_0 , velocidade na ausência de composto; v , velocidade na presença de composto; $[A]$ concentração do respectivo composto $[C]$, concentração de crocina (25 $\mu\text{mol/L}$); o coeficiente angular da equação dessa reta indica a capacidade relativa do composto sob análise de interagir com os peroxi-radicaís.

Ao compararmos os resultados, os valores de inclinação da regressão linear do Trolox e do CcExt, considerando a ordem de eficiência, ou seja, as maiores capacidades antioxidantes foram: Trolox > CcExt (Figuras 7 e 8), com redução da velocidade do *bleaching* da crocina e, portanto, atividade antioxidante (Tabela 3). Na presença do CcExt observou-se que a velocidade do *bleaching* da crocina foi alterada, porém foram necessárias concentrações superiores do que as concentrações utilizadas de Trolox, o qual apresentou uma maior redução da velocidade do *bleaching* da crocina, ou seja, maior capacidade antioxidante. Fato este esperado, já que o Trolox é um padrão antioxidante eficiente e empregado em diversos estudos cujo objetivo é a análise antioxidante. Apesar do extrato CcExt ter apresentado menor ordem de eficiência, foi constatado na análise de *bleaching* da crocina a presença de atividade antioxidante importante, já que o extrato é composto de inúmeras substâncias, não isoladas, e ainda assim exerceu atividade antioxidante visível e interessante, realizando a captura dos radicais ROO, protegendo a crocina e

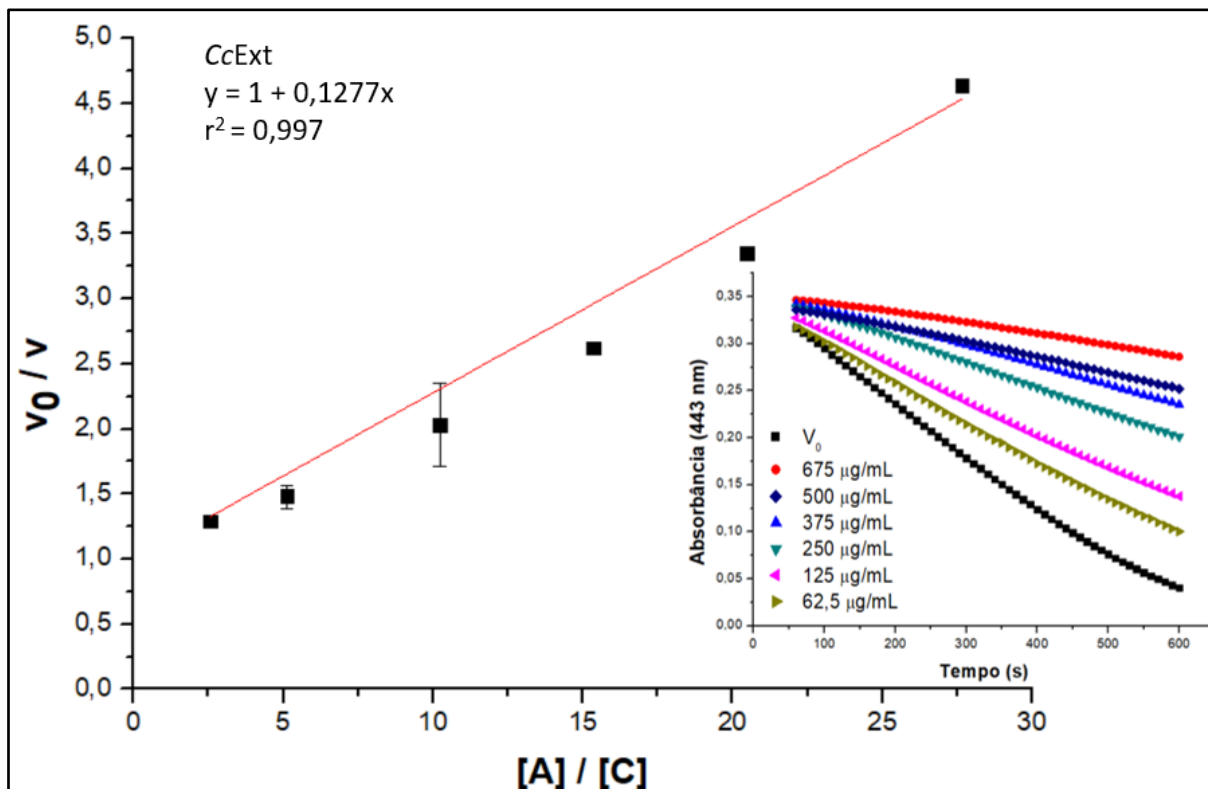
impedindo seu descolorimento. Por este método *in vitro* que simula o processo de lipoperoxidação no organismo, foi possível comprovar a eficácia deste extrato em capturar esta espécie reativa radicalar.

Figura 7 Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox.



V_0 , velocidade na ausência de Trolox; v , velocidade na presença de Trolox; $[C]$, concentração de crocina constante (24,4 $\mu\text{g/mL}$) e $[A]$, concentração de Trolox. O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) de Trolox ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo. Fonte: própria autora, 2021.

Figura 8 Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com CcExt



V_0 , velocidade na ausência de CcExt; v , velocidade na presença de CcExt; $[C]$, concentração de crocina constante (24,4 $\mu\text{g/mL}$) e $[A]$, concentração de CcExt ($\mu\text{g/mL}$). O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) de CcExt ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo. Fonte: própria autora, 2021.

Tabela 3 Equação de competição cinética entre CcExt e Trolox (padrão), comparação entre valores de coeficiente angular e EC₅₀, e comparação entre as capacidades de captura do radical peroxila em equivalentes de Trolox.

Amostras	Equação de competição cinética ($y=V_0/V$; $x=[A]/[C]$)*	r^2	Inclinação da regressão linear**	Equivalentes de Trolox***	EC ₅₀ (µg/mL)****
Trolox	$y=1+8,193x$	0,998	8,193	1,000	2,30
CcExt	$y=1+0,1277x$	0,997	0,1277	0,0156	288,40

*As análises foram realizadas de acordo com o descrito em material e métodos (item 3.3.2), onde $y=v_0/v$; $x=[A]/[C]$.

** A inclinação da regressão linear indica a capacidade antioxidante relativa da amostra (k_a/k_c); valores da inclinação da regressão linear em ordem decrescente de eficiência.

*** A equivalência ao Trolox foi obtida pelo quociente, das constantes de velocidade k_a/k_c (CcExt/Trolox).

**** Valores de EC₅₀, em ordem decrescente de eficiência, obtidos pela equação: %Inibição = $(1-(\Delta v / \Delta v_0)) \times 100$.

Observa-se que os valores obtidos para o CcExt em equivalentes de Trolox seguem a mesma ordem de eficiência, na qual o Trolox, cujo o equivalente foi igual a 1, mostrou maior potencial antioxidante do que o CcExt, com equivalente igual a 0,0156, valores estes obtidos pelo coeficiente angular na análise de competição cinética do CcExt e do Trolox. Portanto, quanto maior o valor de equivalentes de Trolox, mais eficiente é a amostra e sua ação antioxidante.

Também é possível ainda avaliar este ensaio utilizando o valor da porcentagem de inibição do clareamento da crocina (LUSSIGNOLI et al., 1999 e ASSIS, 2012), e desta forma determinar a concentração efetiva capaz de inibir 50% (EC₅₀) do *bleaching* da crocina. De acordo com a Tabela 3, é possível observar que os valores de EC₅₀ encontrados para o Trolox (2,30 µg/mL) e CcExt (288,40 µg/mL) seguiram a mesma ordem de eficiência dos valores obtidos nas análises anteriores (inclinação da regressão linear e equivalentes de Trolox). Sendo assim, quanto menor o valor de EC₅₀, mais eficiente é a amostra, enquanto que para a inclinação da regressão linear e equivalentes de Trolox, quanto maior o valor, mais eficiente é a ação antioxidante (Tabela 3).

Em estudo realizado por Santos (2020) foi realizada a investigação da atividade antioxidante do extrato etanólico de *C. chinense* pelos métodos ABTS (2,2'-azino-bis-(3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) e DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), os quais são métodos usualmente empregados na análise antioxidante, e também foi realizada a investigação pelo método FRAP (do inglês, *Ferric reducing antioxidante power*). Os resultados obtidos pelo estudo foram promissores, mostrando que o extrato etanólico de *C. chinense* apresentou potencial antioxidante para os métodos avaliados, com valores de EC₅₀ de 18,04 ± 2,79; 25,33 ± 2,84 e 128,58 ± 2,75 µg/mL, para os métodos DPPH, ABTS e FRAP, respectivamente.

De acordo com Morales-Soto et al. (2013), grande parte da ação antioxidante apresentada pelas pimentas do gênero *Capsicum* pode ser justificada pela presença dos compostos fenólicos totais, tais como o ácido ferúlico, ácido *p*-cumarínico, ácido vanílico, quercetina, entre outros. A promissora atividade antioxidante também se deve principalmente aos capsaicinoides como a capsaicina e di-hidrocapsaicina (NASCIMENTO et al., 2014).

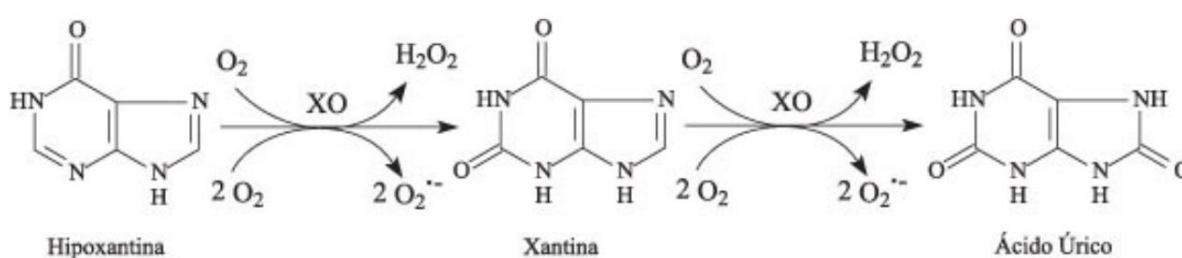
Em suma, a capacidade de inibição do clareamento da crocina pelo CcExt apresenta potencial para aplicação em posteriores estudos, reforçando que novos experimentos *in vitro* e/ou *in vivo* são necessários para verificar a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico, obtido a partir dos frutos de *C. chinense*, frente ao estresse oxidativo culminado por espécies reativas, que ocasionam ataques e consequentemente modificações oxidativas aos ácidos nucleicos, proteínas e outras importantes biomoléculas presentes no organismo.

4.2.3 Ensaio de captura do Ânion Superóxido

A produção do ânion superóxido (O₂^{•-}), espécie reativa de oxigênio, é essencial para a defesa de organismos vivos e atua na transferência de sinais entre células. Entretanto, a superprodução de O₂^{•-} causa estresse oxidativo apresentando efeitos deletérios tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, culminando em alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma, encontram-se envolvidos em diversas patologias a exemplo de envelhecimento precoce, doenças degenerativas entre outros (KAMO, 2004).

Xantina oxidase (XO) é a enzima responsável pela transformação tanto da hipoxantina em xantina, quanto desta em ácido úrico, tendo como consequência a produção de peróxido de hidrogênio e radical superóxido (Figura 9), por isso é considerada uma das principais fontes biológicas de espécies reativas de oxigênio. Assim, é possível que a inibição deste processo enzimático por compostos com propriedades antioxidante ou inibitória da xantina oxidase possam ter importância terapêutica.

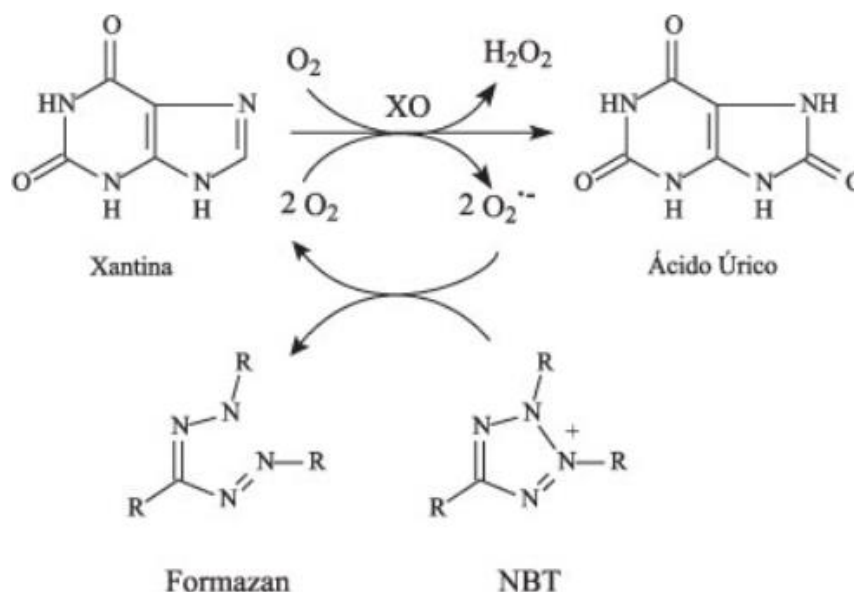
Figura 9 Conversão de hipoxantina a xantina, resultando na produção de ácido úrico



Fonte: ALVES, 2010.

A atividade de um elevado número de substâncias pode ser avaliada em relação a atividade sequestradora do radical superóxido ou através da inibição da ação da xantina oxidase. O $O_2^{\bullet-}$ pode ser gerado por diferentes sistemas enzimáticos, entre eles a reação catalisada pela enzima xantina oxidase, ou pelo sistema não enzimático através da reação de metassulfato de fenazina (PMS) com NADH e oxigênio molecular.

No método utilizado para avaliar a capacidade sequestradora, o radical $O_2^{\bullet-}$ produzido reduz nitroblue tetrazolium (NBT) a uma formazana em pH 7,4 e temperatura ambiente (Figura 10), e a geração da formazana é acompanhada por espectrofotometria pela mudança da coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura da formazana em 560 nm. As moléculas que atuam como antioxidante reagem com $O_2^{\bullet-}$ inibindo a produção da formazana. Gaulejac et al (1999) utilizaram este método para avaliar a atividade sequestradora do radical superóxido em vinho tinto, e concluíram que esta atividade, usualmente atribuída aos taninos procianídicos, está também relacionada às antocianinas presentes nesta bebida.

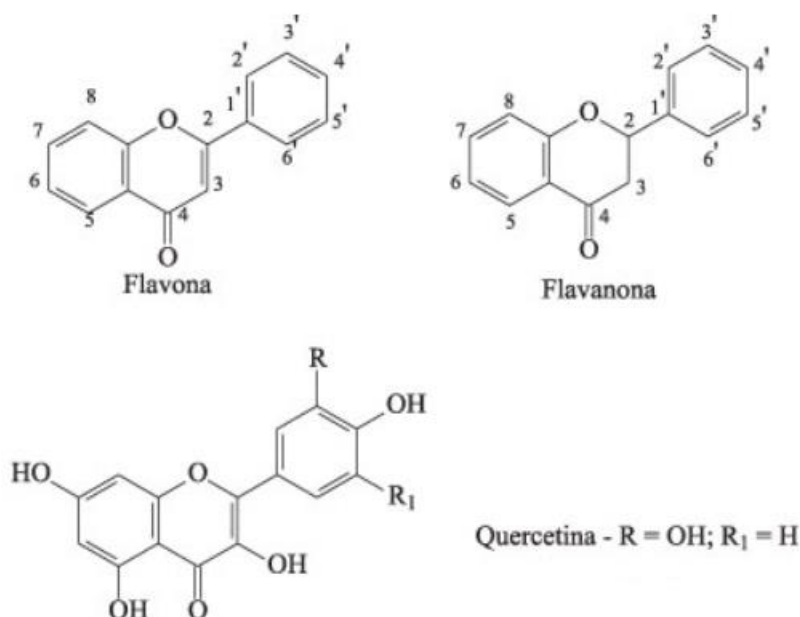
Figura 10 Produção de formazana a partir do NBT

Fonte: ALVES, 2010.

Cos et al. (1998) utilizaram esta metodologia para o estudo da atividade inibitória de flavonoides sobre a XO, sendo possível concluir que entre as flavonas e flavonóis a presença de grupos hidroxilas nas posições C-5 e C-7 eleva a ação inibitória. A substituição de grupos hidroxila por açúcares diminui a ação sobre a XO em relação às suas respectivas agliconas, demonstrando que as interações estéricas diminuem o efeito inibidor de flavonoides sobre a xantina oxidase. Um dos fatores determinantes na ação inibitória é a planaridade das moléculas. Com a presença da dupla ligação entre C-2 e C-3, os anéis estarão acoplados através da conjugação. A saturação desta dupla ligação eliminará a conjugação e a coplanaridade da molécula e, conseqüentemente, sua ação sobre a enzima. Além disso, aspectos importantes para atividade antioxidante de flavonoides são observados através da dupla ligação entre C-2 e C-3, número de hidroxila presentes nos anéis A, B e C e a presença de uma carbonila em C-4 (BARREIROS et al., 2006).

A ação antioxidante apresentada pelas pimentas do gênero *Capsicum* pode ser justificada pela presença dos compostos fenólicos totais, tais como o ácido ferúlico, ácido *p*-cumarínico, ácido vanílico, quercetina, entre outros. (MORALES-SOTO et al., 2013).

Figura 11 Estrutura dos flavonóides, como a quercetina



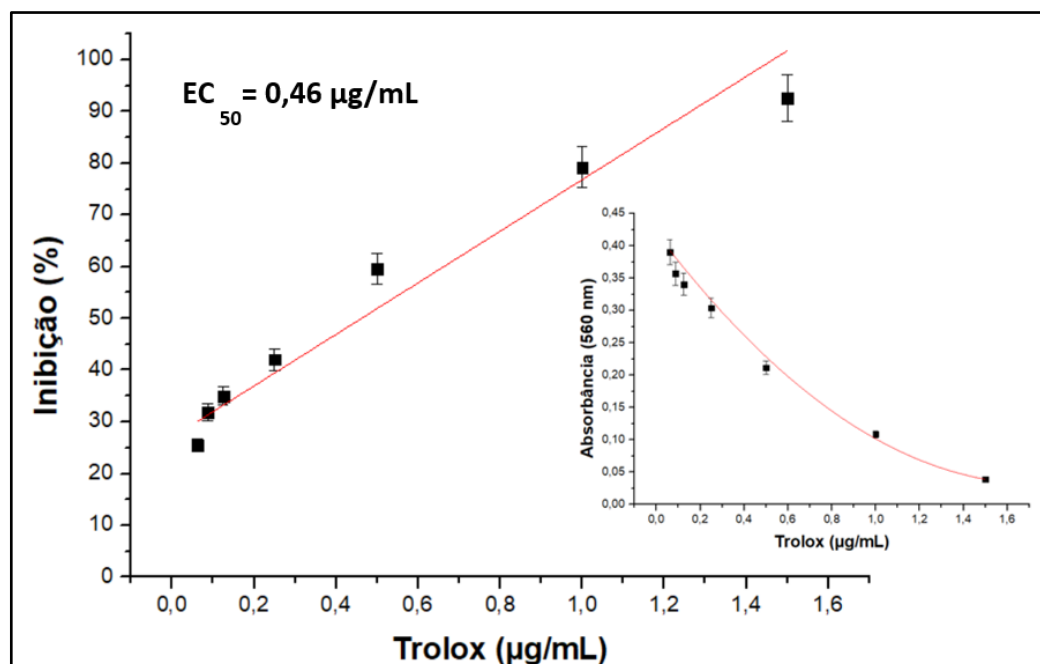
Fonte: ALVES, 2010.

Observando-se a estrutura da quercetina (Figura 11), é possível notar que as hidroxilas presentes nos anéis, bem como as insaturações e a presença de carbonila podem ser um dos fatores determinantes na ação inibitória desta sobre a xantina oxidase, contribuindo para a coplanaridade da molécula e, conseqüentemente, sua ação sobre a enzima.

No presente estudo, os resultados do ensaio da captura do $O_2^{\cdot-}$ foram expressos pela EC₅₀, os quais os padrões estudados Trolox e Quercetina, apresentaram EC₅₀ iguais a 0,46 e 22,43 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figuras 12 e 13). Demonstrando, desta forma, atividade antioxidante perante o radical $O_2^{\cdot-}$ e comprovando a importância de grupos hidroxílicos na inibição da formação de $O_2^{\cdot-}$. Em ordem crescente de EC₅₀ observou-se: Trolox < Quercetina, o que representa uma ordem decrescente de eficiência sobre o $O_2^{\cdot-}$, no qual o Trolox demonstra-se ser mais eficiente, pois quanto menor o valor de EC₅₀, mais eficiente é a amostra.

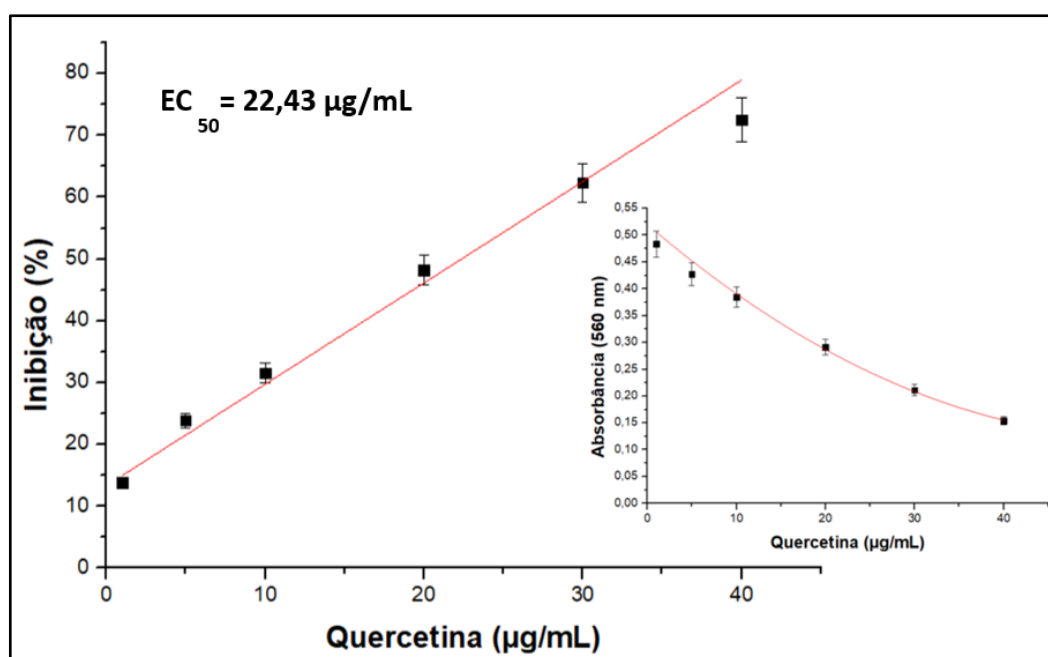
Os resultados obtidos estão em acordo com os dados descritos na literatura, os quais destacam como características importantes para atividade antioxidante de flavonoides a dupla ligação entre C-2 e C-3, o número de hidroxilas presentes nos anéis e a presença de carbonila.

Figura 12 Representação do perfil de captura do $O_2^{\cdot -}$ pelo Trolox



O gráfico inserido apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações de Trolox. Fonte: própria autora, 2021

Figura 13 Representação do perfil de captura do $O_2^{\cdot -}$ pela Quercetina



O gráfico inserido apresenta a média das absorbâncias da formazana na presença de diferentes concentrações de Quercetina. Fonte: própria autora, 2021

Para os CcExt, as concentrações analisadas variaram de 62,5 µg/mL até 1000 µg/mL. Porém nenhuma delas demonstrou capacidade significativa em capturar o ânion superóxido, ou seja, os valores de absorbância permaneceram semelhantes, na presença ou ausência dos CcExt, não sendo possível detectar porcentagem de inibição do $O_2^{\cdot-}$. Não sendo observado, desta forma, qualquer efeito sobre a captura do $O_2^{\cdot-}$, e uma hipótese para a ocorrência pode estar na composição do extrato, por não apresentar substâncias isoladas e sim uma mistura complexa de moléculas, o que pode ser determinante para a eficácia na inibição da ação da enzima xantina oxidase e contribuindo com os dados da literatura supracitados, os quais destacam que interações estéricas complexas podem reduzir o efeito inibidor de flavonoides sobre a xantina oxidase.

4.3 Estimativa dos níveis de AGE fluorescentes

Os AGE são considerados os produtos finais dos processos de glicação avançada de biomoléculas, sendo produzidos principalmente via processo de glicação de proteínas, e alguns destes AGE podem ser fluorescentes, quando excitados. O monitoramento dos AGE fluorescentes permite avaliar o grau de glicação de proteínas por diferentes carboidratos ou outros metabólitos (especialmente compostos dicarbonílicos), bem como os possíveis efeitos protetores apresentados por alguns compostos bioativos ou preparações com atividade antiglicação, incluindo a aminoguanidina (EMEL'YANOV, 2017), e de interesse deste estudo, o extrato hidroetanólico dos frutos de *C. chinense*.

Conforme representado nas Figuras 14 e 15, é possível observar baixos níveis de AGE fluorescentes nas incubações contendo BSA sozinha, em todos os tempos monitorados, em comparação às incubações de BSA com os agentes promotores da glicação, Gli ou MGO. Podemos supor que o oxigênio presente no meio de incubação, e a manutenção do sistema à temperatura de 37°C, sejam suficientes para promover uma baixa geração de AGE nas incubações contendo BSA sozinha. Sabe-se que a oxidação de proteínas pode levar à formação de AGE (CHETRYKIN et al., 2008). Outra hipótese seria a seguinte: na própria albumina pode existir uma quantidade mínima de AGE, mesmo antes do início das incubações (lembrando que a proteína foi isolada a partir de soro sanguíneo bovino); tal hipótese é reafirmada pelo fato de que

o sinal analítico de fluorescência dos AGE foi observado desde o tempo zero, isto é, antes do início das incubações.

Nas incubações de BSA na presença de Gli ou MGO, é possível verificar que a formação de AGE fluorescentes foi muito maior do que a formação de AGE nas incubações contendo BSA sozinha, corroborando com o fato de a Gli e o MGO serem agentes promotores de agressões glico-oxidativas, apresentando capacidade de reagir com proteínas e culminando na formação dos AGE. Os níveis de AGE fluorescentes na condição BSA+Gli ou BSA+MGO aumentaram progressivamente, com o passar do tempo de incubação. Após 10, 20 e 30 dias de incubação com Gli, os valores de AGE foram 460%, 523%, 561% maiores, respectivamente, em relação aos valores correspondentes na condição BSA sozinha (Figuras 14). Já na incubação com MGO, após 24, 48, 96 e 192 horas, os valores de AGE foram 549%, 573%, 670% e 782% maiores, respectivamente, em relação aos valores correspondentes na condição BSA (Figura 15), correspondendo ao fato de que o MGO é um potente agente promotor de glicação, onde em um intervalo inferior de tempo foi capaz de resultar em níveis mais elevados de AGE detectados nos meios de incubação.

Nas Figuras 14A e 15A, encontram-se os resultados relacionados à formação de AGE fluorescentes nas incubações da proteína BSA na presença do CcExt, na ausência de Gli ou MGO. Nas incubações de BSA+CcExt, em todas as concentrações estudadas (250, 125, 62,5 µg/mL) e nos tempos 0 a 30 dias (Figura 14A), ou 0 a 96 horas (Figura 15A), não foram observados aumentos nos AGE fluorescentes, cujos níveis permaneceram semelhantes àqueles encontrados nas incubações de BSA sozinha e BSA+AG.

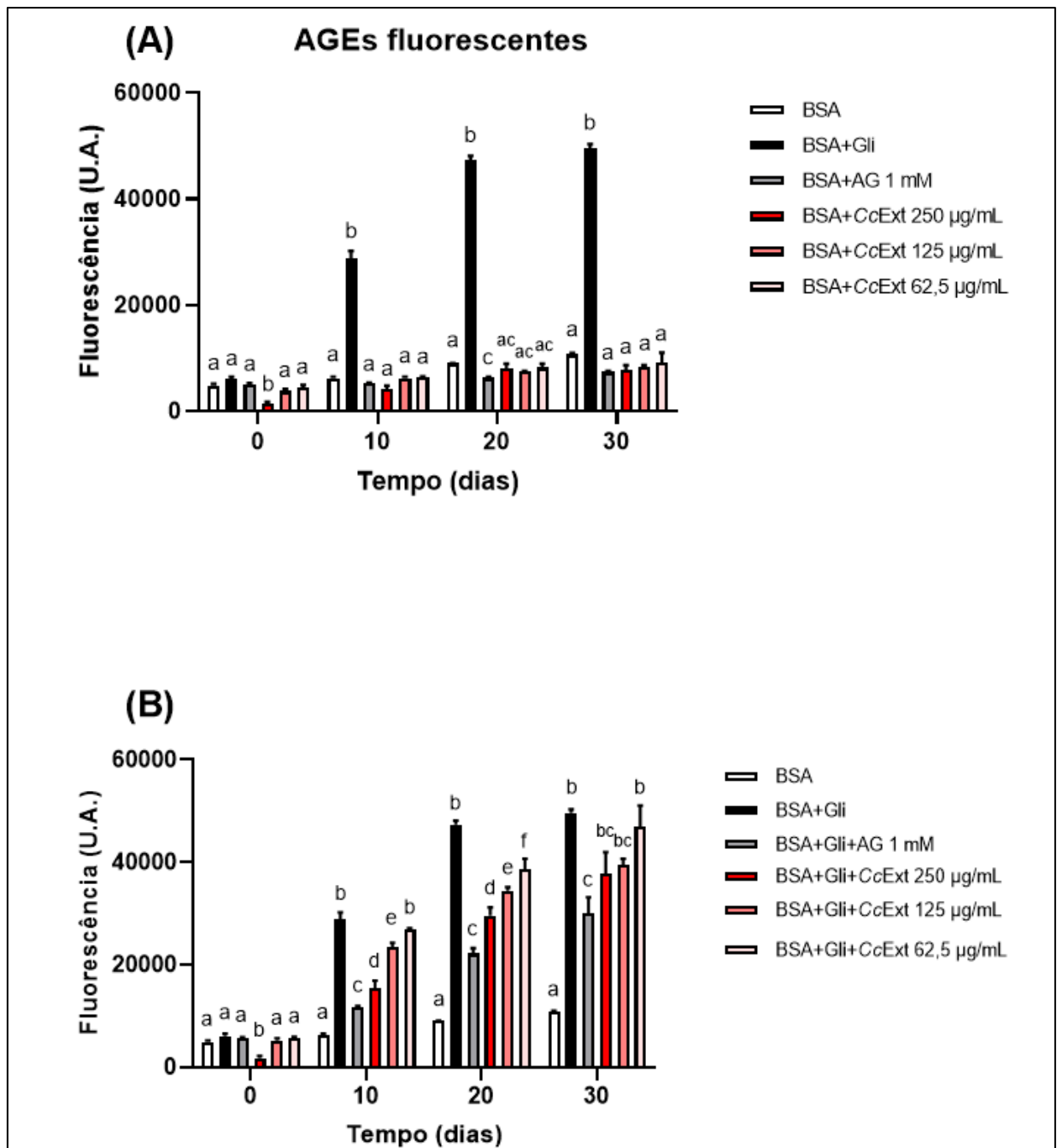
A aminoguanidina (AG) é um agente protótipo anti-AGE, muito reconhecido por seu potencial antiglicação. É capaz de reagir com compostos dicarbonílicos, tornando-os quimicamente inertes, e impedindo, então, a formação dos AGE (THORNALLEY, 2003). Observou-se que, no estudo com a glicose, nas incubações BSA+AG, houve um perfil tipo “platô” na formação de AGE, dos tempos 0 a 10 dias, não havendo diferenças estatísticas nos valores de AGE fluorescentes quando realizada a comparação BSA *versus* BSA+AG (Figura 14A). O mesmo ocorreu no estudo com MGO, com a adição de AG nas incubações de BSA houve diminuição na formação de AGE fluorescentes, durante todo o período de incubação. Observou-se que, nas incubações BSA+MGO+AG, houve um perfil de estabilização na formação de AGE, a partir do tempo 24 horas, não havendo diferenças estatísticas nos valores de AGE

fluorescentes quando realizada a comparação BSA *versus* BSA+MGO+AG, nos tempos 24, 48, 96 e 192 horas (Figura 15B). Isso sugere que a AG, quando incubada com BSA, conseguiu prevenir a formação de AGE.

No estudo dos impactos das incubações de *C. chinense* nos sistemas *in vitro* de glicação proteica, é interessante observar que, no tempo 192 horas, a intensidade de fluorescência dos AGE na condição BSA+CcExt na concentração de 250 µg/mL foi significativamente maior em relação aos níveis de AGEs nas incubações de BSA com CcExt nas demais concentrações estudadas, no mesmo dia de incubação, e até mesmo maior que os níveis de AGE das incubações BSA+CcExt na concentração de 250 µg/mL nos tempos de 0 a 96 horas (Figura 15A). Pode-se supor que, após 8 dias de incubação, interações entre componentes presentes no extrato de *C. chinense* com a proteína BSA tenham sido favorecidas, o que pode ter culminado na geração de compostos com capacidade de emissão de fluorescência no mesmo comprimento de onda utilizado para a análise dos AGE fluorescentes estudados no sistema-modelo *in vitro* de modificações glico-oxidativas. Situação semelhante foi observada em estudo de dos Santos e colaboradores (2019), ao incubarem a proteína BSA na presença de extrato hidroetanólico de caule de *Siolmatra brasiliensis*, na ausência do agente promotor de glicação (no caso desse estudo, a glicose), bem como nas incubações de BSA com a fração acetato de etila dessa mesma espécie vegetal.

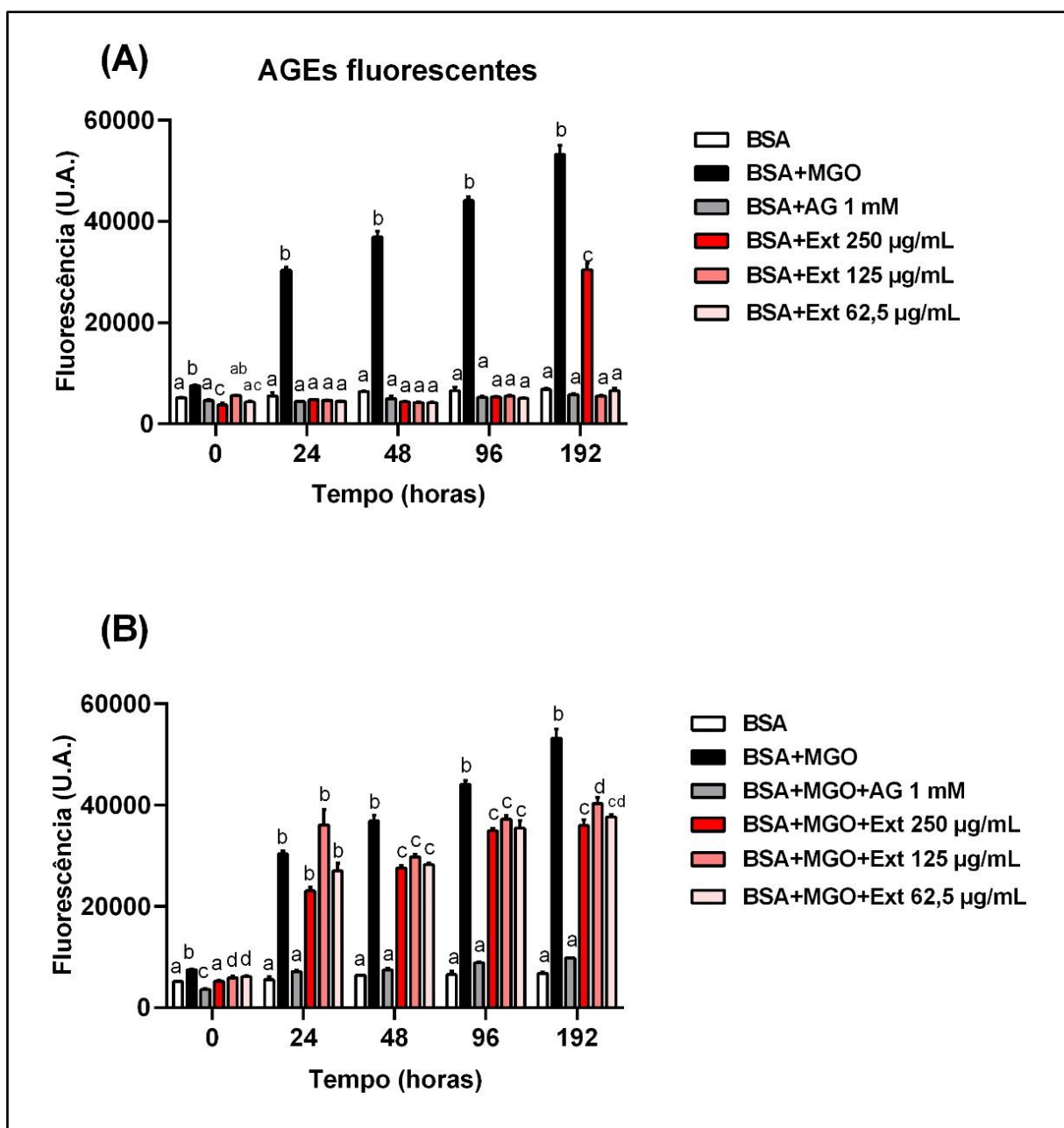
Ao observarmos resultados apresentados na Figura 14A, nota-se um comportamento distinto daquele observado na Figura 15A, apesar da condição de incubação ser a mesma, ou seja, em ausência dos agentes promotores de glicação, Gli ou MGO. No caso da Figura 14A, a intensidade de fluorescência relativa aos AGE na condição BSA+CcExt, na concentração de 250 µg/mL, foi igual em relação aos valores observados nas incubações BSA+CcExt nas demais concentrações estudadas, no mesmo dia de incubação, em praticamente todos os tempos estudados (0, 10, 20 e 30 dias). Pode-se supor que, devido ao intervalo de tempo maior de incubação (30 dias; Figura 14A), interações entre componentes presentes no extrato de *C. chinense* com a proteína BSA podem ter ocorrido, gerando compostos com capacidade de emissão de fluorescência no mesmo comprimento de onda utilizado para a análise dos AGE, tal como observado no tempo 192 horas (Figura 15A). Porém, a estabilidade desses compostos fluorescentes pode ser curta, de maneira que eles não permanecem no meio de incubação até o tempo de 30 dias.

Figura 14 Intensidade de fluorescência relativa aos AGE nas incubações de BSA (A) e BSA na presença de glicose (B) na ausência ou presença de AG ou de CcExt.



CcExt nas concentrações 250, 125 e 62,5 µg/mL, nos tempos 0, 10, 20 e 30 dias de incubação com glicose. Médias que não compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Fonte: própria autora, 2021.

Figura 15 Intensidade de fluorescência relativa aos AGEs nas incubações de BSA (A) e BSA na presença de MGO (B) na ausência ou presença de AG ou de CcExt.



CcExt nas concentrações 250, 125 e 62,5 µg/mL, nos tempos 0, 24, 48, 96 e 192 horas de incubação. Médias que não compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Fonte: própria autora, 2021.

As Figuras 14B e 15B apresentam os resultados relacionados à formação de AGE fluorescentes nas incubações da proteína BSA na presença de Gli ou MGO, respectivamente, e na presença de AG ou do extrato dos frutos de *C. chinense*.

A adição de AG nas incubações de BSA com glicose diminuiu a formação de AGEs fluorescentes, durante o período de incubação entre 10 e 30 dias.

Em relação aos efeitos do extrato, especialmente a partir de 10 dias de incubação, todas as concentrações de CcExt (250, 125 e 62,5 µg/mL) apresentaram efeitos atenuantes na formação de AGE fluorescentes, quando incubados na presença de BSA+Gli (Figura 14B), porém, apresentaram uma menor capacidade em inibir a formação de AGE em comparação ao efeito da AG, em todas as concentrações testadas e durante todo o período de incubação.

No entanto, observando-se os resultados no tempo 0, constata-se que nas incubações na presença de CcExt 250 µg/mL, tanto com BSA sozinha (Figura 14A) quanto BSA+Gli (Figura 14B), a intensidade de fluorescência dos AGE foi discretamente menor em relação à BSA sozinha ou BSA+AG ou BSA+Gli+AG. É sabido que algumas substâncias, especialmente polifenóis, são capazes de absorverem energia luminosa nos comprimentos de onda de excitação e/ou emissão utilizados para monitoramento de AGE fluorescentes (ANOVAR *et al.*, 2012). Assim, combinando-se (i) uma incubação com níveis muito baixos de AGE devido ao fato de ser o tempo 0, e (ii) uma incubação conduzida na maior concentração do extrato, portanto com maiores quantidades de substâncias/polifenóis, essa combinação de fatores pode ter favorecido o encontro de um baixo sinal analítico relacionado aos AGE nas incubações BSA+CcExt e BSA+Gli+CcExt, no tempo 0, o qual pode ser interpretado como uma interferência analítica. Porém, com o passar do tempo de incubação, essa interferência analítica é mitigada, e começam a prevalecer as ações anti-AGE e/ou anti-glicação de outras substâncias presentes no extrato CcExt; nos tempos 10, 20 e 30 dias de incubação, não é mais possível observar essa resposta inicial que o CcExt 250 µg/mL apresentou no tempo 0, especialmente nas incubações BSA+Gli+CcExt (Figura 14B). Ademais, essa diminuição do sinal analítico dos AGE (interferência analítica) não foi observada no tempo 0 para as concentrações de 125 e 62,5 µg/mL, isto provavelmente devido ao fato de serem concentrações menores do extrato. O mesmo foi observado para os outros marcadores, incluindo quinurenina (Figura 15), N'-formilquinurenina (Figura 16) e ditirosina (Figura 17), onde as

incubações na presença de CcExt na concentração de 250 µg/mL resultaram em menores sinais analíticos em relação à condição basal (BSA), no tempo 0.

Após 30 dias de incubação, CcExt 250 µg/mL, quando incubado na presença de BSA+Gli, foi capaz de diminuir em 38% a formação de AGE, em comparação aos valores de BSA+Gli. Já a presença de CcExt 125 µg/mL na incubação de BSA+Gli promoveu uma diminuição de 27% nos níveis de AGE fluorescentes em relação à condição BSA+Gli, após 20 dias. Por outro lado, neste mesmo período, podemos observar que a presença de CcExt 62,5 µg/mL na incubação de BSA+Gli promoveu diminuição de 18% nos níveis de AGE (Figura 14B). Tal como esperado, CcExt 250 µg/mL apresentou um potencial anti-AGE mais eficiente que CcExt nas concentrações de 125 e 62,5 µg/mL, por sua maior concentração, o que ocorreu em todos tempos, nos permitindo sugerir que a inibição na formação dos AGE pelo extrato de *C. chinense* ocorra de maneira dependente de concentração nas incubações de BSA na presença de glicose como agente promotor de glicação.

Observando os resultados relacionados à formação de AGE fluorescentes nas incubações da BSA na presença de MGO e do CcExt, a partir de 48 horas de incubação, as concentrações do CcExt (250, 125 e 62,5 µg/mL) apresentaram efeitos atenuantes na formação de AGE fluorescentes, quando incubados na presença de BSA+MGO (Figura 15B), mas apresentaram uma capacidade diminuída em inibir a formação de AGE em comparação ao efeito da AG, em todas as concentrações e por todo o período de incubação.

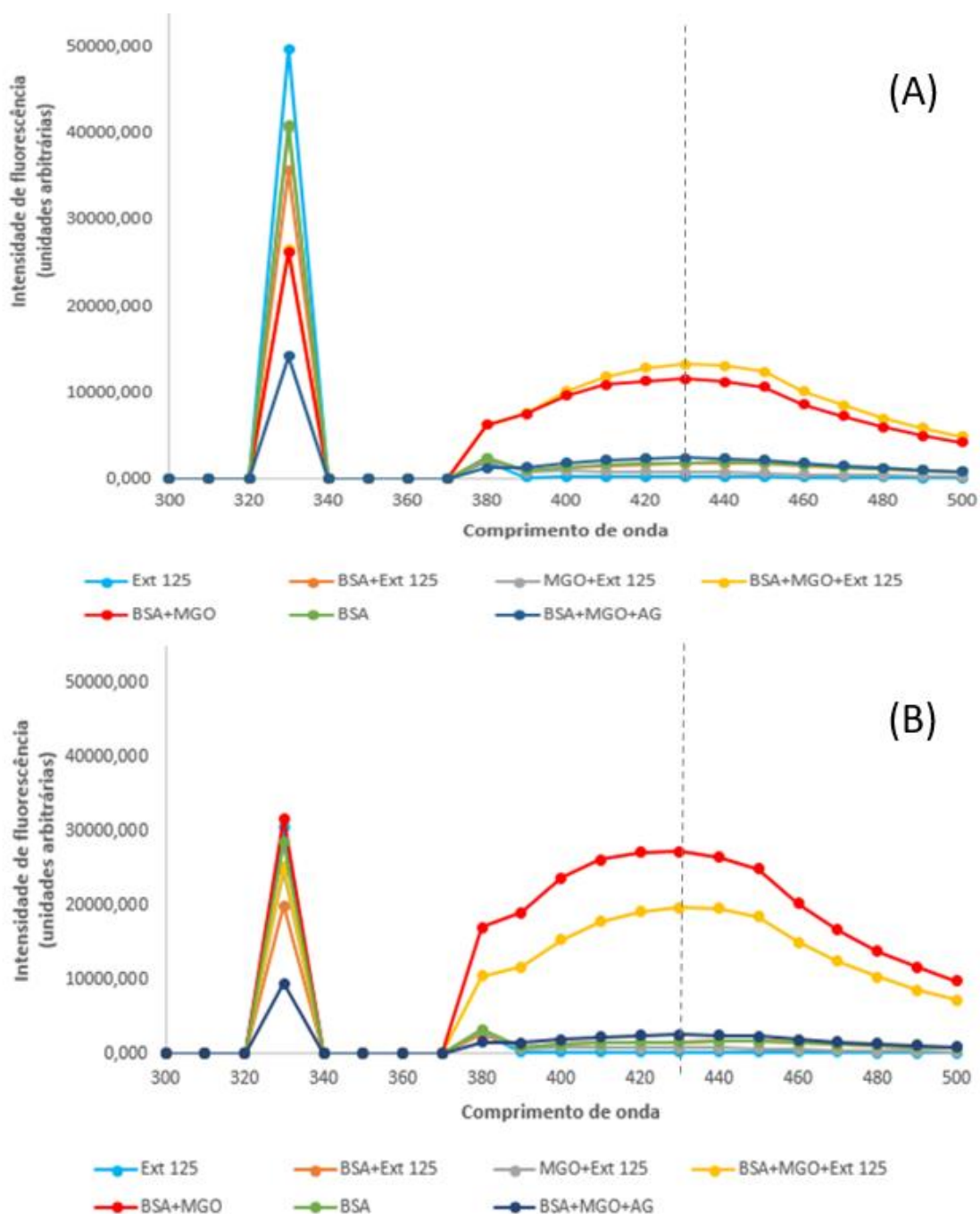
Ao decorrer 48 horas de incubação, CcExt 250 µg/mL, incubado com BSA+MGO, foi capaz de diminuir em 25% a formação de AGE, em comparação aos valores de BSA+MGO. Já o CcExt 62,5 µg/mL na incubação de BSA+MGO promoveu uma diminuição de 23% nos níveis de AGE fluorescentes em relação à condição BSA+MGO, após 48 horas. Porém, neste mesmo período, podemos observar que a presença de CcExt 125 µg/mL na incubação de BSA+MGO promoveu diminuição de 19% nos AGE (Figura 15B). Apesar de aparentemente ser esperado que o CcExt 125 µg/mL tenha um potencial anti-AGE mais eficiente que o CcExt 62,5 µg/mL, por sua maior concentração, não foi o que ocorreu em nenhum dos tempos, nos permitindo sugerir que a inibição na formação dos AGE pelo extrato de *C. chinense*, na incubação com MGO, não ocorra de maneira dependente de concentração. Na Figura 15B, também é possível observar que, no tempo 24 horas e na incubação de BSA+MGO na presença de CcExt 125 µg/mL, a intensidade de fluorescência dos AGE foi

discretamente maior em relação à BSA+MGO. Podemos sugerir que, no tempo de 24 horas, compostos presentes em CcExt 125 µg/mL podem ter interagido com o MGO e gerado substâncias capazes de emitirem no mesmo comprimento de onda de emissão dos AGE gerados pelo sistema BSA+MGO, emitindo, portanto, um sinal fluorescente à 430 nm, quando excitados à 355 nm.

Essa hipótese é corroborada por dois achados do presente estudo: (i) espectro de emissão do CcExt 125 µg/mL ao ser incubado com BSA+MGO no tempo 24 horas; a emissão à 430 nm foi discretamente maior que aquela do sistema BSA+MGO (Figura 16A); (ii) valor de emissão relativa aos AGE quando CcExt 125 µg/mL foi incubado com BSA sozinha, sem MGO, após 24 horas (Figura 15A); não foi observado um valor de fluorescência maior, em relação aos valores das incubações de BSA com CcExt 250 ou 62,5 µg/mL, no mesmo período de tempo (24 horas), sugerindo que provavelmente não ocorram interações de BSA com componentes de CcExt 125 µg/mL que culminem na geração de substâncias que emitem fluorescência à 430 nm.

Com o passar do tempo, essa provável interação entre componentes de CcExt 125 µg/mL com o MGO pode ter diminuído a capacidade de interação do agente promotor da glicação (MGO) com a proteína BSA, diminuindo assim a geração de AGE pelo sistema-modelo *in vitro*, fazendo com que o potencial anti-AGE dessa concentração de CcExt fosse relativamente semelhante às concentrações de 250 e 62,5 µg/mL, nos tempos 48, 96 e 192 horas (Figura 15B). Pode-se observar que, no tempo de 48 horas, por exemplo, a capacidade de emissão de CcExt 125 µg/mL no comprimento de onda de 430 nm foi menor em relação ao sistema BSA+MGO (Figura 16B).

Figura 16 Espectro de emissão do CcExt na concentração de 125 µg/mL, nos tempos 24 horas (A) e 48 horas (B) de incubação.



Destaca-se que 430 nm se refere ao comprimento de onda utilizado para o monitoramento da emissão do AGEs quando excitados a 355 nm. Fonte: própria autora, 2021

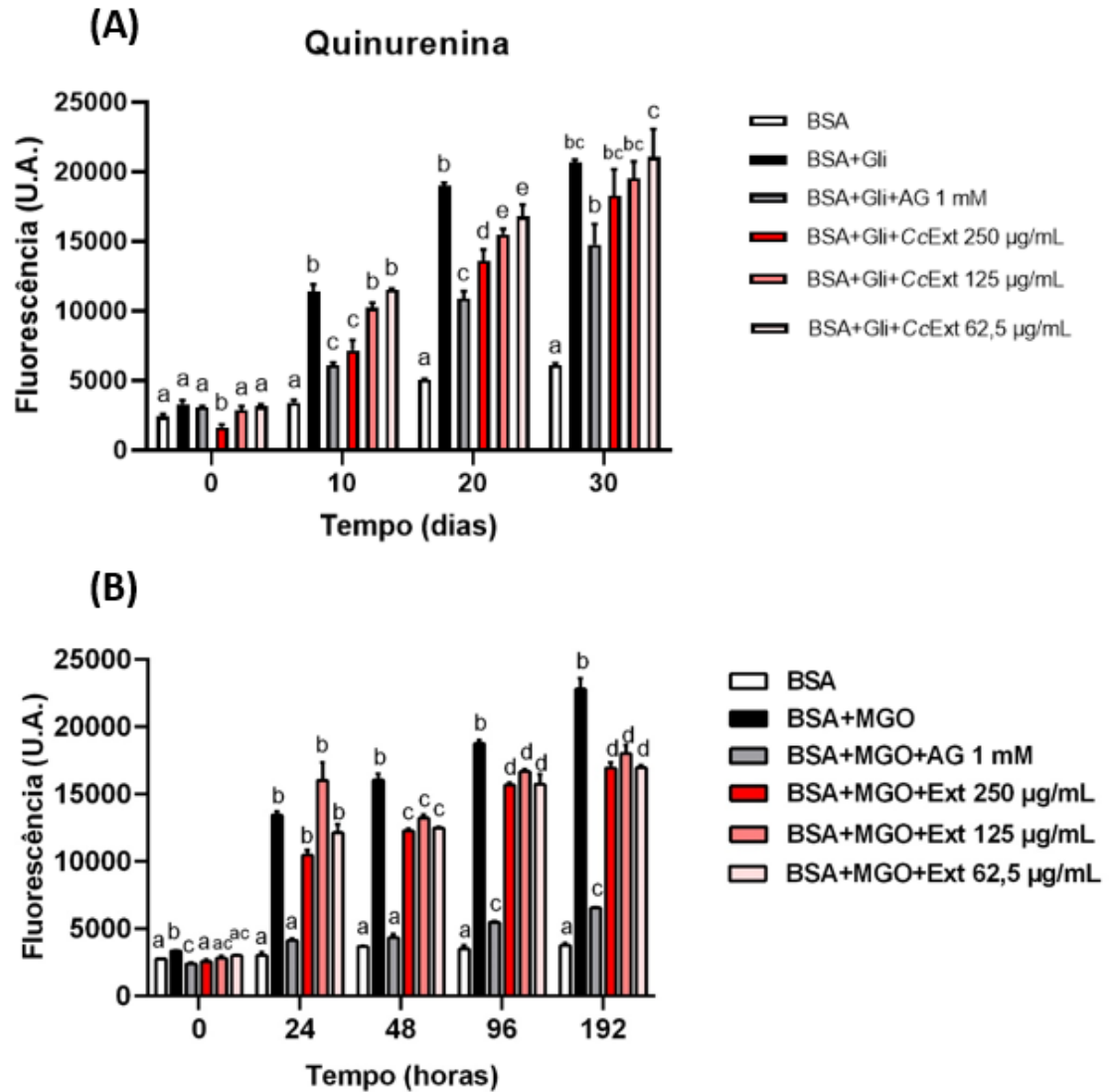
4.4 Estimativa dos níveis dos produtos de oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano

Os resíduos de aminoácidos em proteínas, incluindo o triptofano, estão sujeitos a oxidação sob condições fisiológicas, e de forma mais acelerada em indivíduos diabéticos. Dentre os produtos de oxidação do triptofano, tem-se a N'-formilquinurenina e a quinurenina. Outro aminoácido passível de oxidação é a tirosina, formando a ditirosina, onde sua formação é dependente da proximidade de duas cadeias laterais de resíduos de tirosina em proteínas (ALDINI, et al, 2010).

Acompanhando o mesmo perfil de resposta relacionado à formação de AGE fluorescentes no sistema-modelo *in vitro* de modificações glico-oxidativas, houve um aumento progressivo nas taxas de oxidação dos resíduos de triptofano nas incubações de BSA+Gli ou BSA+MGO, monitorado pelos aumentos na formação de quinurenina (Figura 17) e de N'-formilquinurenina (Figura 18). Também foi observado um aumento progressivo nas taxas de oxidação dos resíduos de tirosina nas incubações de BSA+Gli, monitorado pelo aumento na formação de ditirosina (Figura 19). Após 10 dias de incubação, no sistema BSA+Gli, os níveis de quinurenina, N'-formilquinurenina e ditirosina foram 345%, 455% e 544% maiores, respectivamente, em relação aos valores correspondentes desses biomarcadores nas incubações de BSA sozinha. Já após 24 horas de incubação, no sistema BSA+MGO, os níveis de quinurenina, N'-formilquinurenina e ditirosina foram 400%, 456% e 512% maiores, respectivamente, em comparação aos valores correspondentes de BSA sozinha.

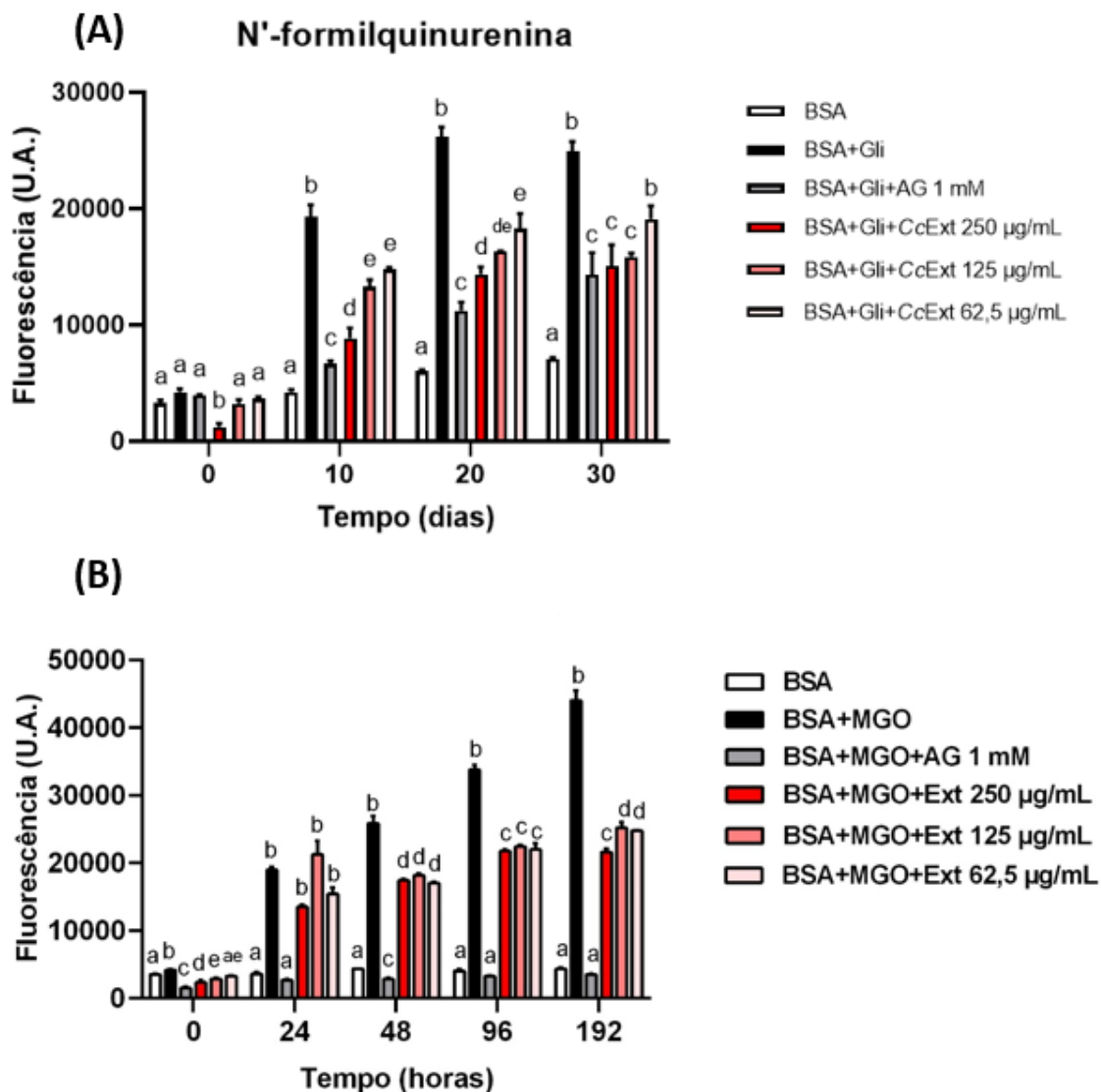
A adição de aminoguanidina nas incubações de BSA+Gli e BSA+MGO impediu a formação dos produtos de oxidação quinurenina (Figura 17), N'-formilquinurenina (Figura 18), e de ditirosina (Figura 19), exceto para os tempos 20 e 30 dias de incubação com glicose (Figuras 17A, 18A e 19A), e para a quinurenina nos tempos 96 e 192 horas de incubação com MGO (Figuras 17B), onde foram encontrados pequenos aumentos nos níveis desses marcadores, porém esses ainda foram menores em comparação aos valores encontrados nas incubações de BSA+Gli e BSA+MGO sem a adição do agente anti-AGE.

Figura 17 Intensidade de fluorescência relativa à quinurenina nas incubações de BSA com glicose ou com MGO, na ausência ou presença de AG ou de CcExt.



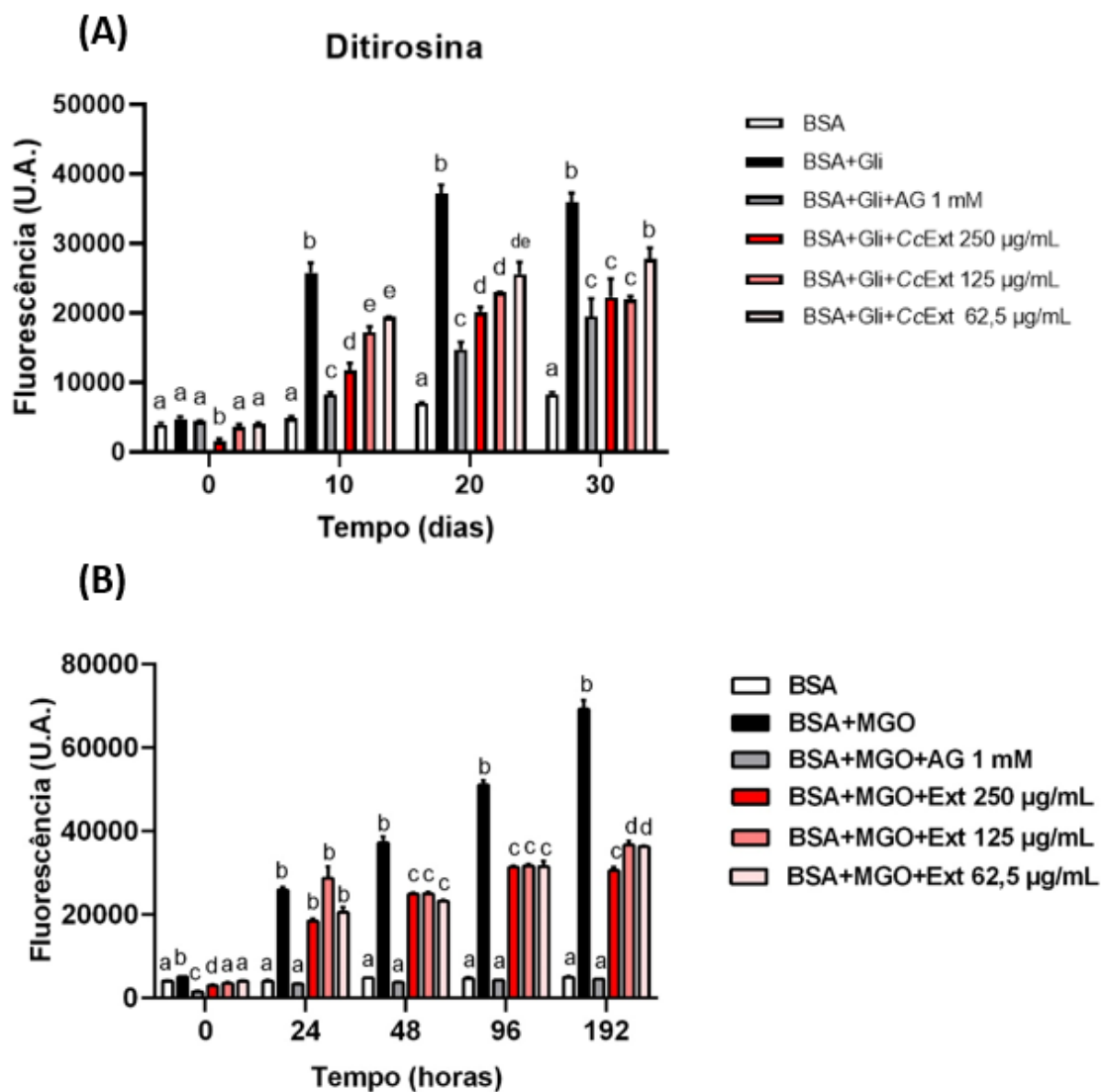
Extrato hidroetanólico dos frutos de *Capsicum chinense* nas concentrações 250, 125 e 62,5 µg/mL, nos tempos 0, 10, 20 e 30 dias de incubação com glicose (A), e 0, 24, 48, 96 e 192 horas de incubação com MGO (B). Médias que não compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Fonte: própria autora, 2021.

Figura 18 Intensidade de fluorescência relativa à N'-formilquinurenina nas incubações de BSA com glicose ou com MGO, na ausência ou presença de AG ou de CcExt.



Extrato hidroetanólico dos frutos de *Capsicum chinense* nas concentrações 250, 125 e 62,5 µg/mL, nos tempos 0, 10, 20 e 30 dias de incubação com glicose (A), e 0, 24, 48, 96 e 192 horas de incubação com MGO (B). Médias que não compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Fonte: própria autora, 2021.

Figura 19 Intensidade de fluorescência relativa à ditirosina nas incubações de BSA com glicose ou com MGO, na ausência ou presença de AG ou de CcExt.



Extrato hidroetanólico dos frutos de *Capsicum chinense* nas concentrações 250, 125 e 62,5 µg/mL, nos tempos 0, 10, 20 e 30 dias de incubação com glicose (A), e 0, 24, 48, 96 e 192 horas de incubação com MGO (B). Médias que não compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Fonte: própria autora, 2021.

A adição do extrato dos frutos de *C. chinense* nas três concentrações estudadas às incubações de BSA+Gli ou BSA+MGO foi capaz de diminuir a formação de quinurenina (Figura 17), N'-formilquinurenina (Figura 18) e ditirosina (Figura 19), em relação à condição BSA+Gli ou BSA+MGO. Porém, vale destacar que o agente AG, que é um composto protótipo anti-AGE, apresentou uma capacidade de inibição mais acentuada em comparação ao extrato, em todos os tempos monitorados. Enquanto que a AG foi capaz de diminuir a formação de N'-formilquinurenina em 43%, no tempo 30 dias em relação à BSA incubada com glicose, CcExt nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL diminuiu em 40%, 37% e 24%, respectivamente, os níveis de N'-formilquinurenina nas incubações de BSA com glicose (Figura 18A). Em relação à BSA incubada com MGO, a AG diminuiu a formação de N'-formilquinurenina em 92%, no tempo 192 horas, e CcExt nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL diminuiu em 51%, 43% e 44% a formação deste biomarcador (Figura 18B).

O mesmo raciocínio vale para as incubações de CcExt com BSA+Gli, para os marcadores quinurenina e ditirosina. Após 30 dias de incubação, os níveis de quinurenina foram 12% e 6% menores, respectivamente, nas incubações de BSA+Gli contendo 250 e 125 de CcExt e ausente de proteção na incubação de BSA+Gli com 62,5 µg/mL de CcExt (Figura 17A). Já para ditirosina, a adição de 250, 125 e 62,5 µg/mL de CcExt no sistema BSA+Gli diminuiu os níveis de ditirosina em 38%, 39% e 23%, respectivamente, após 30 dias de incubação (Figura 19A).

Após 192 horas de incubação, os níveis de quinurenina foram 26%, 21% e 25% menores, respectivamente, nas incubações de BSA+MGO contendo 250, 125 e 62,5 µg/mL de CcExt (Figura 17B). Já para ditirosina, as concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL de CcExt no sistema BSA+MGO diminuiu os níveis desse biomarcador em 56%, 47% e 48%, respectivamente, no tempo 192 horas de incubação (Figura 19B).

Assim, é possível observar o efeito protetor antioxidante *in vitro* do extrato de *C. chinense* na atenuação da formação dos produtos de oxidação dos resíduos de aminoácidos. Além disso, observa-se que, nos tempos estudados, a ação antioxidante *in vitro* do extrato de *C. chinense* não foi dependente de sua concentração.

Resultados de HSIA *et al.* (2016) corroboram nossos achados relacionados ao potencial anti-AGE do extrato hidroetanólico dos frutos de *C. chinense*. No estudo de HSIA *et al.* (2016), foram demonstrados os efeitos da capsaicina na glicação de proteínas e na formação subsequente dos produtos finais de glicação avançada, os AGE. A capsaicina é uma substância de elevada pungência presente nas pimentas,

tais como nas pimentas do gênero *Capsicum*, Ensaios de glicação proteica *in vitro* demonstraram que a presença da capsaicina diminuiu os níveis de marcadores dos estágios finais de glicação e a formação de *cross-linking* proteico. Além disso, foi sugerido nesse estudo que o potencial da capsaicina de promover a captura de espécies radicalares pode contribuir para os seus efeitos antiglicantes (HSIA *et al.*, 2016). No mesmo estudo, utilizando ratos com hiperglicemia crônica devido ao diabetes mellitus induzido por estreptozotocina, após 12 semanas de administração de capsaicina aos animais diabéticos, houve uma diminuição nos níveis circulantes de AGE. Os níveis de biomarcadores oxidativos e de danos ao DNA de linfócitos também foram minimizados nos grupos de animais diabéticos tratados com capsaicina, em comparação ao grupo de animais diabéticos não tratados (HSIA *et al.*, 2016). Assim, fica demonstrado que a capsaicina, presente nas pimentas do gênero *Capsicum*, possui o potencial de contribuir para o alívio do estresse oxidativo em indivíduos diabéticos, sendo um promissor agente antiglicação de origem natural.

4.5 Determinação da formação de *cross-linking* proteico

A glicação de proteínas leva a uma série de alterações estruturais, dentre elas a formação de *cross-linking*. O *cross-linking* refere-se à formação de ligações cruzadas de AGE envolvendo resíduos de aminoácidos das proteínas, em especial arginina e lisina, e tem sido usado como um índice para o estudo dos eventos tardios relacionados à glicação de proteínas (NEMET *et al.*, 2011; EMEL'YANOV, 2017; HSIA *et al.*, 2016).

A formação do *cross-linking* proteico pode ser visualizada através da formação de uma banda superior à posição de BSA (66 KDa) na eletroforese, podendo essa ser mais ou menos intensa de acordo com as taxas de modificações glico-oxidativas promovidas pelo agente agressor.

Na Figura 20 podem ser encontrados os resultados obtidos no estudo da formação do *cross-linking* proteico no tempo 30 dias de incubação de BSA ou BSA+Gli na ausência ou presença de extrato hidroetanólico dos frutos de *Capsicum chinense*.

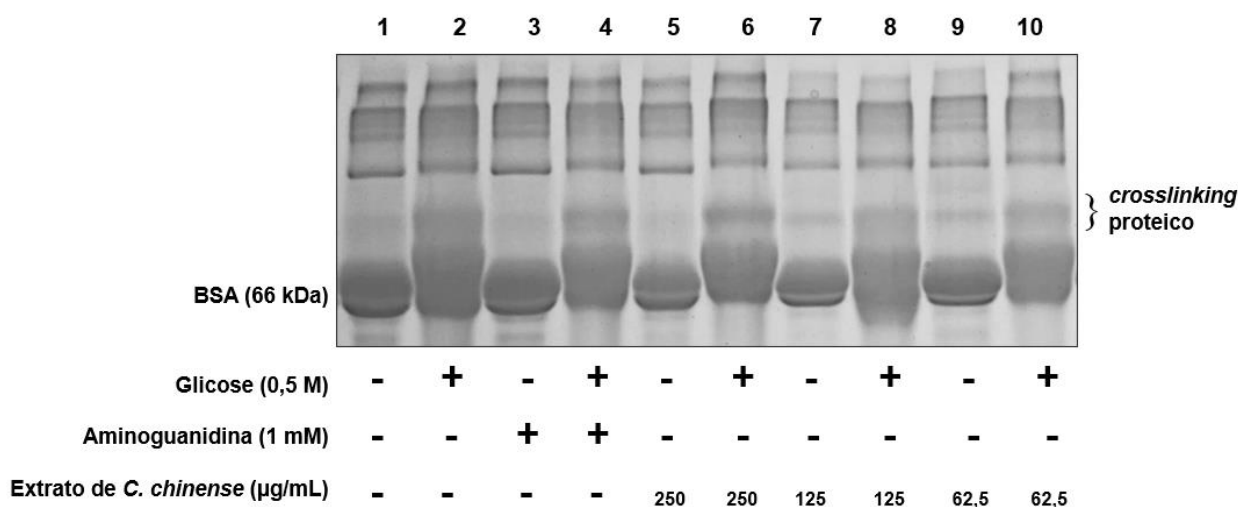
Podemos observar que houve a formação de *cross-linking* proteico em todas as condições onde glicose está presente nas incubações com BSA, sendo a intensidade de formação de *cross-linking* mais branda nas incubações conduzidas na ausência de

glicose e muito mais intensa com a presença da glicose. Porém, até mesmo nas incubações de BSA sozinha, nota-se discreta presença de *cross-linking* proteico. Sendo assim, incubações de BSA na presença de glicose levou a uma maior formação de *cross-linking* proteico, em comparação às incubações de BSA sem o agente glicativo.

Considera-se que a intensidade da banda do *cross-linking* proteico está diretamente relacionada às taxas de glicação proteica e dos eventos subsequentes. O sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* baseado na incubação de BSA com glicose foi capaz de promover alterações na estrutura da albumina que culminaram na formação de *cross-linking*, pois quando comparadas as condições de incubação de BSA realizadas na ausência (linha 1, Figura 20) e na presença de glicose (linha 2, Figura 20), é possível observar a formação de uma “nova banda”, mais intensa e espalhada, logo acima da posição da proteína albumina (66 kDa), após 30 dias de incubação. Este fenômeno representa o surgimento de ligações cruzadas entre proteínas (*cross-linking*) (LIU e JING, 2016; HSIA et al., 2016).

Nas amostras obtidas a partir das incubações de BSA na presença de CcExt, nas diferentes concentrações estudadas e na ausência de glicose, podemos observar que o extrato por si só não promoveu formação do *cross-linking* proteico; portanto, qualquer formação de *cross-linking* observada nesse estudo foi considerada ocorrer somente em decorrência das modificações em BSA promovidas pela glicose (Figura 20).

Figura 20 Formação de *cross-linking* proteico nas incubações de BSA com glicose, na ausência ou presença de AG ou de CcExt



Extrato hidroetanólico dos frutos de *Capsicum chinense* nas concentrações 250, 125 e 62,5 µg/mL, no tempo 30 dias de incubação. Linhas: 1- BSA; 2- BSA+Gli; 3- BSA+AG; 4- BSA+Gli+AG; 5- BSA+CcExt250; 6- BSA+Gli+CcExt250; 7- BSA+CcExt125; 8- BSA+Gli+CcExt125; 9- BSA+CcExt62,5; 10- BSA+Gli+CcExt62,5. Fonte: própria autora, 2021.

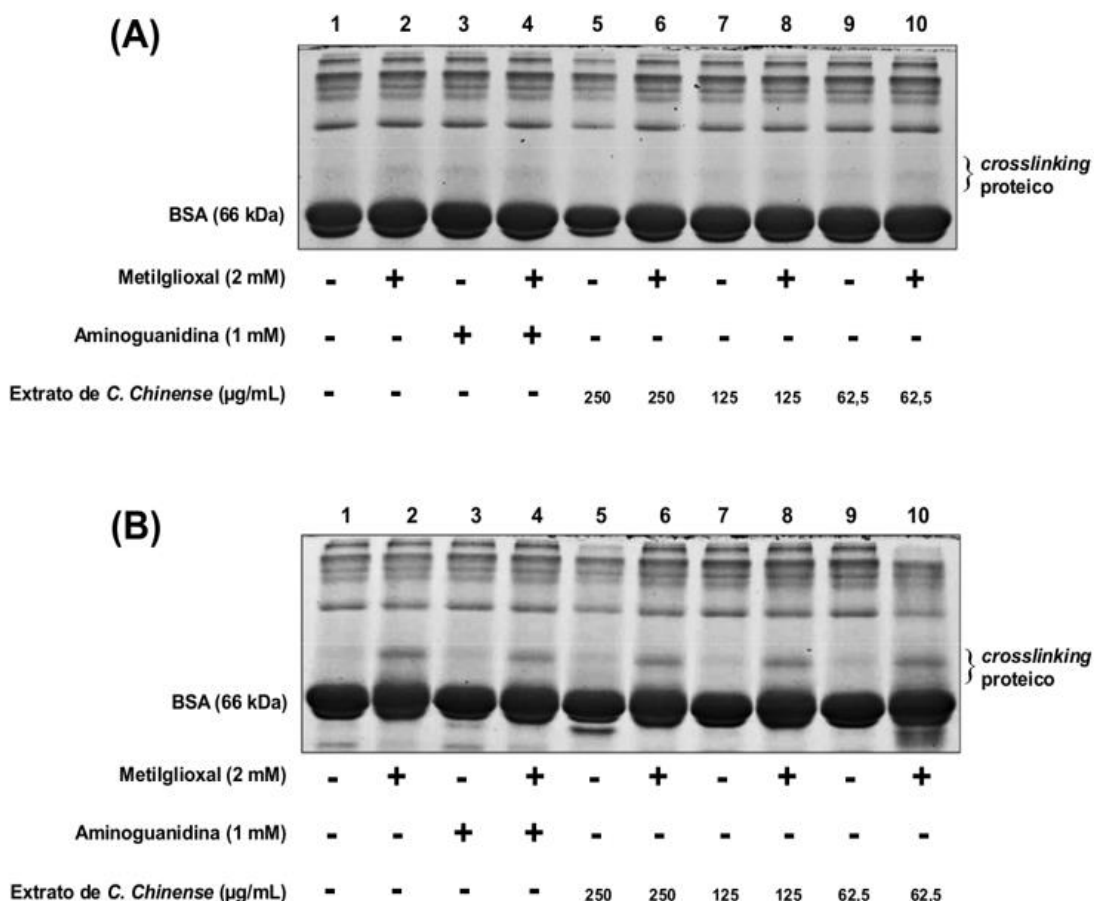
Pela análise dos resultados observados de formação de *cross-linking* proteico, é possível observar que houve discreta diminuição na formação de *cross-linking* proteico na condição BSA+Gli+AG, após 30 dias de incubação (linha 4, Figura 20) quando comparada com a condição BSA+Gli (linha 2, Figura 20), corroborando os demais resultados relacionados ao potencial anti-AGE da aminoguanidina.

Incubações de BSA+Gli na presença de CcExt nas concentrações de 250 µg/mL (linha 6, Figura 20) e 125 µg/mL (linha 8, Figura 20) também apresentaram discreta diminuição na formação do *cross-linking* proteico, sendo que na concentração de 250 µg/mL do extrato, a atenuação na formação do *cross-linking* foi mais evidente. Nas amostras obtidas de BSA+Gli incubadas com CcExt na concentração de 62,5 µg/mL também foi possível observar inibição na formação de *cross-linking* (linha 10, Figura 20).

Foi possível observar que existe uma tendência de inibição na formação do *cross-linking* proteico em amostras de BSA incubada com glicose na presença dos extratos dos frutos da pimenta *C. chinense* nas concentrações de 250 e 125 µg/mL,

correspondendo a uma proteção discreta, assim como observada na proteção promovida pela AG.

Figura 21 Formação de *cross-linking* proteico nas incubações de BSA com MGO na ausência ou presença de AG ou de CCExt



Extrato hidroetanólico dos frutos de *Capsicum chinense* nas concentrações 250, 125 e 62,5 µg/mL, nos tempos 0 (A) e 192 horas (B) de incubação. Linhas: 1- BSA; 2- BSA+MGO; 3- BSA+AG; 4- BSA+MGO+AG; 5- BSA+CcExt250; 6- BSA+MGO+CcExt250; 7- BSA+CcExt125; 8- BSA+MGO+CcExt125; 9- BSA+CcExt62,5; 10- BSA+MGO+CcExt62,5.

Fonte: própria autora, 2021

Na Figura 21 são observados os resultados obtidos no estudo da formação do *cross-linking* proteico nos tempos 0 (Figura 21A) e 192 horas (Figura 21B) de incubação de BSA ou BSA+MGO na ausência ou presença de CcExt.

É possível observar que ocorreu a formação de *cross-linking* proteico em todas as condições onde MGO está presente nas incubações com BSA, sendo a intensidade de formação de *cross-linking* mais branda no tempo 0 (Figura 21A) e muito mais intensa no tempo 192 horas (Figura 21B) de incubação. No entanto, assim como na incubação com glicose, até mesmo nas incubações de BSA sozinha, nota-se discreta presença de *cross-linking* proteico. Incubações de BSA na presença de MGO levou a uma formação mais acentuada de *cross-linking* proteico, em comparação às incubações de BSA sem o agente glicativo.

Sabendo-se que a intensidade da banda do *cross-linking* proteico está diretamente relacionada às taxas de glicação proteica e dos eventos subsequentes, a incubação de BSA com MGO também culminou em alterações na estrutura da albumina que resultaram na formação de *cross-linking*, pois quando observadas as condições de incubação de BSA realizadas na ausência (linha 1, Figura 21B) e na presença de MGO (linha 2, Figura 21B), é possível observar a formação de uma banda mais intensa e espalhada, logo acima da posição da proteína albumina (66 kDa), após 192 horas de incubação, representando o *cross-linking* (ligações cruzadas) entre proteínas (LIU e JING, 2016; HSIA et al., 2016).

Nas amostras resultantes das incubações de BSA na presença de CcExt, nas diferentes concentrações estudadas e na ausência de MGO, é possível analisar que a presença do extrato não culminou na formação do *cross-linking* proteico; portanto, qualquer formação de *cross-linking* observada nesse estudo foi considerada ocorrer somente em decorrência das modificações promovidas pelo MGO (Figura 21).

Parece existir uma tendência de inibição na formação do *cross-linking* proteico em amostras de BSA incubada com MGO na presença dos extratos dos frutos da pimenta *C. chinense* nas concentrações de 250 e 125 µg/mL (linhas 6 e 8 respectivamente, Figura 21B), correspondendo a uma proteção discreta, assim como observada na proteção promovida pela AG (linha 4, Figura 21B).

Por fim, os resultados relacionados ao estudo da formação do *cross-linking* proteico no sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* baseado na incubação de BSA+Gli e BSA+MGO corroboram os resultados relacionados à estimativa da formação de AGE fluorescentes e dos produtos de oxidação dos

resíduos de tirosina e triptofano. Em relação ao potencial anti-AGE e antioxidante *in vitro* do extrato hidroetanólico dos frutos de *C. chinense*, observamos que as ações de CcExt foram promissoras. A adição de CcExt às incubações de BSA+Gli e de BSA+MGO inibiu a formação de AGEs, N'-formilquinurenina, quinurenina e ditirosina (com tendência a não dependência de concentração), e discretamente diminuiu a formação de *cross-linking* proteico.

No estudo de HSIA e colaboradores (2016), foi demonstrado que os AGE se formam principalmente em proteínas de meia-vida longa e, por vezes, apresentam características fluorescentes. Os grupos amino primários presentes nos resíduos de aminoácidos dessas proteínas podem sofrer *cross-linking*, formando ligações covalentes dentro ou entre moléculas. A formação do *cross-linking* proteico possui resistência às proteases, o que reduz a atividade metabólica normal contra os AGE. No trabalho de HSIA et al. (2016), um ensaio utilizando incubações do peptídeo GK na presença de ribose foi empregado para avaliar a habilidade da capsaicina, substância presente em *C. chinense*, em inibir o *cross-linking* proteico. Os resultados indicaram que a presença de capsaicina inibiu a formação de proteínas de alto peso molecular, o que é indicativo do efeito protetor da capsaicina via inibição da formação de *cross-linking* proteico.

4.6 Determinação de proteínas carboniladas (PCO)

Sabendo-se que o aumento de grupamentos carbonila pode ser uma consequência direta da oxidação proteica, a quantificação desses grupamentos no sistema-modelo de glicação também representa um importante marcador de dano glico-oxidativo a ser analisado (MEEPROM et al., 2013). A determinação de PCO é um teste que apresentou representatividade nos resultados obtidos, tanto no sistema-modelo de glicação de BSA com o agente glicativo, quanto a proteção pela AG e pelo extrato estudado.

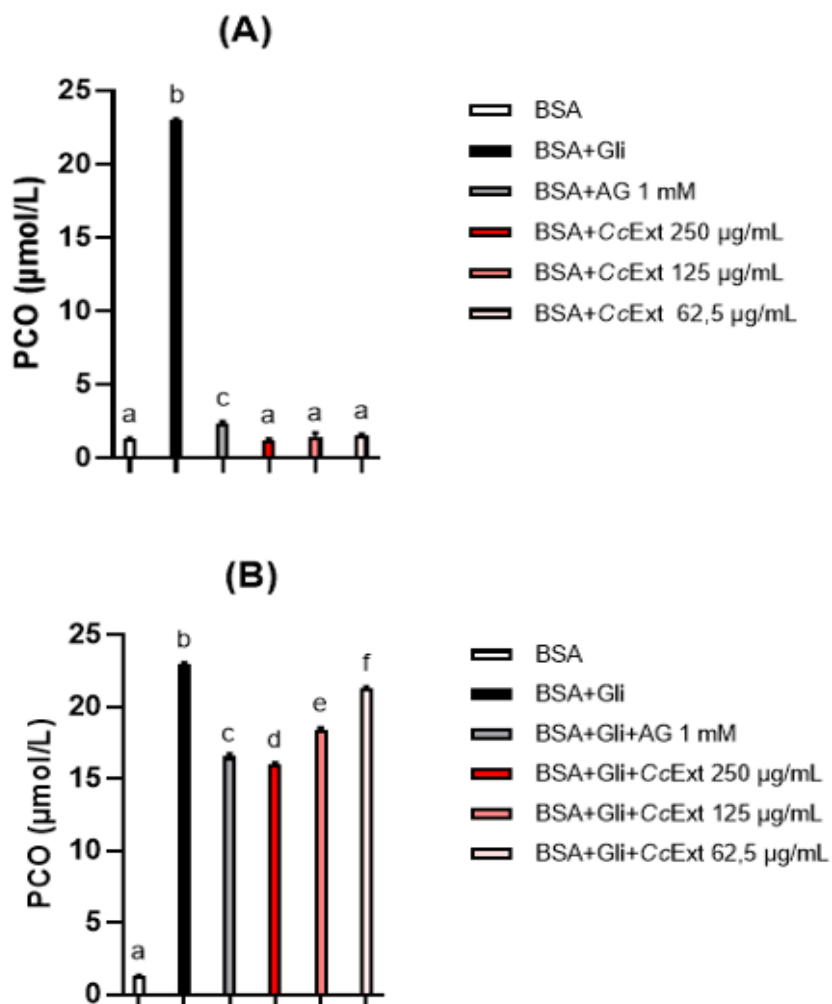
Nas condições em que a BSA foi incubada com a glicose, foram observados aumentos progressivos nos níveis de PCO, durante todo o período experimental, em relação aos valores obtidos com a BSA sozinha. Na condição BSA+Gli, e após 30 dias de incubação, a formação de PCO foi 179% maior em relação à BSA sozinha. Vale destacar que, após 30 dias de incubação, no sistema BSA+Gli, ocorreu uma formação

aproximadamente duas vezes maior de PCO em comparação ao sistema BSA incubada na ausência de glicose (Figura 19). Porém, a formação de PCO nas incubações contendo apenas BSA ou BSA+AG (Figura 19A) apresentaram-se em níveis basais, no tempo analisado.

Em todo o período experimental, a AG foi capaz de prevenir a formação de PCO, uma vez que houve diferença estatística entre os valores de PCO no sistema de BSA+Gli em comparação ao sistema BSA+Gli+AG ($p<0,05$). No tempo de 30 dias, AG foi capaz de reduzir em 28% a formação de PCO no sistema BSA+Gli+AG, comparada ao meio em que não esteve presente (BSA+Gli) (Figura 19B).

Quando o CcExt é incubado nas concentrações 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ junto aos sistemas de glicação proteica, este assume um caráter protetor, ou seja, é capaz de atenuar a formação de PCO, quando comparado aos sistemas BSA+Gli (Figura 19B). O CcExt na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de atenuar de forma mais significativa a formação do PCO, em relação às concentrações de 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, bem como em relação à AG, quando estes foram incubados com BSA+Gli: após 30 dias de incubação, o sistema BSA+Gli+CcExt 250 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de reduzir em 31% os níveis de PCO, em relação a incubação sem o CcExt, enquanto que no sistema BSA+Gli+CcExt 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ houve redução de 20% e 8%, respectivamente, nos níveis de PCO (Figura 19B) (lembrando que o aumento nos níveis de PCO no sistema BSA+Gli foi de 179% em relação à BSA sozinha).

Figura 22 Níveis de proteínas carboniladas nas incubações de BSA (A) e BSA na presença de glicose (B), na ausência ou presença de AG ou de CcExt



Extrato hidroetanólico dos frutos de *C. chinense* nas concentrações 250, 125 e 62,5 μg/mL, no tempo 30 dias de incubação. Médias que não compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Fonte: própria autora, 2021.

5. CONCLUSÃO

O extrato hidroetanólico dos frutos da pimenta *C. chinense* apresentou, em todas as concentrações estudadas, capacidade de promover algum efeito protetor importante em relação a atenuação de marcadores relacionados às modificações glico-oxidativas.

No estudo do potencial anti-AGE do extrato de *C. chinense*, são notáveis as propriedades extrato frente aos agentes promotores de glicação, glicose e metilglioxal. Em todos os tempos analisados, CcExt nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL apresentou efeitos atenuantes na formação de AGE fluorescentes quando incubado com BSA ou MGO, diminuindo sua formação, sendo os efeitos anti-AGE de CcExt não dependentes de concentração. Da mesma forma, CcExt apresentou efeitos atenuantes na formação de AGEs fluorescentes quando incubado com BSA+Gli, diminuindo sua formação, no entanto, observa-se que os efeitos anti-AGE de CcExt na incubação com a glicose foram dependentes de concentração.

Nas incubações de CcExt com BSA+Gli ou BSA+MGO, foram significativas as diminuições nos níveis de quinurenina, N'-formilquinurenina e ditirosina, em todas as concentrações e tempos estudados. Os resultados relacionados à formação de *cross-linking* proteico indicam que CcExt possui efeito protetor na formação desse marcador avançado de glicação, nas concentrações de 250 e 125 µg/mL.

Exceto pela análise da capacidade de captura do ânion radical superóxido, o potencial antioxidante *in vitro* do extrato de *Capsicum chinense* demonstrou-se eficaz, devido a capacidade do CcExt de captura dos radicais peroxila (ROO•).

A técnica de cromatografia em camada delgada permitiu a otimização do método, da concentração e volume de aplicação do extrato e fases móveis empregadas, trazendo importantes notícias que possibilitarão posteriores avanços quanto ao potencial notável do extrato natural.

Desta forma, com este estudo, foi possível concluir que os extratos naturais, especificamente o extrato obtido dos frutos da pimenta-biquinho, são promissoras opções para estudos futuros acerca das terapias complementares para o DM com bioativos naturais, visando a atenuação das complicações relacionadas ao estresse glico-oxidativo.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, M. M.; PEREIRA, A. M. S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; BERTONI, B. W. Caracterização química qualitativa de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada comparativa. **Scientia Plena**, v. 7, n. 12, 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, 37 (1): 14-80, 2019.

ANDRIOLO, A.; VIEIRA, J. G. H. Diagnóstico e acompanhamento laboratorial do diabetes mellitus. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar/medicina laboratorial**, 1: 37-42, 2008.

ANOUAR, E. H.; GIER SCHNER, J.; DUROUX, J.; TROUILLAS, P. UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study, **Food Chemistry**, 131 (1): 79-89, 2012.

ASSIS, R. P. **Efeito dos solutos urêmicos sobre espécies reativas de oxigênio em sistemas modelo *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.

ASSIS, R. P.; CASTRO, J. F. A.; GUTIERRES, V. O.; ARCARO, C. A.; BROTTTO, R. S.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Effects of uremic solutes on reactive oxygen species *in vitro* model systems as a possibility of support the renal function management. **BMC Nephrology**, 16 (1): 50, 2015.

BALASUBRAMANIAN, D.; KANWAR, R. Molecular pathology of dytyrosine cross-links in proteins: structural and functional analysis of four proteins. **Developments in Molecular and Cellular Biochemistry**, 235 (2): 27-38, 2002.

BARBOSA, J.; SOUZA, I. T.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGEs) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos e em sistemas biológicos: Avanços, desafios e perspectivas. **Química Nova**, 39 (5): 608-620, 2016.

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. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, p. 940-950, 2008.

BARREIROS, R. C., et al. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Rev. Nutr.** 377-389, 18(3), 2005.

BARREIROS, A. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BECKER, H.; BERGER, W.; DOMSCHKE, G.; FANGHANEL, E.; FAUST, J.; FISCHER, M. Organikum: Química Orgânica Experimental. **Fundação Calouste Gulbenkian**, 2ª Edição, Lisboa, 1997.

BRESTEL, E. P. Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 126 (1): 482-488, 1985.

BRUCKBAUER, A.; ZEMEL, M. B. Synergistic effects of metformin, resveratrol, and hydroxy methyl butyrate on insulin sensitivity. **Diabetes Metabolic and Obesity: Targets and Therapy**, 6: 93-102, 2013.

CHAVES, A. A. C. et al. Análise físico-química da pimenta de cheiro mantida em temperatura ambiente. **Nutr Brasil**, v. 16, n. 4, p.194-203, 2017.

CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. **Analytical Biochemistry**, 218 (2): 377-381, 1994.

COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B.; BERGE, D. V. Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **Journal of natural products**, v. 61, n. 1, p. 71-76, 1998.

DE AGUIAR, A. C., DOS SANTOS, P., COUTINHO, J. P., BARBERO, G. F., GODOY, H. T., & MARTÍNEZ, J. (2014). Supercritical fluid extraction and low pressure extraction of Biquinho pepper (*Capsicum chinense*). **LWT - Food Science and Technology**, 59(2P2), 1239–1246, 2014.

DIAS, D.T.M.; PALERMO, K.R.; MOTTA, B.P.; KAGA, A.K.; LIMA, T.F.O.; BRUNETTI, I.L.; BAVIERA, A.M. Rutin inhibits the *in vitro* formation of advanced glycation products and protein oxidation more efficiently than quercetin. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 42, e718, 2021.

DOS SANTOS, C. H. C.; TALPO, T. C.; MOTTA, B. P.; KAGA, A. K.; BAVIERA, A. M.; CASTRO, R. N.; DA SILVA, V. C.; JUNIOR, P. T. S.; WESSJOHANN, L.; DE CARVALHO, M. G. New compounds of *Siolmatra brasiliensis* and inhibition of *in vitro* protein glycation damage. **Fitoterapia**, 133: 109-119, 2019.

EMEL'YANOV, V. V. Glycation, antiglycation, and deglycation: Their role in aging mechanisms and geroprotective effects (literature review). **Advances in Gerontology**, 7 (1): 1-9, 2017.

FOWLER, M. J. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. **Clinical Diabetes**, 26 (2): 77-82, 2008.

GAULEJAC, N. S. De.; GLORIES, Y.; VIVAS, N.; Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Research International**. 32, 327; 1999.

GOVINDARAJ, J.; PILLAI, S. S. Rosmarinic acid modulates the antioxidant status and protects pancreatic tissues from glucolipotoxicity mediated oxidative stress in high-fat diet: streptozotocin-induced diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 404: 143-159, 2015.

HSIA, S. M.; LEE, W. H.; YEN, G. C.; WU, C. H. Capsaicin, an active ingredient from chilli peppers, attenuates glycolytic stress and restores sRAGE levels in diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, 21: 406-417, 2016.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 10ª Edição, 2021. Bélgica. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas>>. Acesso em 05 de abr. de 2022.

KAMO, T.; SATO, K.; SEN, K.; SHIBATA, H.; HIROTA, M. Geranylgeraniol-type diterpenoids, boletinins A– J, from *Boletinus c avipes* as inhibitors of superoxide anion generation in macrophage cells. **Journal of natural products**, v. 67, n. 6, p. 958-963, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227 (5259): 680-685, 1970.

LEAL, A.P.F. **Avaliação das Propriedades Farmacológicas dos Extratos Brutos de duas variedades da *Capsicum Chinense*** Jacq. Dissertação. Mestrado em Biotecnologia. Universidade Católica Dom Bosco. Mato Grosso do Sul, 2012.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, 233: 346-357, 1994.

LUSSIGNOLI, S.; FRACCAROLI, M.; ANDRIOLI, G.; BROCCO, G.; BELLAVITE, P. A microplate based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma. **Anal Biochem**, v. 269, p. 38-44, 1999.

MACHADO, M.T.C., MELLO, B.C.B.S., HUBINGER, M.D. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. **J. Food Eng.** 117, 450–457, 2013.

MEEPROM, A.; SOMPONG, W.; CHAN, C. B.; ADISAKWATTANA, S. Isoferulic acid, a new anti-glycation agent, inhibits fructose and glucose-mediated protein glycation in vitro. **Molecules**, 18 (6): 6439-6454, 2013.

MEEPROM, A.; SOMPONG, W.; CHAN, C. B.; ADISAKWATTANA, S. Isoferulic acid prevents methylglyoxal-induced protein glycation and DNA damage by free radical scavenging activity. **BMC Complement Altern Med.** 15: 346, 2015.

MORALES-SOTO, A., GÓMEZ-CARAVACA, A. M., GARCÍA-SALAS, P., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. High-performance liquid chromatography coupled to diode array and electrospray time-of-flight mass spectrometry detectors for a comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in three pepper (*Capsicum annuum* L.) samples. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 977-984, 2013.

MOTTA, B. P.; KAGA, A. K.; OLIVEIRA, J. O.; INACIO, M. D.; DA SILVA, C. F.; JUNIOR, P. T. S.; BRUNETTI, I. L.; BAVIERA, A. M. *In vitro* inhibition of protein glycation and advanced glycation end products formation by hydroethanolic extract and two fractions of *Simaba trichilioides* roots. **Natural Product Research**, 34 (16), 2389-2393, 2020.

NASCIMENTO, P. L., NASCIMENTO, T. C., RAMOS, N. S., SILVA, G. R., GOMES, J. E. G., FALCÃO, R. E., SILVA, T. Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of phenolics isolated from different extracts of *Capsicum frutescens* (Pimenta Malagueta). **Molecules**, 19 (4): 5434-5447, 2014.

NEGRE-SALVAYRE, A; SALVAYRE, R; AUGÉ, N; PAMPLONA, R; PORTERO-OTÍN, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxid Redox Signal**, 11, 3071-3109, 2009.

NEMET, I.; STRAUCH, C. M.; MONNIER, V. M. Favored and disfavored pathways of protein cross linking by glucose: glucose lysine dimer (GLUCOLD) and crossline versus glucosepane. **Amino acids**, 40 (1): 167-181, 2011.

NIE, Z., DENG, S., ZHANG, L., CHEN, S., LU, Q., PENG, H. Crocin protects against dexamethasone-induced osteoblast apoptosis by inhibiting the ROS/Ca²⁺-mediated mitochondrial pathway. **Molecular Medicine Reports**, 20: 401-408, 2019.

NOWOTNY, K.; JUNG, T.; HOHN, A.; WEBER, D.; GRUNE, T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, 5(1): 194-222, 2015.

ODJAKOVA, M.; POPOVA, E.; AL SHARIF, M.; MIRONOVA, R. Plant-derived agents with anti-glycation activity. **Glycosylation. InTech**, 2012. <https://doi.org/10.5772/48186>.

PALERMO, K. R. **Prospecção do potencial anti-glicação de fitoquímicos via ensaios *in vitro***. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

PENNACHI, P. C. **Modulação da enzima indolamina 2,3 dioxigenase pelos AGEs (produtos finais de glicação avançada) em ratos diabéticos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2011.

PERDIVARA, I.; DETERDING, L. J.; PRZYBYLSKI, M.; TOMER, K. B. 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**, 21 (7): 1114-1117, 2010.

PINTO, C. M. F.; DE OLIVEIRA PINTO, C. L.; DONZELLES, S. M. L. Pimenta Capsicum: propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu

potencial para o agronegócio. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, 3 (2), 2013.

RABBANI, N; THORNALLEY, P. J. Glyoxalase 1 Modulation in Obesity and Diabetes. **Antioxidants & Redox Signaling**, 30 (3), 354-374, 2019.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; et al. Kinetics of Glycooxidation of Bovine Serum Albumin by Glucose, Fructose and Ribose and Its Prevention by Food Components. **Molecules**, p. 18829-18849, 19, 2014.

SANTOS, L. S. **Estudo e Aplicações do óleo essencial de *Eugenia dysenterica* DC e Extratos Vegetais de *Capsicum chinense* JACQ.** Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Goiás, 2020.

SARTORI, A.; BECHARA, E. J. H. Metilglioxal: uma toxina endógena? **Química Nova**, v. 33, p. 2193-2201, 2010.

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, n. 1, p. 407-461, 2020.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica de Marks: Uma Abordagem Clínica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, Cap. 24: 439-457, 2007.

SORA, G. T. S.; HAMINIUK, C. W. I.; DA SILVA, M. V.; ZIELINSKI, A. A. F.; GONÇALVES, G. A.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. A comparative study of the capsaicinoid and phenolic contents and in vitro antioxidant activities of the peppers of the genus *Capsicum*: an application of chemometrics. **Journal of Food Science and Technology**, 52 (12): 8086-8094, 2015.

SUMITA, N. M.; ANDRIOLO, A. Importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento do paciente portador de diabetes mellitus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 42 (3), 2006.

THORNALLEY, P. J.; Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation end products. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 31-40, V. 419 (1), 2003.

TUBARO, F., GHISELLI, A., RAPUZZI, P., MAIORINO, M., URSINI, F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. **Free Rad Biol Med**, 24: 1228-1234, 1998.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quimica Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

WANG, X.; CHEN, Y.; ABDELKADER, D.; HASSAN, W.; SUN, H.; LIU, J. Combination therapy with oleanolic acid and metformin as a synergistic treatment for diabetes. **Journal of Diabetes Research**, 2015: 1-12, 2015.

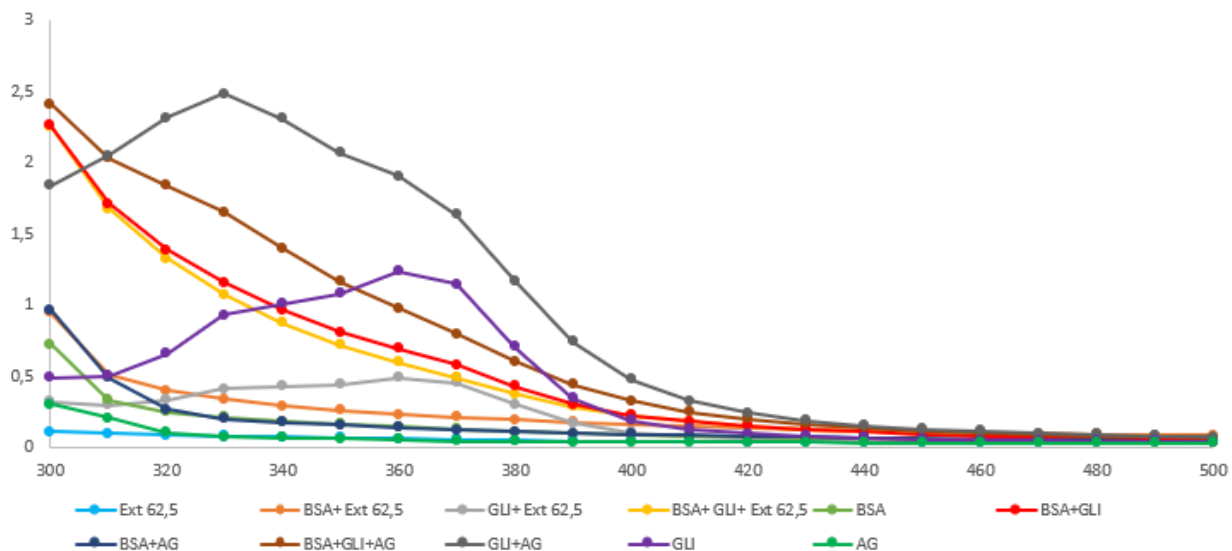
YEH, W.; HSIA, S.; LEE, W.; WU, C. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 1, p. 84-92, 2017.

ZAGURY, L., ZAGURY, T. **Diabetes sem medo**. Rio de Janeiro: Editora Best Seller, 5ª ed, 2006.

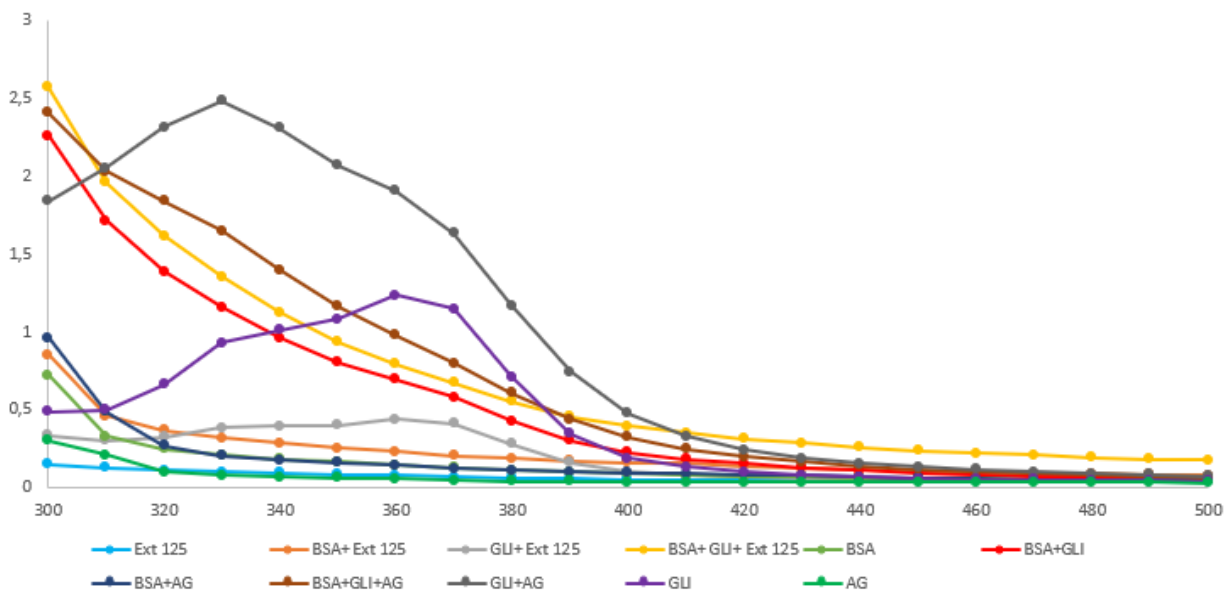
ZIEMAN, S. J.; KASS, D. A. Advanced Glycation End Products Cross-linking: Pathophysiologic Role and Therapeutic Target in Cardiovascular disease. **Congest Heart Fail**, 10 (3): 144-151, 2004.

ANEXO

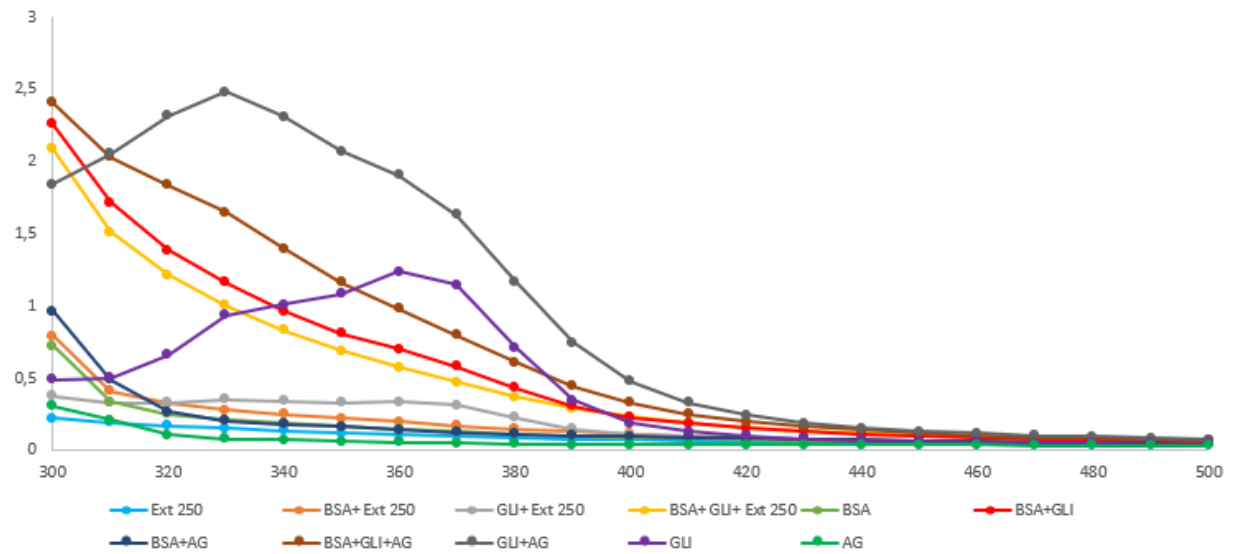
Anexo 1. Espectro de Absorção do extrato de *Capsicum chinense* 62,5 µg/mL no tempo 30 dias.



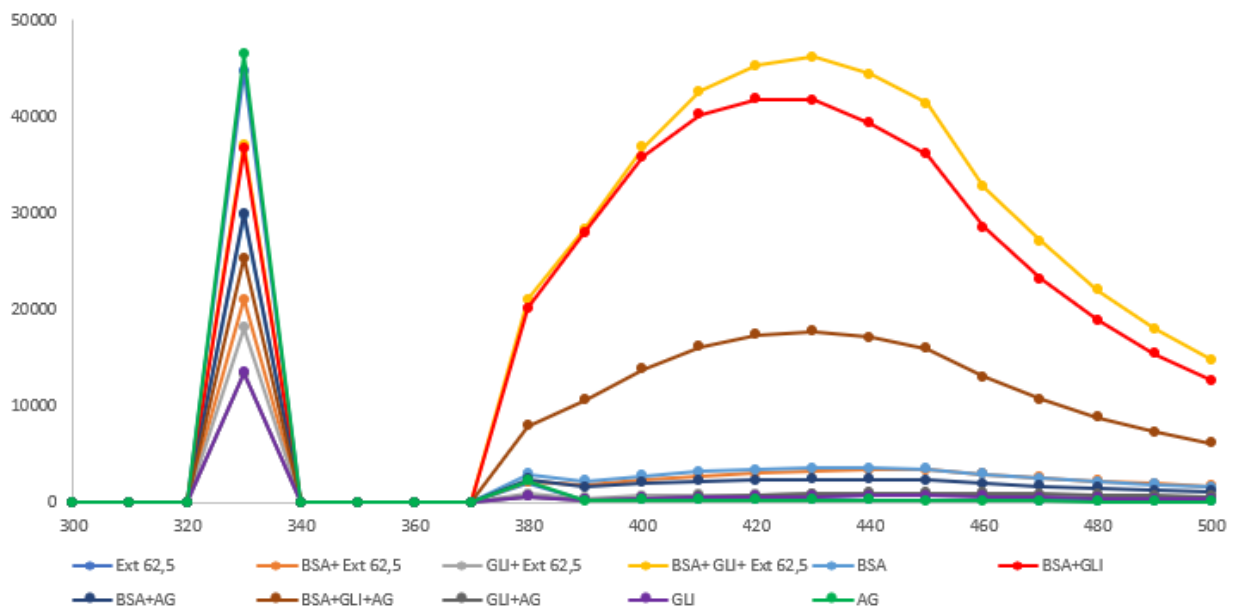
Anexo 2. Espectro de Absorção do extrato de *Capsicum chinense* 125 µg/mL no tempo 30 dias.

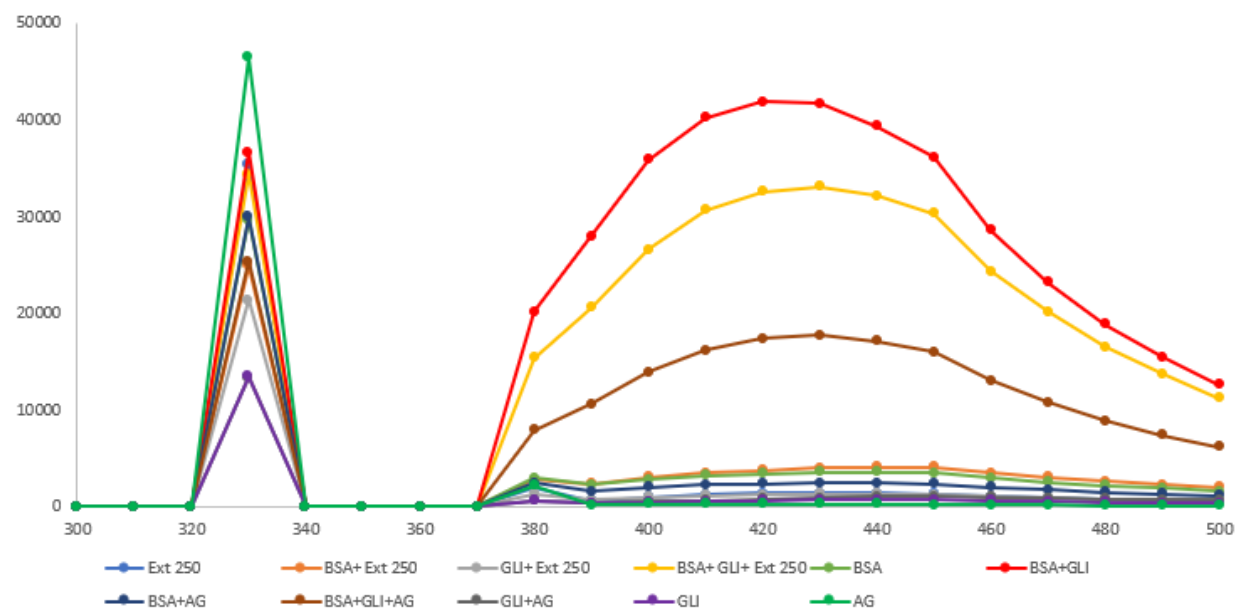
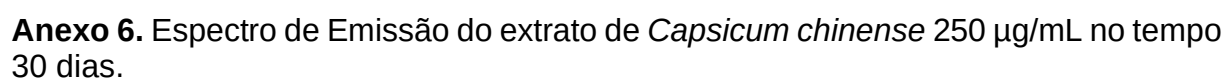


Anexo 3. Espectro de Absorção do extrato de *Capsicum chinense* 250 µg/mL no tempo 30 dias.

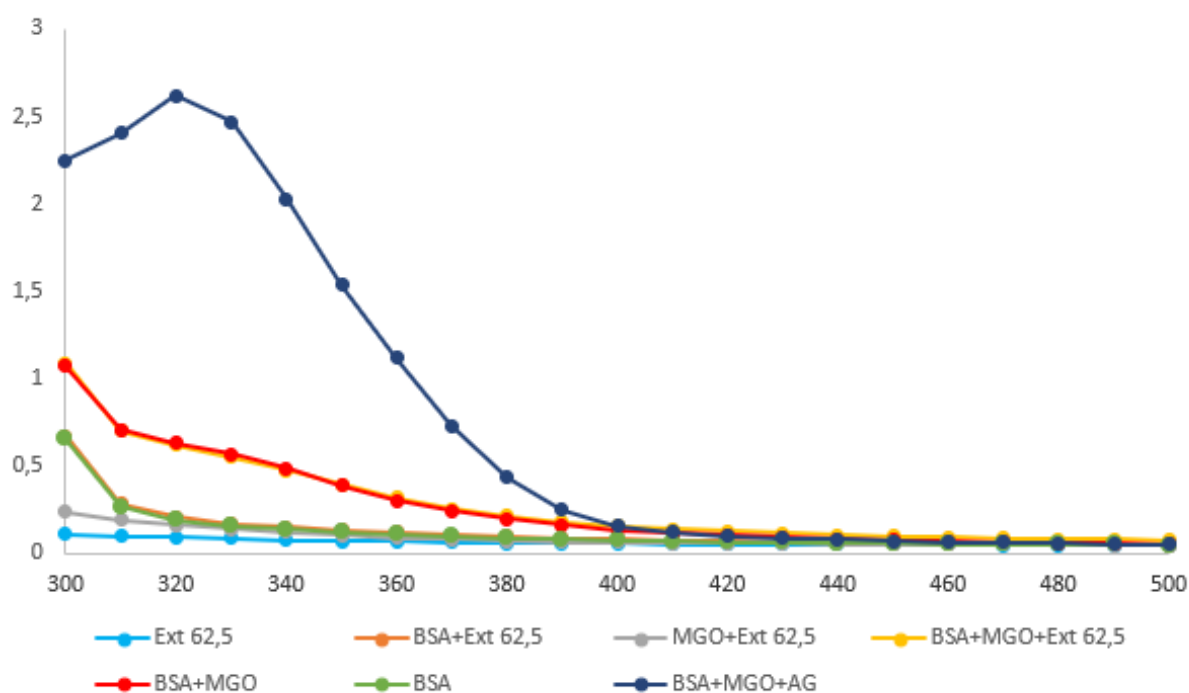


Anexo 4. Espectro de Emissão do extrato de *Capsicum chinense* 62,5 µg/mL no tempo 30 dias.

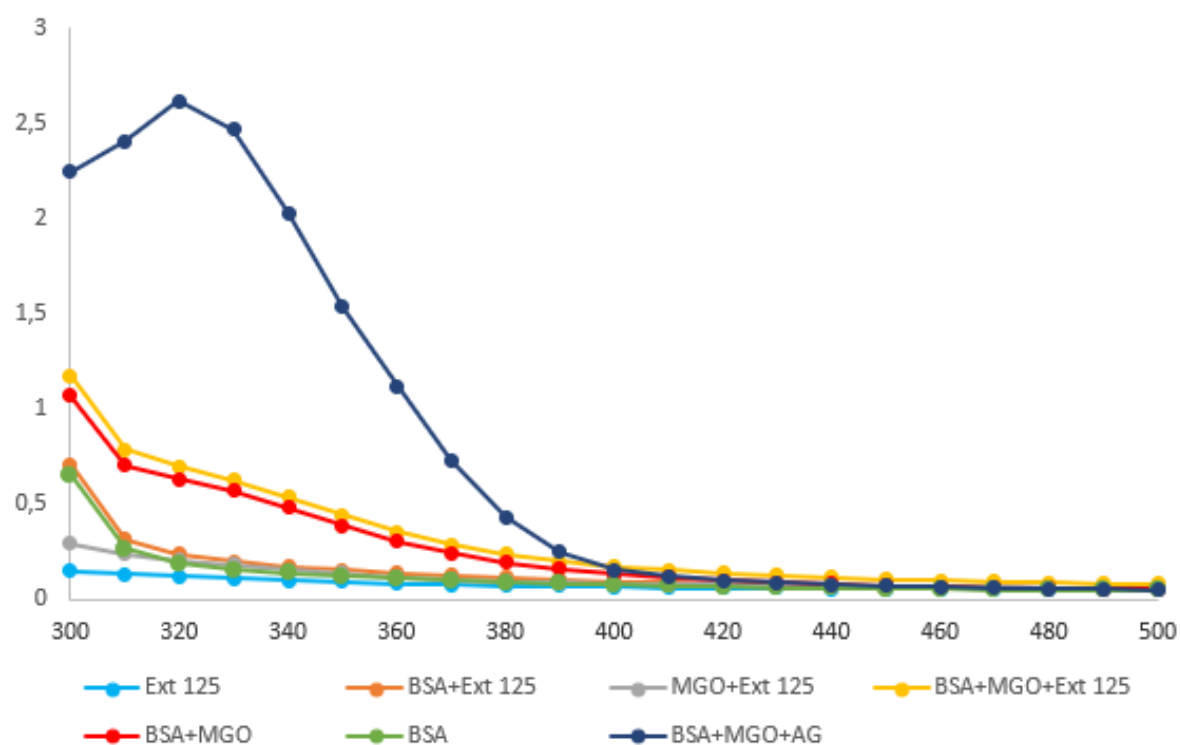




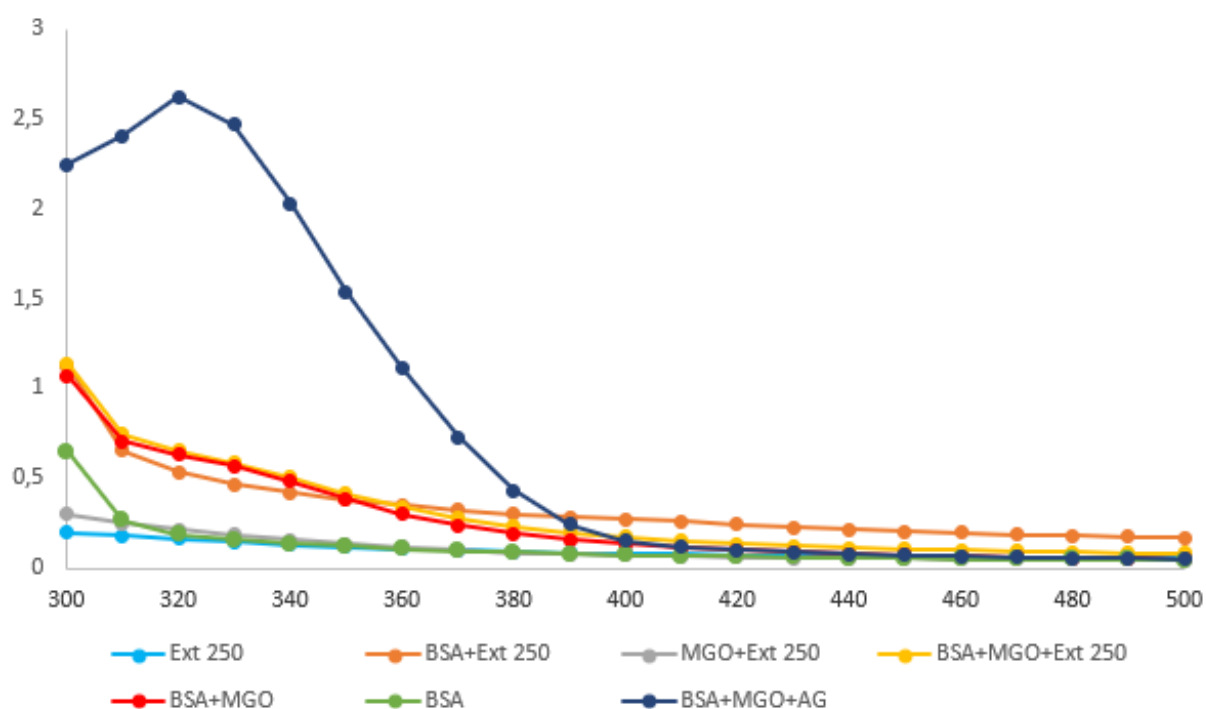
Anexo 7. Espectro de Absorção do extrato de *Capsicum chinense* 62,5 µg/mL no tempo 192 horas.



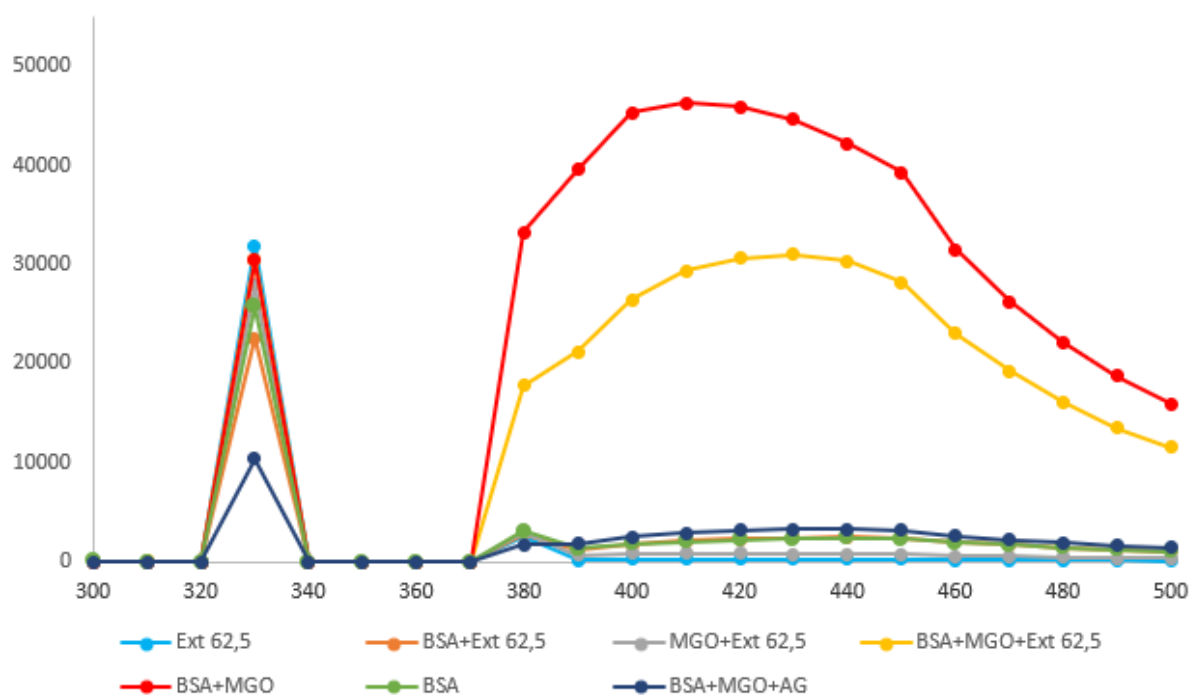
Anexo 8. Espectro de Absorção do extrato de *Capsicum chinense* 125 µg/mL no tempo 192 horas.



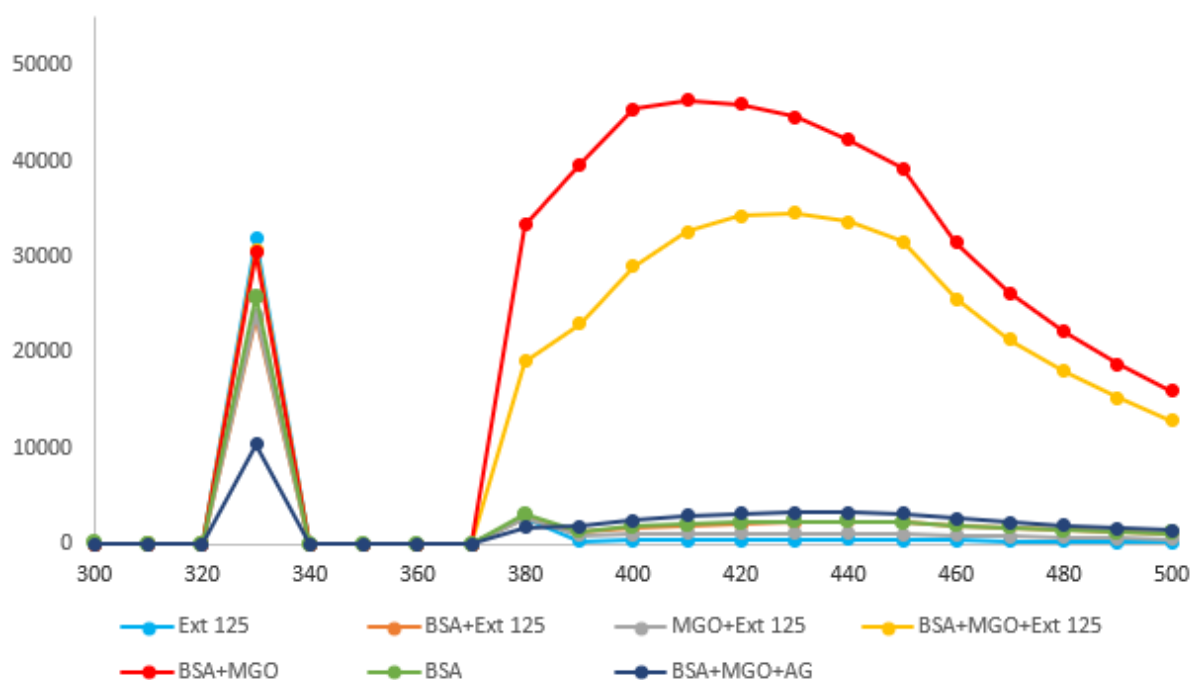
Anexo 9. Espectro de Absorção do extrato de *Capsicum chinense* 250 µg/mL no tempo 192 horas.



Anexo 10. Espectro de Emissão do extrato de *Capsicum chinense* 62,5 µg/mL no tempo 192 horas.



Anexo 11. Espectro de Emissão do extrato de *Capsicum chinense* 125 µg/mL no tempo 192 horas.



Anexo 12. Espectro de Emissão do extrato de *Capsicum chinense* 250 µg/mL no tempo 192 horas.

