



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIGLICAÇÃO DO EXTRATO
ETANÓLICO E DE METABÓLITOS DE FOLHAS DE ERVA-BALEEIRA (*Varronia
curassavica* Jacq.)**

WINNER DUQUE RODRIGUES

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

**Araraquara, SP
2022**

WINNER DUQUE RODRIGUES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIGLICAÇÃO DO EXTRATO
ETANÓLICO E DE METABÓLITOS DE FOLHAS DE ERVA-BALEEIRA (*Varronia
curassavica Jacq.*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Araraquara - SP

2022

R696a Rodrigues, Winner Duque.
Avaliação *in vitro* do potencial antiglicação do extrato etanólico e de metabólitos de folhas de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) / Winner Duque Rodrigues. – Araraquara: [S.n.], 2022.
113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: André Gonzaga dos Santos.

1. *Varronia curassavica*. 2. Atividade antiglicação. 3. Estresse oxidativo. 4. Cordialina A. 5. Dihidroxipentametoxiflavona. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

*“Dedico aos meus pais, Valci e Irani,
que mesmo partindo cedo, nunca deixaram de estar comigo todos os dias...”*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todo o amor e fidelidade que tem por mim. Sou grato por ter me atendido todas as vezes que eu clamei Teu nome. E também, por ter colocado pessoas, que são verdadeiros anjos ao meu redor e que agregaram na minha jornada até o presente momento. Sou grato por ter me concedido a oportunidade de viver num lar cheio de amor, do qual é e sempre será minha base.

Aos meus pais, Valci e Irani, sinto vocês comigo, me orientando e guardando todos os dias. Infelizmente, não tivemos tempo para que pudessem ver a profissão que eu escolhi e o caminho que eu tenho trilhado, tampouco podem, fisicamente, desfrutar este sonho comigo, mas Deus tem me confortado. Nunca esqueci o pedido que minha mãe me fez: *“Sempre que tiver uma oportunidade de estudar, estude! É a única coisa que ninguém poderá tirar de você...”* essa frase ecoa na minha mente todas as vezes que penso em desistir. Pai e mãe, espero estar honrando o esforço de vocês. À minha família, Wanner, Wendy e Weiller, durante bastante tempo fomos só nós e, mesmo com toda a dificuldade, vocês sempre me incentivam correr atrás dos meus sonhos. Daniel, Kamila, Karla e pequena Alice, obrigado por cuidarem dos meus irmãos, sei que eles dão trabalho, mas creio no potencial de vocês, amo todos!

Ao meu orientador André Gonzaga dos Santos, por ter aceitado me orientar mesmo sem me conhecer anteriormente, confiou no meu potencial e abriu as portas do laboratório de farmacognosia. Obrigado pela oportunidade, pelas trocas ricas de conhecimento que tivemos, espero ter atingido às expectativas e ter deixado bons frutos ao grupo de pesquisa. Aos meus companheiros de laboratório, meus agradecimentos. À professora Amanda Baviera e Felipe Nunes, agradeço por todo conhecimento compartilhado com vocês e pelos ensaios bioquímicos conduzidos com êxito total.

Aos meus amigos Larissa, Rafael, Kitana (e Fandango †) morar com vocês, foi muito mais do que qualquer outra experiência que eu tive na vida, obrigado por me aguentarem dentro de casa, vocês moram no meu coração, podem ter certeza que é de Araraquara para a vida! Amo vocês. Aos demais amigos que encontrei nessa jornada: Estácio, Camila, Maria Angélica, Isabella, Bárbara, Bruno, Stéfany, Janaína, Giovana, Gabriela e Rhenner obrigado por dividirem um pouco da vida de vocês comigo e por suportarem meus surtos. Aos amigos do Espírito Santo, Jessyca e Suzana, vocês sabem o quanto são importantes para mim, agradeço à Deus pelo privilégio de cultivar diariamente a amizade de vocês, amo demais. Minha amiga Elisabeth, você estava certa, independente da distância, amigos nunca deixam de ser amigos e nossa amizade é prova disso, obrigado por cada afago e conselhos “antissurtos” que você me deu, te amo.

Aos demais professores que compuseram a banca de qualificação e defesa, obrigado pelas contribuições que agregaram e nortearam este trabalho.

À Unesp e seus colaboradores, técnicos e servidores, obrigado por tornar possível essa etapa, foi minha segunda casa acadêmica, guardarei boas lembranças.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 <i>Varronia curassavica</i> Jacq.	14
2.2 Formação de AGE e as doenças associadas.....	20
2.3 Agentes com atividade antiglicação e o potencial dos produtos naturais.....	24
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivos específicos	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Aquisição do extrato etanólico de <i>Varronia curassavica</i>	30
4.2 Fracionamento do extrato, isolamento/purificação, identificação e quantificação dos metabólitos secundários em EEVc	30
4.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada das frações obtidas na EFS ..	30
4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV/Vis	31
4.2.2.1 Pré-tratamento e análise por HPLC-UV das frações e do EEVc	31
4.2.3 Isolamento e purificação dos picos das frações 4.1 e 4.3 por HPLC-UV preparativa	31
4.2.3.1 Análises espectroscópicas das substâncias purificadas de F4.1 e F4.3	32
4.2.3.1.1 Análise por espectrofotômetro no ultravioleta/visível dos picos isolados de F4.1 e F4.3	32
4.2.3.1.2 Análise por espectrômetro no infravermelho das substâncias purificadas de F4.1 e F4.3	32
4.2.3.1.3 Análise por HPLC-MS das substâncias purificadas de F4.1 e F4.3	33
4.2.3.1.4 Análise de RMN de ¹ H e ¹³ C das substâncias purificadas de F4.1 e F4.3 ..	33
4.2.4 Quantificação da dihidropentametoxiflavona e cordialina A	34
4.3 Avaliação do potencial antiglicação por meio de sistema-modelo de glicação proteica <i>in vitro</i> com metilglioxal.....	34
4.3.1 Determinação da formação de AGE fluorescentes	35
4.3.2 Determinação da formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos	35
4.3.3 Quantificação de proteínas carboniladas	36
4.3.4 Modificação da BSA via formação de ligações cruzadas	36
4.4 Análise estatística	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38

5.1 Fracionamento de EEVc e isolamento/purificação de metabólitos secundários..	38
5.1.1 Extração em fase sólida do extrato etanólico de <i>V. curassavica</i> e análise por cromatografia em camada delgada	38
5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV/Vis (HPLC-UV)	39
5.1.2.1 Análise por HPLC-UV das frações e do EEVc	39
5.1.3 Isolamento e purificação dos picos das frações 4.1 e 4.3 por HPLC-UV preparativa	41
5.1.4 Análise espectroscópica dos metabólitos secundários isolados de EEVc.....	42
5.1.4.1 Determinação estrutural da dihidroxipentametoxiflavona isolada da F4.1	42
5.1.4.2 Determinação estrutural da cordialina A isolada da F4.3	50
5.1.5 Quantificação de dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A no EEVc.....	58
5.2 Atividade antiglicação do EEVc, dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A	60
5.2.1 Determinação de AGE fluorescentes em sistema-modelo <i>in vitro</i> com metilglioxal.....	60
5.2.2 Determinação da formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos	65
5.2.3 Quantificação de proteínas carboniladas	70
5.2.4 Modificação da BSA via formação de ligações cruzadas	75
CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICES.....	98
ANEXOS	106

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Varronia curassavica* Jacq no campo experimental do CPQBA-Unicamp, Paulínia-SP. FONTE: PEREIRA (2017).15
- Figura 2:** Metabólitos secundários isolados de *V. curassavica*: (A) ácido rosmarínico; (B) ácido cafeico; (C) ácido gálico; (D) ácido clorogênico; (E) artemetina. (F) quercetina; (G) rutina; (H) 7,4'-dihidroxi-5'-carboximetoxi isoflavona; (I) 7,4'-dihidroxi-5'-metilisoflavona; (J) 5,6'-dihidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona; (K) 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona; (L) cordialina A; (M) (Z)-cordialina A; (N) cordialina B.....18
- Figura 3:** Principais etapas na formação dos AGEs. FONTE: TORRES et al. (2018).....21
- Figura 4:** Estruturas de alguns AGEs. Lys: lisina; Orn: ornitina; DOLD: dímero de 3-desoxiglicosona-lisina; DODIC: produto da condensação cruzada entre lisina, arginina e 3- desoxiglicosona; CEL: carboxietilisina; CML: carboximetilisina; MOLD: dímero de lisina-metilglioxal; GOLD: dímero de lisina-glioxal; GODIC: produto da condensação cruzada entre lisina-arginina e glioxal; MODIC: produto da condensação cruzada entre lisina-arginina. FONTE: POULSEN et al. (2013).22
- Figura 5:** Representação das principais etapas da formação de AGEs e de substâncias químicas que interferem nestas etapas. FONTE: O autor.26
- Figura 6:** Cromatoplaça de sílica gel (0,25 mm) das frações EFS (F1.1 a F5.3) e EEVc (EB), ambas numa concentração de 5 mg/mL em acetato de etila e volume de aplicação igual a 20 µL. Fase móvel (A): clorofórmio:acetato de etila:metanol (5,5:3,5:1 v/v); (B): clorofórmio:acetato de etila (6:4 v/v); (C): acetato de etila:acetonitrila (9,8:0,2 v/v). Revelador: ácido sulfúrico 10%. Frações de interesse marcadas em vermelho na cromatoplaça A.39
- Figura 7:** Cromatogramas do EEVc e das frações F1.1 a F5.3 em coluna Thermo Scientific® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) em gradiente exploratório de 5-100% de metanol por 30 min e 100% de metanol até 35 min. Vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e detecção em 254 nm. Concentração das amostras: 1,0 mg/mL. Cromatógrafo Thermo Scientific Ultimate 3000®.40
- Figura 8:** Cromatogramas da fração 4.1 e 4.3 obtidos no modo isocrático metanol:água (75:25 v/v) com volume de injeção igual a 20 µL em cromatógrafo Perkin Elmer Flexar® UV/Vis utilizando coluna de fase reversa C18 Thermo Scientific® (250 x 4,6 mm; com partículas de 5 µm), vazão de 0,4 mL/min e com detector com comprimento de onda em 254 nm. Concentração das amostras: 1,0 mg/mL.41
- Figura 9:** Cromatogramas dos picos isolados das frações F4.1 (t_R = 9,9 min) e F4.3 (t_R = 30,4 min) obtidos no modo isocrático metanol:água (75:25 v/v) com volume de injeção igual a 20 µL em cromatógrafo Perkin Elmer Flexar® UV/Vis utilizando coluna de fase reversa C18 Thermo Scientific® (250 x 4,6 mm; com partículas de 5 µm),

vazão de 0,4 mL/min e com detector com comprimento de onda em 254 nm. Concentração das amostras: 1,0 mg/mL.....42

Figura 10: (A) Espectro de varredura UV/Vis (210-450 nm) em espectrofotômetro (BioTek Instruments® Synergy™ H1), de dihidroxipentametoxiflavona (1,0 mg/mL) em metanol; (B) estrutura química das flavonas; (C) cromatograma (TIC, ESI⁺) em preto e (TIC, ESI⁻) em azul de dihidroxipentametoxiflavona (2,0 mg/mL) em metanol obtido por análise em HPLC-MS (Waters® HPLC ACQUITY QDa), coluna C18 (Thermo Scientific®) (250 x 4,6 mm, 5 µm), modo isocrático de metanol:água acidificada com 2% ácido acético (75:25 v/v), tempo de 35 min, com vazão de 1 mL/min e volume de injeção igual a 20 µL; (D) espectros de massas HPLC-MS de dihidroxipentametoxiflavona obtidos por HPLC-MS no modo positivo (ESI⁺), sendo m/z= 427,00 [M+Na⁺] e (E) no modo negativo (ESI⁻), sendo m/z= 403,20 [M-H]⁻.43

Figura 11: Espectro de absorção infravermelho com transformada de Fourier da dihidroxipentametoxiflavona isolada de F4.1.....45

Figura 12: Estrutura química da 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona (A) ou 2',5-dihidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona (B).47

Figura 13: Espectro de RMN de ¹H de 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-dihidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona obtido a 400 MHz em (20 mg/mL) ..48

Figura 14: Espectro de RMN de ¹³C de 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-dihidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona obtido a 75 MHz em CDCl₃ (20 mg/mL).49

Figura 15: (A) Espectro de varredura UV/Vis (210-450 nm) em espectrofotômetro (BioTek Instruments® Synergy™ H1), de cordialina A (1,0 mg/mL) em metanol; (B) estrutura química da cordialina A; (C) cromatograma (TIC, ESI⁺) de cordialina A (2,0 mg/mL) em metanol obtido por análise em HPLC-MS (Waters® HPLC ACQUITY QDa), coluna C18 (Thermo Scientific®) (250 x 4,6 mm, 5 µm), modo isocrático de metanol:água acidificada com 2% ácido acético (75:25 v/v), tempo de 35 min, com vazão de 1 mL/min e volume de injeção igual a 20 µL; (D) espectros de massas de cordialina A obtidos por HPLC-MS no modo positivo (ESI⁺), sendo m/z= 508,99 [M+Na⁺] e (E) no modo positivo (ESI⁺), sendo m/z= 509,04 [M+Na]⁺51

Figura 16: Espectro de absorção infravermelho com transformada de Fourier do triterpeno isolado de F4.3.....52

Figura 17: Estrutura química da cordialina A.....54

Figura 18: Espectro de RMN de ¹H de cordialina A obtido a 400 MHz em CDCl₃ (20 mg/mL).55

Figura 19: Expansão do espectro de RMN de ¹H de cordialina A obtido a 400 MHz em CDCl₃ (20 mg/mL).56

Figura 20: Espectro de RMN de ¹³C de cordialina A obtido a 100 MHz em CDCl₃ (20 mg/mL).57

Figura 21: (A) cromatograma da solução de EEVc 1000 µg/mL, (B) dihidroxipentametoxiflavona 100 µg/mL e (C) cordialina A 100 µg/mL obtidos com a fase móvel: (A) água acidificada com 2% de ácido acético e (B) metanol. O método gradiente seguiu 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,300 mL/min e volume de injeção de 5,0 µL, forno de coluna em 50°C. E como fase estacionária coluna C18 (Waters® Acquity UPLC BEH 50 x 2,1 mm; 1,7 µm) em cromatógrafo UPLC Waters® Acquity H Class PLUS com detector em 254 nm.	58
Figura 23: Curva analítica do padrão de cordialina A nas concentrações de 10 a 100 µg/mL.	59
Figura 22: Curva analítica do padrão de dihidroxipentametoxiflavona nas concentrações de 10 a 100 µg/mL.	59
Figura 24: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A), dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de AGEs fluorescentes em sistema-modelo de glicação proteica <i>in vitro</i> com BSA + MGO. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de <i>V. curassavica</i>	61
Figura 25: Proposta da relação estrutura-atividade antiglicação para flavonoides. FONTE: Adaptado de Xie e Chen (2013) e Matsuda e colaboradores (2003).	63
Figura 26: Percentual da formação de AGEs em sistema-modelo de glicação proteica <i>in vitro</i> com BSA + MGO no dia 8. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de <i>V. curassavica</i>	65
Figura 27: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A), dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de ditirosina em sistema-modelo de glicação proteica <i>in vitro</i> com BSA + MGO. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de <i>Varronia curassavica</i>	66
Figura 28: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A), dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de N'-formilquinurenina em sistema-modelo de glicação proteica <i>in vitro</i> com BSA + MGO. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de <i>V. curassavica</i>	68
Figura 29: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A), dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de Quinurenina em sistema-modelo de glicação proteica <i>in vitro</i> com BSA + MGO. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de <i>V. curassavica</i>	69
Figura 30: Esquema da reação entre a proteína carbolinada (PCO) e a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). FONTE: Adaptado de Levine et al. (1994).	71
Figura 31: Quantificação de proteínas carboniladas obtido no dia 8 em sistema modelo <i>in vitro</i> de glicação de proteínas usando BSA e MGO. BSA: albumina sérica	

bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de *V. curassavica*.72

Figura 32: A estrutura dos derivados carbonílicos produzidos pela oxidação direta de cadeias laterais de aminoácidos: (A) 2-pirrolidona de resíduo de prolil; (B) semialdeído glutâmico de resíduo de arginil e prolil; (C) semialdeído α -aminoadípico de resíduo de lisil. E (D) ácido 2-amino-3-cetobutírico de resíduo de treonil.73

Figura 33: Efeitos de (A) EEVc, (B) cordialina A e (C) dihidroximetoxiflavona na formação de reticulação proteica (*crosslinking*) no dia 0 e dia 8 em sistema modelo *in vitro* de glicação de proteínas usando BSA e MGO. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de *V. curassavica*.....77

Apêndice I: Representação esquemática da incubação esquemática da incubação com metilglioxal, cada célula representa um frasco com seus respectivos constituintes do qual a incubação procedeu. Todo o experimento foi realizado em triplicatas. C1: dihidroxipentametoxiflavona; e C2: cordialina A.98

Apêndice II: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A) extrato etanólico de *V. curassavica*, dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de AGEs fluorescentes em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* apenas com BSA.....98

Apêndice III: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A) extrato etanólico de *V. curassavica*, dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de Ditirosina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* apenas com BSA.99

Apêndice IV: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A) extrato etanólico de *V. curassavica*, dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de N'-formilquinurenina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* apenas com BSA.....99

Apêndice V: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A) extrato etanólico de *V. curassavica*, dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de Quinurenina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* apenas com BSA....100

Apêndice VI: Gráficos de absorção dos controles utilizados no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.....100

Apêndice VII: Gráficos de absorção do EEVc 250 $\mu\text{g/mL}$ utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.101

Apêndice VIII: Gráficos de absorção do EEVc 125 $\mu\text{g/mL}$ utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.101

Apêndice IX: Gráficos de absorção do EEVc 62,5 $\mu\text{g/mL}$ utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.102

Apêndice X: Gráficos de absorção do dihidroxipentametoxiflavona 50 $\mu\text{g/mL}$ utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.....102

Apêndice XI: Gráficos de absorção do dihidroxipentametoxiflavona 25 µg/mL utilizado no sistema-modelo <i>in vitro</i> de glicação proteica.....	103
Apêndice XII: Gráficos de absorção do dihidroxipentametoxiflavona 12,5 µg/mL utilizado no sistema-modelo <i>in vitro</i> de glicação proteica.....	103
Apêndice XIII: Gráficos de absorção do cordialina A 50 µg/mL utilizado no sistema-modelo <i>in vitro</i> de glicação proteica.	104
Apêndice XIV: Gráficos de absorção do cordialina A 25 µg/mL utilizado no sistema-modelo <i>in vitro</i> de glicação proteica.	104
Apêndice XV: Gráficos de absorção do cordialina A 12,5 µg/mL utilizado no sistema-modelo <i>in vitro</i> de glicação proteica.....	105
Apêndice XVI: Representação gráfica do cálculo de densitometria gerada pelo programa ImageJ® 1.53k referentes a formação de <i>crosslinking</i> das amostras de EEVc, dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A em diferentes concentrações incubadas com BSA+MGO no dia 8.....	105
ANEXO I: Descrição da coleta e preparo do extrato etanólico de <i>Varronia curassavica</i> Jacq.....	106
ANEXO II: Certidão cadastral do projeto ao acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado no SisGen.....	107

LISTA DE SIGLAS

AG: aminoguanidina

AGE: produto final de glicação avançada (do inglês: *advanced glycation end-products*)

ATR: modo de reflexão atenuada (do inglês: *Attenuated Total Reflectance*)

BSA: albumina sérica bovina (do inglês: *bovine serum albumin*)

C18: sílica octadecilsilano

CCD: cromatografia em camada delgada

CE₅₀: concentração eficiente

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *high performance liquid chromatography*)

Da: Daltons

d: duplete

dd: duplo duplete

DMSO: dimetilsulfóxido

EFS: extração em fase sólida

EEVc: extrato etanólico de *Varronia curassavica*

EM: espectrômetro de massas

FTIR: espectroscopia no infravermelho de transformada de Fourier

m: multiplete

MGO: metilglioxal

PCO: proteínas carboniladas

q: quadruplete

RAGE: receptor para produto final de glicação avançada (do inglês: *Receptor for Advanced Glycation End-products*)

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

s: simpleto

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poli(acrilamida com dodecil-sulfato de sódio

t: triplete

(u): unidade de massa

UV: detector ultravioleta

RESUMO

Dentre as plantas de uso medicinal consagrado no Brasil, *Varronia curassavica* Jacq. (erva-baleeira), uma planta nativa brasileira, é usada no tratamento de processos inflamatórios e de distúrbios gastrointestinais, sendo comercializada em feiras populares e utilizada no preparo de fitoterápicos. O extrato etanólico de suas folhas (EEVc) apresentou atividade anti-inflamatória, antioxidante, efeito protetor gástrico e baixa toxicidade. Na literatura, as plantas medicinais com atividade anti-inflamatória e antioxidante têm despertado interesse frente a atividade antiglicação. A formação de produtos finais de glicação avançada (AGE) ocorre no organismo por fatores diversos. O acúmulo de AGE está associado ao agravamento e desencadeamento de diversas doenças crônicas e síndromes metabólicas. Devido aos efeitos acumulativos e deletérios dos AGE, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antiglicação do extrato etanólico de *V. curassavica* e de duas substâncias isoladas. As substâncias utilizadas neste trabalho foram isoladas e purificadas através de técnicas cromatográficas (EFS e HPLC preparativa) e identificados por técnicas espectrométricas UV, MS, IV e RMN de ^1H e ^{13}C como uma dihidroxipentametoxiflavona e a cordialina A. Na avaliação do potencial antiglicação foi utilizado um sistema modelo *in vitro* de incubação de albumina sérica bovina com metilglioxal (37°C durante 8 dias), seguido de análises de AGE fluorescentes, biomarcadores da oxidação de resíduos de aminoácidos e verificação da formação de ligações cruzadas em proteínas e quantificação de proteína carbonilada (PCO). O EEVc, dihidroxipentametoxiflavona e a cordialina A se mostraram candidatos potenciais frente a formação de AGE. O EEVc (250 µg/mL), dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A (50 µg/mL) reduziram a formação de AGE em 61,7; 60,8; e 54,9%, respectivamente, no dia 8. Todas as amostras reduziram os prejuízos causados pelo dano oxidativo, que foram determinados pela formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos (ditirosina, *N'*-formilquinurenina e quinurenina) e pela formação de reticulação proteica (*crosslinking* proteico), sendo que para PCO a cordialina A (50 µg/mL) foi superior ao padrão. De acordo com os resultados foi observado o potencial antiglicação que as amostras testadas podem promover, o que abre caminho para expandir o arsenal terapêutico para muitas patologias que os AGE estão envolvidos.

Palavras-chave: *Varronia curassavica*. Atividade antiglicação. Estresse oxidativo. Cordialina A. Dihidroxipentametoxiflavona.

ABSTRACT

Among the plants with established medicinal use in Brazil, *Varronia curassavica* Jacq. (erva-baleeira), a Brazilian native plant, is used in the treatment of inflammatory processes and gastrointestinal disorders, being commercialized in popular fairs and used in the preparation of phytotherapies. The ethanolic extract of its leaves (EEVc) showed anti-inflammatory activity, antioxidant, gastric protective effect, and low toxicity. In the literature, medicinal plants with anti-inflammatory and antioxidant activity have aroused interest for their anti-glycation activity. The formation of advanced glycation end products (AGE) occurs in the organism by several factors. The accumulation of AGE is associated with the aggravation and triggering of several chronic diseases and metabolic syndromes. Due to the accumulative and deleterious effects of AGE, the objective of this work was to evaluate the antiglycation potential of the ethanolic extract of *V. curassavica* and two isolated substances. The substances used in this work were isolated and purified by chromatographic techniques (EFS and preparative HPLC) and identified by UV, MS, IR and ^1H and ^{13}C NMR spectrometric techniques as a dihydroxypentamethoxyflavone and cordialin A. An in vitro model system of incubation of bovine serum albumin with methylglyoxal (37°C for 8 days), followed by fluorescent AGE analysis, biomarkers of amino acid residue oxidation and verification of cross-link formation in proteins and quantification of carbonylated protein (PCO) was used to evaluate the antiglycation potential. EEVc, dihydroxypentamethoxyflavone and cordialin A were shown to be potential candidates against AGE formation. EEVc (250 $\mu\text{g/mL}$), dihydroxypentamethoxyflavone and cordialin A (50 $\mu\text{g/mL}$) reduced AGE formation by 61.7; 60.8; and 54.9%, respectively, on day 8. All samples reduced the damage caused by oxidative damage, which was determined by the formation of markers of oxidation of amino acid residues (dityrosine, N'-formylquinurenine, and quinurenine) and the formation of protein crosslinking (protein crosslinking), and for PCO cordialin A (50 $\mu\text{g/mL}$) was higher than the standard. According to the results it was observed the antiglycation potential that the tested samples can promote, which opens the way to expand the therapeutic arsenal for many pathologies that AGEs are involved.

Keywords: *Varronia curassavica*. Antiglycation activity. Oxidative stress. Cordialin A. Dihydroxypentamethoxyflavone.

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pelo homem é uma prática milenar, sendo favorecida pelo fácil acesso e baixo custo. Os conhecimentos adquiridos são aprimorados ao longo do tempo sendo disseminado por gerações, tornando-se uma alternativa terapêutica, senão única para seus usuários. Assim, parte da população mundial recorre, direta ou indiretamente, às plantas medicinais e seus derivados devido suas propriedades medicinais (WHO, 1999; LORENZI; MATOS, 2002). Estudos recentes de Newman e Cragg (2020), dentre muitos outros na literatura, demonstram a grande relevância que as plantas medicinais e os demais produtos naturais possuem na busca por novos agentes terapêuticos.

Dentre as plantas de uso consagrado no Brasil, as folhas ou partes aéreas de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq. *sin. Cordia verbenacea* DC.), são utilizadas no tratamento de infecções, úlceras gástricas, dores, inflamações e reumatismo pela população, sob a forma de infusos (chás), tinturas e “garrafadas” comercializadas em feiras populares e distribuídas em Farmácias Vivas e em outros projetos de fitoterapia (DE CARVALHO JR. et al., 2004; PASSOS et al., 2006). Além disso, a erva-baleeira está contida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde e faz parte do Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, que tem por finalidade orientar e estimular estudos a respeito da sua utilização (BRASIL, 2006; 2021).

Diferentes atividades terapêuticas já foram atribuídas aos compostos presentes nos extratos etanólico e hidroetanólico preparados a partir de suas folhas. Os resultados descrevem sua atividade anti-inflamatória e antiedemagênica por via tópica ou oral, baixa toxicidade aguda e teratogenicidade em diferentes modelos animais, além de uma potente ação na prevenção e redução de úlceras gástricas induzidas por etanol (SERTIÉ et al., 1988; 1991; 2005; ROLDÃO et al., 2008; SANTI et al., 2014; PEREIRA, 2017). O óleo essencial das folhas possui atividade anti-inflamatória (AMEIRA et al., 2009; LINS et al., 1990; MATIAS et al., 2010; VELDE et al., 1982) e constitui ingrediente ativo da formulação do medicamento fitoterápico Acheflan® (ACHÉ, 2015).

Assim, as plantas medicinais com propriedade anti-inflamatória são alternativas terapêuticas pela população frente a uma série de doenças inflamatórias crônicas

como, artrite reumatoide, osteoartrite, aterosclerose, diabetes mellitus, neurodegeneração, dentre outras (RECIO; ANDUJAR; RIOS, 2012; KUMAR et al., 2013). O processo inflamatório é complexo e modulado de muitas maneiras, desempenha papéis fisiológicos importantes no organismo (MEDZHITOV, 2008). Porém, quando exacerbado, seus os danos acarretam em prejuízos, comprometendo a função e a integridade de macromoléculas, aumento de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, sendo este associado a fisiopatologias de diversas doenças inflamatórias crônicas (TORRES et al., 2018; KHAN et al., 2020).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como foco avaliar o efeito do extrato de *V. curassavica* e de metabólitos isolados sobre a formação de produtos de glicação avançada (AGE). Os AGE (do inglês, *Advanced Glycation End-products*) são formados principalmente por via endógena, ocorrem em condições fisiológicas em todos os tecidos e fluidos corporais. São produtos formados a partir da interação de açúcares redutores com resíduos de aminoácidos presentes em proteínas. Seu acúmulo no organismo humano é favorecido em casos de hiperglicemia crônica, envelhecimento, padrões dietéticos, comprometimento dos mecanismos de desintoxicação dos AGE e estilo de vida pouco saudável como, sedentarismo, tabagismo e o estresse (ZENG et al., 2019), contribuindo para o agravamento e desencadeamento de diversas doenças crônicas e síndromes metabólicas (GUGLIICCI, 2000). Somado a isso, interfere negativamente nas propriedades químicas e funcionais de diversas proteínas, através da formação de ligações cruzadas intra- e interproteínas, interações com receptores celulares e favorecem a geração de radicais livres (ABATE et al., 2015; JAHAN; CHOUDHARY, 2015; VAN PUTTE; DE SCHRIJVER; MOORTGAT, 2016). A interação AGE com seu receptor RAGE (RAGE, do inglês *Receptor for Advanced Glycation End-products*) provoca aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e exacerbação na produção das espécies reativas de oxigênio nas células, o que resulta no aumento do estresse oxidativo e da inflamação (ZIEMAN; KASS, 2004; NEMET et al., 2011; CHAUDHURI et al., 2018).

Diversos mecanismos tem sido explorados com o objetivo de intervir na formação, acúmulo e danos oxidativos causados pelos AGE no organismo (TORRES et al, 2018; KHAN et al., 2020). Até o momento ainda não existem fármacos no mercado que atuem diretamente sobre os AGE. Sabe-se que algumas substâncias

químicas apresentam atividade antiglicação, mas ainda carecem de estudos complementares. Um exemplo de fármaco é a aminoguanidina, que possui atividade antiglicação excepcional, mas estudos clínicos constataram a presença de efeitos adversos relevantes fazendo com que fosse descontinuado seu uso terapêutico (THORNALLEY, 2003).

Diante do exposto, a temática abre caminhos para a prospecção de novos agentes terapêuticos com atividade antiglicação (WEI; HUANG, 2017; DARIYA; NAGARAJU, 2020; PERRONE et al., 2020). Trabalhos como este vão em consonância com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, cujo um dos objetivos é garantir à população o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006). Somado ao fato de ser uma planta nativa, utilizada como alimento não-convencional (PANC), pode promover o uso sustentável da nossa biodiversidade, estimulando o desenvolvimento da cadeia produtiva de insumos ativos e da indústria farmoquímica nacional.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito antiglicação do extrato das folhas de *V. curassavica* e de duas substâncias isoladas: dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Varronia curassavica* Jacq.

Varronia curassavica Jacq. (sinonímia *Cordia verbenacea* DC.) é uma planta nativa brasileira que pertence à família Boraginaceae (LUEBERT, 2016; STAPF, 2020), a qual contém aproximadamente 100 gêneros, com mais de 2000 espécies distribuídas em todo planeta. A ocorrência dos exemplares desta família são as regiões do mediterrâneo e no continente americano. No Brasil, a família está representada, principalmente, por nove gêneros e aproximadamente 150 espécies. Os gêneros incluem *Auxemma* Miers, *Cordia* L., *Heliotropium* L., *Lepidocordia* Ducke, *Moritzia* DC. ex Meisn., *Patagonula* L., *Rotula* Lour., *Thaumatocaryon* Baill. e *Tournefortia* L. e *Varronia* P.Br. (MELO; LEMOS, 2008).

Uma longa discussão gira em torno da classificação botânica das espécies contidas no gênero *Cordia*, sua grande variação morfológica, ocasiona em controvérsias sobre sua classificação taxonômica. Alguns autores defendem que o gênero *Cordia* é dividido em três subgêneros ou seções - *Cordia*, *Varronia* e *Myxa*, enquanto, estudos e análises por DNA, dados morfológicos, observações em campo, estudos em herbários somados a literatura, direcionam a uma nova classificação, onde a seção *Varronia* passa a ser um novo gênero. A principal diferença morfológica entre os gêneros *Cordia* e *Varronia* consiste nos tipos de hábito e inflorescências: árvores com inflorescências paniculadas ou cimósicas em *Cordia* e arbustos com inflorescências condensadas, capitato ou espicata, pequenas e compactas em *Varronia* (TARODA; GIBBS, 1986; BORHIDI et al., 1988; GOTTSCHING et al., 2005; MILLER; GOTTSCHILING, 2007).

Mesmo com a designação de um novo gênero, o nome definitivo para a espécie ainda não está determinado, sendo comum encontrar na literatura a adoção do nome *Cordia verbenacea* DC., *Varronia curassavica* Jacq, *Varronia verbenacea* (DC.) Borhidi, assim como, *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult., *Cordia cylindrostachya* (Ruiz & Pav.) Roem. & Schult., *Lithocardium fresenii* Kuntze, *Lithocardium salicinum* (A. DC.) Kuntze e *Lithocardium verbenaceum* Kuntze para uma única espécie (DE CARVALHO JR et al., 2004; MONTANARI JR., 2011). Considerando as atualizações da definição de novo gênero e em concordância com

o Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, a nomenclatura da espécie em questão se dará por *Varronia curassavica* Jacq neste presente trabalho (STAPF; SILVA, 2020).

Neste contexto, o gênero *Varronia* compreende cerca de 125 espécies neotropicais de arbustos multistemo com inflorescências condensadas e folhas uniformemente serrilhadas. Existem cerca de 36 espécies de *Varronia* no Brasil, sendo 21 destas espécies consideradas endêmicas estando presentes em todos os biomas brasileiros (CAMPOS-RÍOS; CHIANG-CABRERA, 2012; TÖLKE et al., 2013; SILVA; SILVA; MELO, 2019). *V. curassavica* é uma planta arbustiva, perene, com folhas de disposição paralelas e internas. As flores são pequenas de corolas brancas e reunidas em inflorescências escorpioides e vistosas (Figura 1). As partes aéreas apresentam forte odor despreendido pelo manuseio (LORENZI; MATOS, 2002).



Figura 1: *Varronia curassavica* Jacq no campo experimental do CPQBA-Unicamp, Paulínia-SP.
FONTE: PEREIRA (2017).

Esta espécie é nativa do Brasil, possui ocorrência ao longo de todo litoral brasileiro, principalmente no trecho compreendido entre os estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, possuindo vários nomes populares como maria-preta, maria-milagrosa e catinga-de-barão, sendo o mais comum “erva-baleeira” ou baleeira (LADEIRA, 2002). As preparações tradicionais empregam soluções hidroetanólicas das partes aéreas de *V. curassavica*, comumente utilizadas para tratar vários processos inflamatórios como gastrite, artrite, reumatismo e dores

musculares ou coluna (PINTO et al., 2009). Os chás (infusões e decocções) ou extratos aquosos também são empregados (LORENZI; MATOS, 2002). Além disso, *V. curassavica* faz parte da lista composta por 71 plantas com potencial terapêutico indicadas pelo Sistema Único de Saúde para estudos e do Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira 2ª edição, que atualmente orienta a preparação extemporânea de um infuso a partir de 3 gramas de folhas secas e 150 mililitros de água e, também, a preparação de gel contendo 10% de extrato hidroetanólico (70% v/v), ambos por via tópica no alívio de processos inflamatórios localizados (BRASIL, 2006; 2021).

Em 2005, o laboratório Aché lançou o medicamento fitoterápico Acheflan®, sendo este considerado por muitos o primeiro desse gênero a ser desenvolvido e produzido no Brasil advindo de uma espécie nativa brasileira. Esse medicamento é formulado com o óleo essencial de *V. curassavica* em sua composição e possui indicação anti-inflamatória de uso tópico (ACHÉ, 2016). O uso tradicional também é fundamentado na atividade anti-inflamatória, contudo, sob preparações alcóolicas (tinturas, alcoolaturas entre outras) que permite a extração de substâncias não voláteis de suas folhas (LORENZI; MATOS, 2002). Desta maneira, essas preparações feitas por populares são quimicamente diferentes da composição do óleo essencial contido no fitoterápico disponível no mercado.

Dito isso, algumas evidências farmacológicas já foram relatadas para o extrato hidroetanólico das folhas de *V. curassavica*. Sertié e colaboradores (1988; 1991; 2005) evidenciaram que o extrato hidroetanólico desta planta medicinal apresenta atividade anti-inflamatória e antiedemagênica quando administrado por via tópica ou oral, sendo que por via oral demonstrou também ação gastroprotetora, além de fraca ação analgésica, baixa toxicidade aguda em diferentes modelos animais, e baixa teratogenicidade em camundongos. Roldão e colaboradores (2008) utilizaram o extrato etanólico e identificaram uma potente ação na prevenção e redução de úlceras gástricas induzidas por etanol, correlacionado este efeito a provável melhoria da defesa antioxidante do estômago.

A atividade antioxidante, no entanto, foi esclarecida por Santi e colaboradores (2014), que ao analisarem o extrato etanólico das folhas de *V. curassavica* e diferentes frações, atribuíram melhor atividade na fração rica em flavonoides e

polifenóis. A atividade antifúngica do extrato etanólico de *V. curassavica* possui atividade moderada sobre *Candida albicans* e *C. krusei* (OLIVEIRA et al., 2010). Romão (2016) avaliou a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico (70%) de *V. curassavica*. Os ensaios realizados foram DPPH[•], ABTS^{•+}, O₂^{•-}, descolorimento da crocina (ROO[•]), HOCl e H₂O₂ e a concentração efetiva para capturar 50% (CE₅₀) das espécies reativas de oxigênio livres foram de 13,44, 7,02, 196,61, 10,93, 3,49 e 302,17 µg/mL, respectivamente.

O óleo essencial das folhas contém monoterpenos e sesquiterpenos, sendo o α -humuleno o marcador ativo, contido na formulação do medicamento fitoterápico Acheflan[®] que é indicado como anti-inflamatório, nas formas farmacêuticas creme e aerossol (AMEIRA et al., 2009; LINS et al., 1990; MATIAS et al., 2010; VELDE et al., 1982; ACHÉ, 2016). Uma revisão detalhada sobre a atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *V. curassavica* foi publicada recentemente (MARTIM; MARANHO; COSTA-CASAGRANDE, 2021).

Além das substâncias citadas acima, foram isoladas e identificadas outras substâncias das folhas da erva-baleeira (Figura 2) como os ácidos fenólicos: **(A)** ácido rosmarínico, **(B)** ácido cafeico, **(C)** ácido gálico e **(D)** ácido clorogênico; os flavonoides: **(E)** artemetina, **(F)** quercetina, **(G)** rutina, **(H)** 7,4'-dihidroxi-5'-carboximetoxi isoflavona, **(I)** 7,4'-dihidroxi-5'-metilisoflavona, **(J)** 5,6'-dihidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona e **(K)** 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona; e os triterpenos: **(L)** cordialina A, **(M)** (Z)-cordialina A e **(N)** cordialina B (VELDE et al., 1982; TICLI et al., 2005; ROLDÃO et al., 2008; MATIAS et al., 2013a; 2013b; SANTI et al., 2014; PEREIRA, 2017).

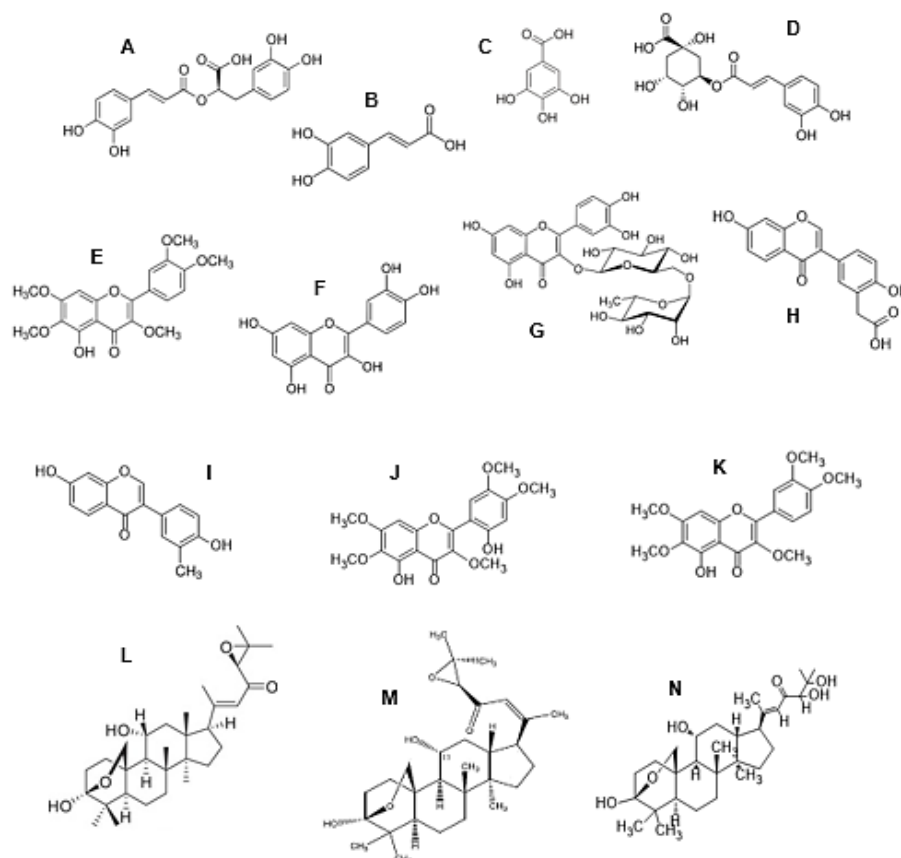


Figura 2: Metabólitos secundários isolados de *V. curassavica*: (A) ácido rosmarínico; (B) ácido cafeico; (C) ácido gálico; (D) ácido clorogênico; (E) artemetina. (F) quercetina; (G) rutina; (H) 7,4'-dihidroxi-5'-carboximetoxi isoflavona; (I) 7,4'-dihidroxi-5'-metilisoflavona; (J) 5,6'-dihidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona; (K) 5-hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona; (L) cordialina A; (M) (Z)-cordialina A; (N) cordialina B.

Nos extratos hidroetanólico e etanólico de folhas é possível encontrar três classes representativas que são os ácidos fenólicos (C6C3), flavonoides e triterpenos (TICLI et al., 2005; ROLDÃO et al., 2008; MATIAS et al., 2013a; 2013b). Dentre os ácidos fenólicos, o ácido rosmarínico é o majoritário (dados não publicados do nosso grupo de pesquisa), este composto químico está presente em outras plantas medicinais, como *Rosmarinus officinalis* L., e possui atividades bem estabelecidas na literatura como, antimicrobiano, anti-inflamatório, antitumoral, antienvhecimento, antioxidante, além das ações hipoglicemiante, nefro, hepato e cardioprotetoras (NADEEM et al., 2019).

Na classe dos flavonoides, há representantes dos subgrupos das isoflavonas e as polimetoxiflavonas. Deste último subgrupo, a artemetina possui maior teor (PEREIRA, 2017), esta substância também está presente em outras plantas medicinais, como a *Artemisia annua* L., e possui ação anti-inflamatória,

antimicrobiana, antirreumática e antioxidante. Outra polimetoxiflavona isolada foi a 5,6'-diidroxí-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona (SERTIÉ et al., 1988; 1990; PINTO et al., 2000; BAYEUX et al., 2002; ROMÃO, 2016; OZA; KULKARNI, 2017).

A última classe com presença significativa no extrato hidroetanólico de *V. curassavica*, são os triterpenos denominados cordialinas: cordialina A, (Z)-cordialina A (inicialmente denominada como *cis*-cordialina A) e cordialina B (VELDE et al., 1982; PEREIRA, 2017). Um sistema nanoencapsulado contendo cordialina A apresentou uma potente ação antitumoral frente às células de tumor cervical humano (BAVELONI, 2018). Pereira (2017), estudou a variabilidade do metabolismo secundário da *V. curassavica*, em que a produção desses metabólitos não é influenciada pelo ciclo circadiano, apenas pela época do ano, tendo maior teor de flavonoides nos períodos de temperaturas mais elevadas e de triterpenos em temperaturas mais amenas.

No entanto, além dos estudos com o extrato hidroetanólico e etanólico, outros solventes foram empregados no preparo de extratos vegetais de *V. curassavica*, consequentemente expandindo ainda mais a potencial atividade farmacológica que essa planta medicinal possui. Hernández e colaboradores (2003), avaliaram o extrato hexânico frente a 14 linhagens de microrganismos comumente associadas aos problemas intestinais, a pesquisa demonstrou eficácia contra bactérias tanto gram-positivas quanto as gram-negativas. Já o extrato metanólico de *V. curassavica* foi usado para verificar a sua ação contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados sugeriram que o extrato metanólico na presença de luz, pode ser eficaz no tratamento de infecções causadas por bactérias (MATIAS et al., 2010). Por fim, Kwiecinski et al. (2010) investigaram a atividade antitumoral do extrato supercrítico de *V. curassavica*, onde a citotoxicidade e a apoptose de células de carcinoma de Ehrlich foram avaliadas, concluindo que o extrato apresenta importante atividade anticarcinogênica.

De forma geral, os resultados encontrados na literatura demonstram que *V. curassavica* é uma espécie vegetal com uso tradicional consagrado e, cujos extratos e o óleo essencial apresentam atividades farmacológicas diversas. Dentre as atividades terapêuticas, conhecidas e popularmente exploradas, a capacidade de modular direta ou indiretamente os processos inflamatórios se destaca, o que é

refletido pelo desenvolvimento do medicamento fitoterápico à base de seu óleo essencial com esta indicação. Contudo, quando comparado o que se sabe sobre as atividades presentes no óleo essencial de *V. curassavica* que é constituído por substâncias voláteis, as atividades farmacológicas do EEVc e seus compostos químicos não voláteis ainda é restrito.

Se considerarmos que o uso tradicional desta planta emprega preparações como por exemplo, tinturas e alcoolaturas, e que até o momento não há restrições e contraindicações de uso, explorar as propriedades presentes no extrato etanólico e de seus compostos químicos se faz relevante, a fim de expandir seu emprego terapêutico e estabelecer maior racionalidade de seu uso e segurança aos usuários. Além disso, aproveita-se que a espécie utilizada no estudo é nativa o que fomenta o potencial brasileiro para produção de matérias-primas vegetais a partir da sua flora.

2.2 Formação de AGE e as doenças associadas

A glicação é uma reação não enzimática e se inicia, principalmente, quando açúcares redutores, como glicose e frutose, reagem com grupos nucleofílicos de aminoácidos constituintes de proteínas, lipídeos ou ácidos nucleicos, gerando os chamados produtos de glicação avançada (AGE, do inglês *Advanced Glycation End-Products*) (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009; ZHANG, et al., 2009; TORRES et al., 2018; KHAN et al., 2020).

Essa reação foi descrita pelo químico francês Louis Camille Maillard (1878-1936) em 1912, através dos estudos sobre as reações entre carboidratos e aminoácidos. Esta reação confere aos alimentos alteração na coloração, odor e agregação de sabor, esse processo é conhecido como reação de Maillard (HELLWIG; HENLE, 2014). Posteriormente, em 1920 o italiano Mario Amadori (1886-1941), foi um dos primeiros investigadores que elucidaram o mecanismo de reação de glicação, cuja característica principal consiste na geração da função α -amino-carbonila, nos açúcares. Estes intermediários resultam na formação de espécies carbonílicas altamente reativas (Figura 3) (ZHANG, et al., 2009; KHAN et al., 2020).

Os compostos dicarbonílicos formados neste processo reagem com o grupo amino de aminoácidos para a formação dos AGE. Em resumo, a glicosilação de

Os mecanismos elucidados ocorrem em qualquer açúcar redutor em sua conformação aberta, sendo a frutose mais reativa que a glicose. A reatividade de monossacarídeos parece estar relacionada com a abundância de sua forma aberta, a qual varia de 0,0002% para a glicose até 0,7% para a frutose (SEMCHYSHYN, 2013; VISTOLI, et al., 2013). Os AGE são formados principalmente por via endógena, ocorrem em condições fisiológicas em todos os tecidos e fluidos corporais e são também introduzidos no organismo de forma exógena. Existem poucos AGE que foram claramente estudados e identificados, sendo os mais comuns derivados dos compostos dicarbonílicos de glicoxal e metilglicoxal, e a 3-desoxiglicosona (Figura 4) (POULSEN et al., 2013).

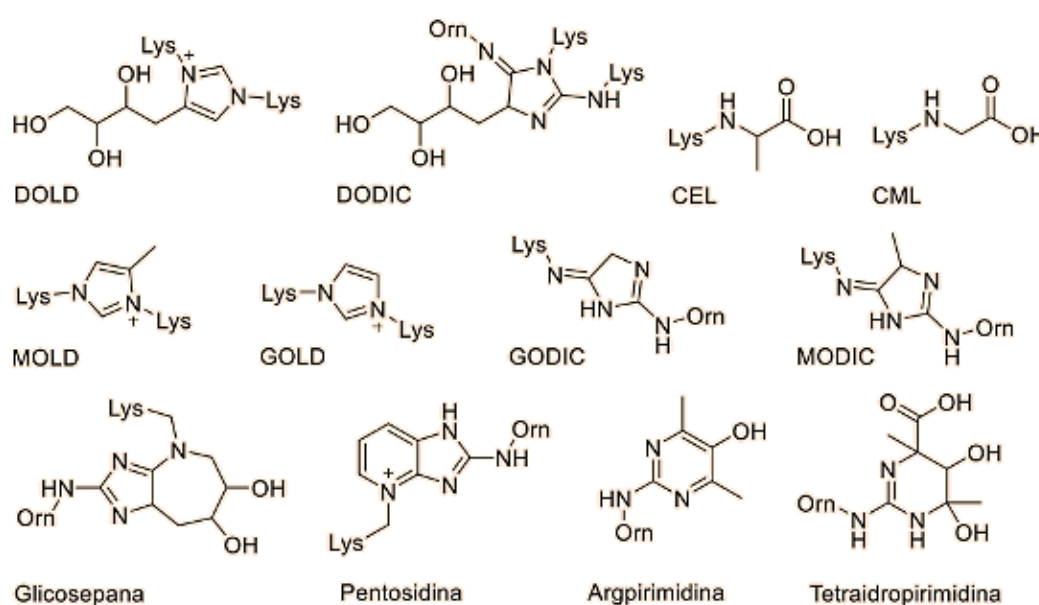


Figura 4: Estruturas de alguns AGEs. Lys: lisina; Orn: ornitina; DOLD: dímero de 3-desoxiglicosona-lisina; DODIC: produto da condensação cruzada entre lisina, arginina e 3-desoxiglicosona; CEL: carboxietil lisina; CML: carboximetil lisina; MOLD: dímero de lisina-metilglicoxal; GOLD: dímero de lisina-glicoxal; GODIC: produto da condensação cruzada entre lisina-arginina e glicoxal; MODIC: produto da condensação cruzada entre lisina-arginina. FONTE: POULSEN et al. (2013).

Uma revisão recente feita por Zheng e colaboradores (2019) detalha os fatores associados à acumulação de AGE no organismo humano, destacando que os fatores primários incluem hiperglicemia crônica, envelhecimento, padrões dietéticos (como alimentos hipercalóricos, com alto teor glicêmico e lipídico), comprometimento dos mecanismos de desintoxicação dos AGE e estilo de vida pouco saudável, como, sedentarismo, tabagismo e o estresse. Os AGE contribuem para o aparecimento ou agravamento de diversas doenças e síndromes metabólicas (GUGLIUCCI, 2000). Atuam modificando as propriedades químicas e funcionais de

diversas estruturas biológicas através da formação de ligações cruzadas intra- e interproteínas e interações com receptores celulares e geração de radicais livres (ABATE et al., 2015). A formação de ligação cruzada dos AGE com proteínas (*crosslinking* proteico), compromete a função e o desempenho celular, como das células do sistema imunológico, fibroblastos, queratinócitos e outras, além das proteínas na matriz extracelular, como colágeno e a elastina (JAHAN; CHOUDHARY, 2015; VAN PUTTE; DE SCHRIJVER; MOORTGAT, 2016).

Os AGE são os principais mediadores patogênicos das complicações diabéticas, como a retinopatia diabética, a nefropatia e a neuropatia diabética. O excesso de glicose presente no sangue do paciente diabético aumenta a formação dos AGE e de compostos dicarbonílicos. Estes chegam a apresentar duas a três vezes mais modificações nos resíduos de lisina e arginina que um paciente normoglicêmico (HELLWIG; HENLE, 2014). O acúmulo anormal de metabólitos dicarbonílicos e as consequências estruturais e funcionais promovidas por eles, especialmente sobre proteínas e DNA, também é conhecido como estresse dicarbonílico, o que contribui para o desenvolvimento de processos inflamatórios crônicos (RABBANI; THORNALLEY, 2018; SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020).

Alguns estudos demonstram também que proteínas ricas em resíduos de cisteína reagem com compostos dicarbonílicos, devido à alta reatividade dos grupos tiois (MOSTAFA et al., 2007). Isso explica porque a albumina, por exemplo, que é a proteína mais abundante do plasma humano, e que apresenta grande quantidade de cisteína em sua estrutura, corresponde a 80% do total de proteínas glicadas na circulação sanguínea (COHEN, 2003).

O receptor RAGE (do inglês, *Receptor for Advanced Glycation End-products*) pertence à superfamília das imunoglobulinas e controla a ativação do fator nuclear- κ - β responsável pela resposta inflamatória (ABATE et al., 2015). A interação AGE-RAGE provoca aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e exacerbação na produção das espécies reativas de oxigênio nas células, o que resulta no aumento o estresse oxidativo e inflamação (ZIEMAN; KASS, 2004; NEMET et al., 2011; CHAUDHURI et al., 2018). Desta maneira, a interação AGE/RAGE está associada a diversas disfunções fisiológicas como aterosclerose, osteoporose, asma, artrite, sarcopenia, diferentes tipos de neoplasias (BYUN et al., 2017; LIU et

al., 2017), e doença de Alzheimer e Parkinson, onde a interação leva ao aumento da inflamação, ao estresse oxidativo, disfunção e apoptose das células neuronais (BARBOSA et al., 2008; HELLWIG; HENLE, 2014; ABATE et al., 2015).

Algumas estratégias foram propostas por Hartog e colaboradores (2007) como alternativas para o controle dos níveis de AGE no organismo, dentre elas estão: (a) controle glicêmico: em pacientes diabéticos reduz o acúmulo de AGE; (b) antioxidantes: evitam a última etapa da reação de Maillard, que é catalisada pelo estresse oxidativo; (c) inibidores da formação da formação de AGE: como a aminoguanidina (THORNALLEY, 2003) que mais tarde apresentou efeitos colaterais significativos que fizeram com que os estudos fossem descontinuados (TORRES et al, 2018), clinicamente os inibidores de enzima conversora de angiotensina e agonistas do receptor de angiotensina II mostraram potencial, mas ainda carecem de mais estudos; (d): fármacos capazes de reverter a formação de *crosslinking*, como o ALT-711 que está ainda em fase de desenvolvimento; (e) melhoria dos hábitos de vida: redução do consumo de AGE exógenos, seja em alimentos, tabagismo e outros; (f) eliminação de AGE: desenvolvimento de uma forma solúvel do receptor de AGE ou uma lisozima de AGE; (g) inibição ou modulação do receptor de AGE: desenvolvimento de anticorpos do receptor de AGE; (h) inibição da transdução de sinal de AGE pode inibir as vias intracelulares induzidas pela interação AGE-receptor.

É nítido que esforços estão sendo feitos para conter a formação e o acúmulo dos AGE no organismo, contudo, os malefícios e a associação dos AGE com algumas doenças crônicas foram desvendados há pouco tempo. Isso faz com que seja necessário a prospecção de agentes com atividade antiglicação (DARIYA; NAGARAJU, 2020; PERRONE et al., 2020) a fim de minimizar os efeitos deletérios causados pela presença de AGE e promover o bem-estar e o tratamento racional e com qualidade àqueles que necessitam.

2.3 Agentes com atividade antiglicação e o potencial dos produtos naturais

A utilização de plantas medicinais e seus derivados para promoção do bem-estar humano já é bem estabelecida na literatura e faz com que sejam fonte e alternativa terapêutica em muitas localidades do mundo (WHO, 1999; LORENZI; MATOS, 2002). A busca por novos agentes terapêuticos faz com que os produtos

naturais de origem vegetal sejam amplamente explorados, devido ao fácil acesso e disponibilidade em relação a outras fontes naturais. Reflexo disso, é a quantidade expressiva de fármacos oriundos de produtos naturais aprovados nos últimos anos para uso humano (NEWMAN; CRAGG, 2020). Assim, averiguar potencial antiglicação dos produtos naturais têm sido significativo, uma vez que apresentam uma opção viável e com resultados promissores (SINGH et al., 2001; YEH et al., 2017; CRASCÌ et al., 2018; CORY et al., 2018; YILMAZ et al., 2018; RAUF et al., 2019).

A atividade antiglicação pode ser compreendida como a capacidade de uma substância química, ou conjunto delas, de inibir direta ou indiretamente a formação de AGE (TORRES et al., 2018; KHAN et al., 2020). A complexidade e as múltiplas vias de formação de AGE faz com que a interceptação da mesma possa ocorrer por diferentes alvos e classes de compostos (CHINCHANSURE et al., 2015), porém esta revisão terá como foco as plantas medicinais e as substâncias de origem natural.

Uma revisão feita por Chinchansure e colaboradores (2015) reuniu mais de 119 plantas medicinais e cerca de 20 produtos naturais com potencial ação antiglicação. Esses autores consideram que as plantas ricas em compostos fenólicos e triterpenos são vantajosas, uma vez que, essas classes de compostos exibem ação antioxidante e antiglicação, o que resultaria num sinergismo frente a formação e acúmulo de AGE, bem como na redução do estresse oxidativo. É sabido que outras atividades farmacológicas podem prevenir e evitar a promoção dos danos gerados pelos AGE como a atividade anti-inflamatória, hipoglicemiante e também inibição da resistência à insulina (DE LAS HAZAS, 2018; FERNANDEZ-GOMEZ et al., 2019).

Chinchansure e colaboradores (2015), destacam algumas plantas medicinais de uso tradicional com ação antiglicação, dentre elas estão: *Asparagus officinalis* L., *Azadirachta indica* A.Juss, *Boswellia sacra* Flueck., *Calendula officinalis* L., *Centella asiatica* (L.) Urb., *Punica granatum* L., *Tamarindus indica* L. e outras presentes na Ayurveda. Também destacam as plantas da medicina tradicional chinesa como *Panax notoginseng* (Burkill) F.H.Chen, *Polygala tenuifolia* Willd., *Salvia chloroleuca* Rech.f. & Aellen e outras. Algumas plantas com atividade antiglicação fazem parte do cotidiano, sejam como alimentos, temperos, especiarias, são estas: *Allium cepa*

L., *Allium fistulosum* L., *Coriandrum sativum* L., *Curcuma longa* L., *Mentha piperita* L., *Murraya koenigii* (L.) Spreng., *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss, *Thymus vulgaris* L., *Zingiber officinale* Roscoe, *Myristica fragrans* Houtt. e *Rosmarinus officinalis* L., *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Capsicum annuum* L., *Coffea arabica* L., *Musa × paradisiaca* L. e *Vitis vinifera* L.

As plantas citadas acima são ricas em polifenóis e alguns triterpenos, que de modo geral, possuem a capacidade de minimizar as consequências geradas pelo acúmulo de AGE. Na figura 5 podem ser visualizados os exemplos citados e outras substâncias químicas com origem semissintética ou sintética como a aminoguanidina, metformina e hidralazina (KESAVAN et al., 2013).

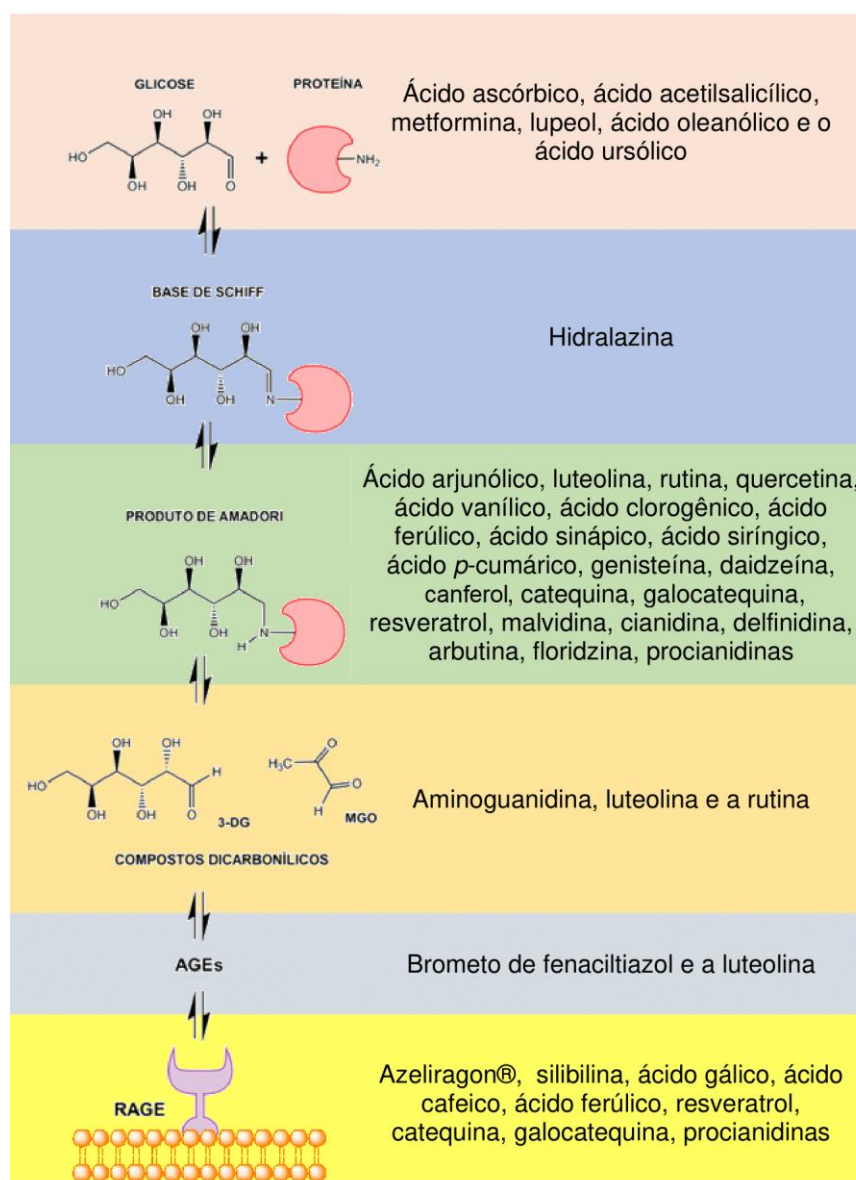


Figura 5: Representação das principais etapas da formação de AGEs e de substâncias químicas que interferem nestas etapas. FONTE: O autor.

A literatura apresenta produtos naturais com atividade antiglicação com atuação em diferentes etapas da formação de AGE. Como: (a) inibição da formação e/ou neutralização de radicais livres, diminuindo assim a oxidação dos compostos envolvidos; (b) Interação com compostos conhecidos como bases de Schiff e produtos de Amadori; (c) além de neutralizar compostos dicarbonílicos, alguns exemplos: ácidos ascórbico, clorogênico, oleanólico e ursólico, coumestrol, garcinol, hidroxitirisol, lupeol, luteolina e rutina (YAMAGUCHI et al., 2000; THORNALLEY, 2003; WU; YEN, 2005; ASGARPANAH; AMIN; PARVIZ, 2011; RAZA et al., 2015; SINGH et al., 2016; DE LAS HAZAS, 2018; FERNANDEZ-GOMEZ et al., 2019). Outros, (d) interagem diretamente com AGE e/ou RAGE, seja bloqueando os receptores de AGE ou atenuando sua expressão e sinalização, são eles: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, catequina, galocatequina, resveratrol, silibilina e procianidinas (WU; YEN, 2005; GUGLIUCCI et al., 2009; UMADEVI; GOPI; ELANGO VAN, 2014; GODYN et al., 2016; YILMAZ et al., 2018; CHAUDHARY et al., 2019; KANLAYA; THONGBOONKERD, 2019).

Como dito anteriormente, um produto natural pode atuar em diferentes etapas na formação de AGE (YIN, 2012). Outros produtos naturais, como as mucilagens extraídas de *Polygonum multiflorum* Thunb., *Dendrobium catenatum* Lindl., *Dimocarpus longan* Lour., *Opuntia monacantha* (Willd.) Haw., *Punica granatum* L. mostraram atividade antiglicação (ZHAO et al., 2007; YANG; ZHAO; JIANG, 2009; KOKILA et al., 2010; LUO; DENG; ZHA, 2008; LV et al., 2014; PAN, et al., 2013).

Os produtos naturais destacados acima demonstram que as plantas medicinais e os demais metabólitos secundários citados são candidatos com potencial terapêutico frente aos AGE. A diversidade química dos produtos naturais pode contribuir não só inibindo a atuação dos AGE, bem como aos demais processos prejudiciais envolvidos com a sua formação e permanência no organismo (CHINCHANSURE et al., 2015; GONZÁLEZ; MORALES; ROJAS, 2020).

A complexidade e mecanismos fisiológicos que conectam a formação de AGE, estresse oxidativo, processo inflamatório e como estão envolvidos com diversas doenças crônicas e neurodegenerativas ainda é um desafio a superar, clinicamente o número de fármacos encontrados com atuação específica e eficaz

ainda é muito pequeno (GONZÁLEZ; MORALES; ROJAS, 2020). Ademais, ainda é uma área relativamente pouca explorada, mas que aos poucos tem despertado o interesse e, conseqüentemente, a busca por alternativas terapêuticas seguras e eficazes. Os esforços nesse campo podem contribuir para monitoramento, prevenção e tratamento de diversas patologias associadas aos AGE (YEH et al., 2017; GONZÁLEZ; MORALES; ROJAS, 2020).

3 OBJETIVOS

Avaliar o potencial antiglicação do extrato etanólico das folhas de *Varronia curassavica* Jacq. e de dois metabólitos isolados, empregando sistema-modelo *in vitro* que mimetizam as modificações proteicas promovidas pelo estresse oxidativo.

3.1 Objetivos específicos

- Isolar, purificar, identificar e quantificar os dois metabólitos secundários isolados do extrato etanólico das folhas de *V. curassavica*;
- Monitorar a geração de produtos finais de glicação avançada fluorescentes e dos marcadores relacionados às modificações oxidativas dos resíduos de aminoácidos tirosina (ditirosina) e triptofano (quinurenina, *N'*-formilquinurenina) do extrato etanólico das folhas de *V. curassavica* e dos seus metabólitos secundários isolados;
- Determinar níveis de grupos carbonilas em proteínas resultante da incubação com metilglioxal com o extrato etanólico das folhas de *V. curassavica* e dos seus metabólitos secundários isolados;
- Avaliar a formação de ligações cruzadas em proteínas (*crosslinking* proteico) do extrato etanólico das folhas de *V. curassavica* e dos seus metabólitos secundários isolados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios cromatográficos de *V. curassavica* foram conduzidos no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, onde o nosso grupo de pesquisa desenvolve trabalhos com esta planta medicinal.

4.1 Aquisição do extrato etanólico de *Varronia curassavica*

O extrato etanólico das folhas de *Varronia curassavica* Jacq. (EEVc) foi obtido em outro trabalho deste grupo de pesquisa (PEREIRA, 2017). Informações sobre a obtenção do EEVc, estão descritas no anexo I. Este estudo foi realizado sob cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados A55E317 (Unesp, 48.031.918 / 0001-24) (Anexo II).

4.2 Fracionamento do extrato, isolamento/purificação, identificação e quantificação dos metabólitos secundários em EEVc

As condições de separação por extração em fase sólida (EFS) seguiram o descrito por Pereira (2017), sendo estas com poucas modificações. Foram utilizados 8 g de extrato seco misturados com a fase estacionária (1:1 m/m) e aplicados em coluna de vidro (12 x 10 cm) contendo sílica gel (Sigma-Aldrich® 60-200 µm). Os solventes empregados como fase móvel foram: hexano (Synth®), acetato de etila e metanol (Qhemis®). A eluição (V_{eluente} : 900 mL) foi realizada sob vácuo como segue: a) hexano:acetato de etila 8:2 (v/v) correspondem as frações: F1.1; F1.2; F1.3; b) hexano:acetato de etila 6:4 (v/v) para as frações: F2.1; F2.2; F2.3; c) acetato de etila 100% para as frações: F3.1; F3.2; F3.3; d) acetato de etila:metanol (9:1 v/v) para as frações: F4.1; F4.2; F4.3; F4.4; e) metanol 100% para as frações: F5.1; F5.2; F5.3). O volume de coleta de cada fração foi de 300 mL. As 16 frações foram secas em capela de exaustão e, em seguida, dessecador para remoção dos solventes orgânicos.

4.2.1 Análise por cromatografia em camada delgada das frações obtidas na EFS

Na análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foram preparadas soluções de cada uma das frações obtidas anteriormente e uma alíquota do extrato na concentração de 5 mg/mL em acetato de etila. Foram preparadas diferentes fases móveis com a finalidade de obter melhor separação entre as bandas. Os solventes

empregados como fase móvel foram: clorofórmio (Synth[®]), acetato de etila, metanol (Qhemis[®]) e acetonitrila (J.T. Baker[®]), nas seguintes proporções: A) clorofórmio:acetato de etila:metanol 5,5:3,5:1 (v/v); B) clorofórmio:acetato de etila 6:4 (v/v); C) acetato de etila:acetonitrila 9,8:0,2 (v/v). As amostras foram aplicadas em cromatoplaças de sílica gel C18 (Macherey-Nagel[®] 0,22 µm, 60G, F254), eluídas separadamente nas fases móveis descritas acima e reveladas com solução etanólica de ácido sulfúrico 10% (v/v), seguido de aquecimento em estufa (110° C).

4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV/Vis

4.2.2.1 Pré-tratamento e análise por HPLC-UV das frações e do EEVc

Para a análise por HPLC-UV as frações e o EEVc passaram por um pré-tratamento: 10,0 mg de cada amostra foram dissolvidos em 1,0 mL de metanol:água 95:05 (v/v) e submetidos a uma extração em fase sólida (EFS) em cartucho C18 (SAMPLIQ[®] 45 µm; 500 mg; 6 mL) que foi ativado com metanol e condicionado com metanol:água 95:05 (v/v). Após a aplicação da amostra, a coluna foi eluída com 4,0 mL de metanol:água 95:05 (v/v). O eluato foi seco num dessecador com sílica gel, sob pressão reduzida, solubilizado em metanol (1,0 mg/mL) e filtrado através de membrana de PVDF (Syring Filters[®] 0,22 µm). As amostras tratadas foram acondicionadas em *vials* sob refrigeração aguardando a análise cromatográfica.

As análises de uma alíquota de 20 µL de cada fração foram realizadas em cromatógrafo Thermo Scientific Ultimate 3000[®] com detector UV/Vis utilizando coluna de fase reversa C18 (Thermo Scientific[®] 250 x 4,6 mm; 5 µm), em condições de gradiente exploratório: 5-100% de metanol grau HPLC (J.T. Baker[®]) em 30 min mantendo 100% de metanol até 35 min; vazão de 1,0 mL/min; detector com comprimento de onda em 254 nm.

4.2.3 Isolamento e purificação dos picos das frações 4.1 e 4.3 por HPLC-UV preparativa

O pré-tratamento das frações 4.1 e 4.3 foi idêntico ao descrito no item 4.2.2.1. As análises de uma alíquota de 20 µL (concentração de 1,0 mg/mL) de cada amostra foram realizadas em cromatógrafo Perkin Elmer Flexar[®] UV/Vis utilizando coluna de fase reversa C18 (Thermo Scientific[®] 250 x 4,6 mm; 5 µm), vazão de 0,4

mL/min e com detector com comprimento de onda em 254 nm. As condições de fase móvel em modo isocrático foram otimizadas e para ambas frações corresponderam a metanol:água 75:25 (v/v).

Assim, as condições analíticas foram escalonadas considerando-se mesmo comprimento de coluna, tipo de fase estacionária, comprimento de onda de detecção e fase móvel. A vazão foi calculada com base na equação 1, onde, F_p é a vazão no modo semipreparativo; F_{an} é a vazão no modo analítico; d_p é o diâmetro interno da coluna semipreparativa; e d_{an} é o diâmetro da coluna analítica, segue:

$$F_p = \frac{F_{an} \times d_p^2}{d_{an}^2} \quad (\text{equação 1})$$

Desse modo, a purificação foi realizada em cromatógrafo Perkin Elmer Flexar® UV/Vis acoplado a uma coluna semipreparativa C18 (Agilent Eclipse XDB® 250 x 21,20 mm; 7 µm), com vazão de 8,0 mL/min e detecção em 254 nm. O pré-tratamento das frações 4.1 e 4.3 foi idêntico ao descrito no item 4.2.2.1, alterando a concentração da solução de injeção para 100 mg/mL. Após sucessivas injeções e coleta dos picos de interesse, ao final, as respectivas alíquotas foram reunidas para posterior evaporação dos solvente e pesagem.

4.2.3.1 Análises espectroscópicas das substâncias purificadas de F4.1 e F4.3

4.2.3.1.1 Análise por espectrofotômetro no ultravioleta/visível dos picos isolados de F4.1 e F4.3

Uma solução metanólica na concentração de 1 mg/mL foi preparada com cada uma das substâncias químicas isoladas e foi realizada uma varredura nos comprimentos de onda da região do ultravioleta e visível (210 - 450 nm) com auxílio de um espectrofotômetro no UV/vis de bancada (BioTek Instruments® Synergy™ H1) e software Gen5® para aquisição dos dados.

4.2.3.1.2 Análise por espectrômetro no infravermelho das substâncias purificadas de F4.1 e F4.3

Os espectros por infravermelho foram obtidos usando um espectrômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Tensor 27 (Bruker®). As amostras

foram analisadas através da técnica de reflexão totalmente atenuada (ATR), com um módulo de ATR equipado com cristal diamante. Os espectros foram obtidos sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com acúmulo de 32 varreduras, com uma resolução de 4 cm^{-1} , na faixa de absorção de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$; fonte: Laser de HeNe (emite radiação na região do infravermelho médio); Detector: DLaTGS.

4.2.3.1.3 Análise por HPLC-MS das substâncias purificadas de F4.1 e F4.3

Para obtenção dos espectros de massas (MS), foi utilizado um cromatógrafo Waters® HPLC ACQUITY QDa (HPLC-MS) equipado com coluna C18 (Thermo Scientific® 250 x 4,6 mm x 5 μm) em modo isocrático de metanol:água (75:25 v/v), sendo a água acidificada com 2% de ácido acético, vazão 1,0 mL/min, por 35 min e o volume de injeção correspondente a 10 μL . Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização ESI foram: voltagem do capilar: 0,8 kV, voltagem do cone: 15 V, temperatura da fonte ESI (modo positivo): 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N_2 : 350 °C, vazão do gás de dessolvatação: 600 L/h. A faixa de massas usada no modo de análise full-scan foi de 50 a 1000 (u) e foram monitoradas pelas massas das moléculas cationizadas com sódio $[\text{M} + \text{Na}]^+$ de m/z 400 e 600. O equipamento foi controlado pelo programa Empower 3 (Waters® Corporation) no qual foram feitas a aquisição e análise de dados.

4.2.3.1.4 Análise de RMN de ^1H e ^{13}C das substâncias purificadas de F4.1 e F4.3

As análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Assim, os espectros de RMN unidimensionais de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro Bruker® modelo DRX400 - Ultra Shield® (9,4 T) e sonda multinuclear de detecção direta (^1H : 400,13 MHz e ^{13}C : 100,61 MHz). Utilizou-se CDCl_3 como solvente e clorofórmio como referência interna. Para as análises, 10 mg de cada uma das amostras foram solubilizados em 500 μL de deuteroclorofórmio (Sigma Aldrich®) e transferidos para o tubo de RMN.

4.2.4 Quantificação da dihidropentametoxiflavona e cordialina A

Após o isolamento e identificação das substâncias dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A e verificado o alto teor de pureza alcançado, as mesmas foram utilizadas como padrão para a sua respectiva quantificação no EEVc. As curvas analíticas foram construídas a partir da área do pico de absorção dos padrões em relação a sua concentração nominal. A análise foi através da regressão linear, em que foi obtida a equação da reta e o coeficiente de correlação (r), sendo o critério de aceitação foi de $r \geq 0,99$. Para a quantificação, foram realizadas injeções sucessivas de cada um dos padrões variando de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$, o intervalo de concentração teve como base o estudo de sazonalidade realizado por Pereira (2017). A identificação dos picos obtidos na amostra do EEVc (1000 $\mu\text{g/mL}$), foi com base no tempo de retenção encontrado para os padrões.

Para a execução das análises foi utilizado um método previamente validado no nosso grupo de pesquisa e desenvolvido por Moro (2022). Fase móvel: (A) água acidificada com 2% de ácido acético e (B) metanol. O método gradiente seguiu 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,300 mL/min e volume de injeção de 5,0 μL , forno de coluna em 50°C. E como fase estacionária coluna C18 (Waters® Acquity UPLC BEH 50 x 2,1 mm; 1,7 μm) em cromatógrafo UPLC Waters® Acquity H Class PLUS com detector em 254 nm.

4.3 Avaliação do potencial antiglicação por meio de sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* com metilglioxal

Os ensaios pertinentes a avaliação do potencial antiglicação da *V. curassavica* foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sob supervisão da Profª Drª Amanda Martins Baviera e auxílio do aluno de iniciação científica Felipe Nunes Cardoso.

Foi utilizado na incubação a albumina sérica bovina (BSA: 10 mg/mL) (Sigma-Aldrich®) na presença de metilglioxal (MGO: 5 mM), em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) (Sigma-Aldrich®) contendo 0,02% de azida sódica (Merck®), a 37°C por 8 dias (sendo conduzidas incubações na ausência ou na presença de diferentes concentrações de EEVc (62,5; 125; e 250 $\mu\text{g/mL}$) e de dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A (12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) todas em triplicata, estas baseadas em estudos

anteriores do grupo de pesquisa. Na conversão em molaridade, as concentrações de dihidroxipentametoxiflavona corresponde a 0,125; 0,062; e 0,031mM, já a cordialina A é igual a 0,102; 0,051; e 0,025 mM. Como controle positivo foi a aminoguanidina (AG: 1 mM) (Sigma-Aldrich®), esquema da incubação no Apêndice I (SADOWSKA-BARTOSZ; GALINIAK; BARTOSZ et al., 2014; GÓMEZ, 2016).

No tampão fosfato, presente em todos os tubos, foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO: 5% v/v) (Sigma-Aldrich®), uma vez que este atuou como cossolvente na solubilização do EEVc e seus compostos isolados. As alíquotas foram coletadas nos dias 0, 1, 2, 4 e 8, para fazer as determinações descritas a seguir:

4.3.1 Determinação da formação de AGE fluorescentes

O monitoramento da geração de AGE fluorescentes foi realizado em espectrofluorímetro (Synergy TM H1, BioTek®), nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 355 e 430 nm, respectivamente (SÉRO et al., 2013). O potencial antiglicação do EEVc e dos compostos isolados foi avaliado mediante a comparação entre a fluorescência relativa aos AGE gerada na incubação de BSA + MGO frente a fluorescência relativa aos AGE gerada na incubação de BSA + MGO + EEVc e substâncias isoladas em diferentes concentrações.

Os valores de AGE foram obtidos após subtração aritmética do valor da fluorescência, medido em unidades arbitrárias (U. A.), dos AGE das soluções de AG incubadas em tampão menos o valor da fluorescência dos AGE das soluções de AG incubadas com BSA + MGO, o mesmo com as amostras testadas. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência.

4.3.2 Determinação da formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos

O monitoramento dos marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos presentes na BSA foi realizado em espectrofluorímetro (Synergy TM H1, BioTek®), nos respectivos comprimentos de onda de excitação/emissão: ditirosina (330/415 nm) (330/415 nm) como marcador de oxidação dos resíduos de tirosina; quinurenina (365/480 nm) e *N'*-formilquinurenina (325/434 nm), como marcadores da oxidação dos resíduos de triptofano (SADOWSKA-BARTOSZ; GALINIAK; BARTOSZ et al., 2014).

Os valores da fluorescência dos resíduos de ditirosina, quinurenina e *N'*-formilquinurenina foram obtidos após subtração aritmética da fluorescência dessas substâncias das soluções de AG incubadas em tampão menos a fluorescência das substâncias das soluções de AG incubadas com BSA + MGO, o mesmo com as amostras testadas. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência.

4.3.3 Quantificação de proteínas carboniladas

Grupos carbonil em proteínas (proteínas carboniladas, PCO) são usados como biomarcadores de dano oxidativo. Os níveis de PCO foram avaliados em reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), formando dinitrofenilhidrazona, monitorada à 370 nm (LEVINE et al., 1994).

A determinação de PCO ocorreu mediante adição de uma alíquota (100 µL) das amostras das incubações em dois microtubos, sendo um deles a teste (A) e o outro controle (C). No tubo A foram adicionados 400 µL de DNPH (10 mM) em HCl (2,5 M), para reagir com os grupos carbonil, enquanto que no tubo C foram acrescentados 400 µL de HCl (2,5 M). Ambos os tubos foram incubados por 1 hora na ausência de luz, sendo homogeneizado a cada 15 minutos e, em seguida, após a incubação foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (TCA, 20%), a fim de precipitar as proteínas. Após homogeneização, os microtubos ficaram 5 minutos em banho de gelo e, então, serão centrifugados a 10000 *g* por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados lavados duas vezes com 1,0 mL de acetato de etila: etanol (1:1 v/v), homogeneizados e centrifugados por 5 minutos a 10000 *g* a 4°C. Os pellets formados foram ressuspensos em 1,0 mL de ureia (6 M) (MEEPROM et al., 2013).

Os resultados foram obtidos com base na diferença entre os valores de absorbância dos microtubos A e C de cada amostra, onde a diferença encontrada será utilizada para o cálculo da concentração dos grupos carbonil, utilizando o coeficiente de extinção molar do DNPH ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.3.4 Modificação da BSA via formação de ligações cruzadas

A formação de ligações cruzadas em proteínas (*crosslinking* proteico) foi analisada via eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), tanto do dia 0 quanto do dia 8 de experimento. Em

suma, alíquotas de 3 μ L das incubações foram adicionadas à 9 μ L de tampão contendo por 62,5 mM de Tris-HCl (pH 6,8) (Sigma-Aldrich®), 10% de glicerol, 2% de dodecil sulfato de sódio (Sigma-Aldrich®), 100 mM de ditioneitol e 0,1% de azul de bromofenol; 1,5 μ L da solução resultante (volume que contém 3,75 μ g de proteína) foi submetido à separação eletroforética realizada em gel tipo SDS-PAGE (12%) por 1 hora e 30 minutos à 120 V, em tampão de eletroforese [25 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM de glicerol e 0,1% de SDS] (DOS SANTOS et al., 2019; MOTTA et al., 2020).

Terminada a separação eletroforética, o gel foi corado com solução de Coomassie blue por 30 minutos e, depois, passou por 3 lavagens de 15, 10 e 5 minutos, respectivamente, com solução descorante (10% metanol, 10% de ácido acético), seguidas pela permanência 48h em solução descorante, com o intuito de garantir uma melhor visualização das bandas no gel (DOS SANTOS et al., 2019; MOTTA et al., 2020). Assim, foram realizados cálculos densitométricos, por meio do programa Image J® 1.53k nas bandas geradas na região do *crosslinking*, para melhor mensurar as diferenças dentre as amostras.

4.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram analisados através da avaliação da variância One Way (ANOVA) seguida de análise de diferença pelo teste de Newman-Keuls. O software utilizado foi GraphPad Prism 9®. O nível de significância estatística considerado foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fracionamento de EEVc e isolamento/purificação de metabólitos secundários

5.1.1 Extração em fase sólida do extrato etanólico de *V. curassavica* e análise por cromatografia em camada delgada

Visando o isolamento dos metabólitos secundários, foi escolhido o extrato etanólico como ponto de partida, uma vez que este apresenta maior quantidade de triterpenos do que o hidroetanólico (PEREIRA, 2017). Assim, após a obtenção das frações, foram removidos os solventes para a determinação da massa. As respectivas massas foram: F.1.1 (0,508 g); F.1.2 (0,927 g); F.1.3 (0,275 g); F.2.1 (0,305 g); F.2.2 (0,591 g); F.2.3 (0,365 g); F.3.1 (0,619 g); F.3.2 (0,265 g); F.3.3 (0,798 g); F.4.1 (0,819 g); F.4.2 (0,315 g); F.4.3 (0,195 g); F.4.4 (0,263 g); F.5.1 (0,371 g); F.5.2 (0,311 g); F.5.3 (0,367 g), totalizando um rendimento de 91,17% da massa inicial. Posteriormente para análise em CCD, foram preparadas soluções de 5mg/mL de cada uma das frações em acetato de etila, 20µL de solução foram aplicadas em placas de sílica gel e procedeu a eluição de modo ascendente e unidirecional com posterior revelação com solução de ácido sulfúrico etanólico 10%. Foi calculado o fator de retenção (R_f) das bandas, a condição desejável foi a que o R_f ficasse entre 0,2 e 0,8. Através destas análises foi possível verificar a eficiência da separação e o perfil de cada fração em diferentes condições cromatográficas (Figura 6).

A condição que melhor atendeu este requisito foi a fase móvel (A): clorofórmio:acetato de etila:metanol 5,5:3,5:1 (v/v) (Figura 6A). Como pode ser observado, nas frações F1.1 até F3.2 não ocorreu uma separação eficiente, uma vez que as amostras não interagiram com a fase estacionária. Já a partir das frações F3.3 a F4.2 nota-se uma banda de coloração amarela ($R_f = 0,8$), coloração esta característica de terpenoides e das frações F4.2 a F5.3 ocorre o predomínio de bandas de coloração azulada/roxo, característico de compostos fenólicos na revelação com solução de ácido sulfúrico 10% em etanol (WAGNER, 1984; MATOS, 2009). A separação das substâncias nas diferentes frações na extração em fase sólida foi considerada adequada. Antes de conduzir para a cromatografia

preparativa, Pereira (2017), fez uma cromatografia em coluna para obter subfrações das frações de interesse, o que gerou ao todo 120 subfrações e depois reuniu aquelas que teve mesmo perfil químico, além disso, para otimização do processo e em termos de química verde, foi decidido eliminar esta etapa, ainda mais porque o autor utilizou como um dos solventes o benzeno. Assim, neste trabalho esta etapa foi eliminada, visto que, já na análise por CCD e posterior confirmação por HPLC-UV demonstraram que as frações F4.1-4 e F5.1-3 apresentaram perfil cromatográfico simples, sendo possível a purificação de substâncias por HPLC-UV preparativa de

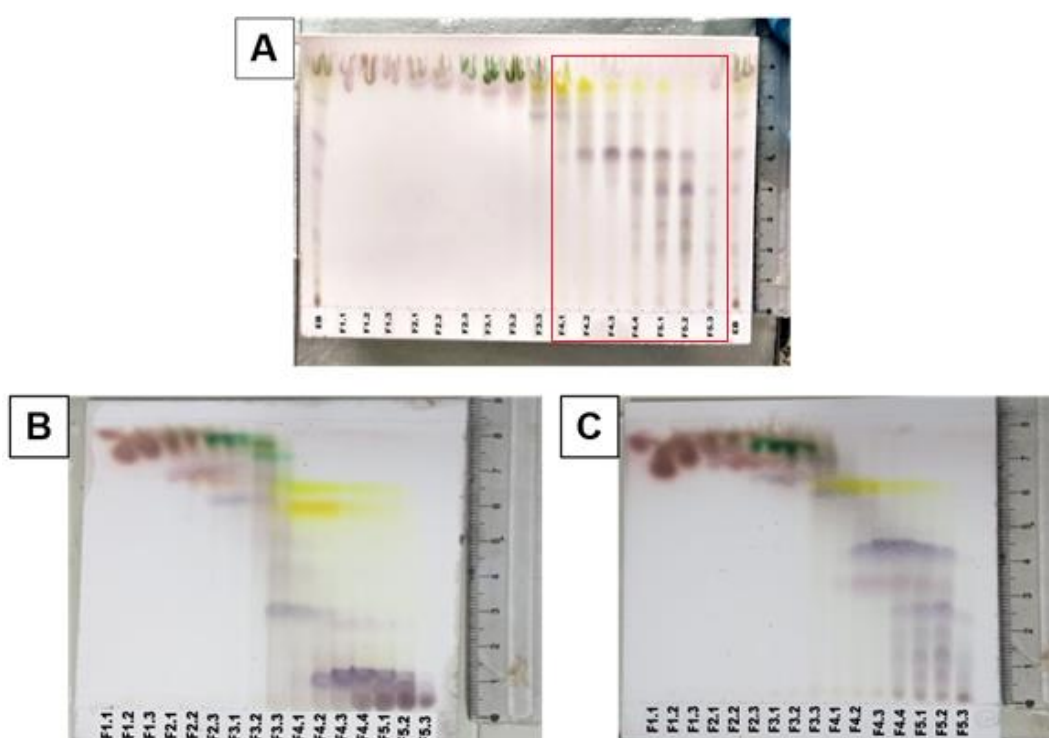


Figura 6: Cromatoplaça de sílica gel (0,25 mm) das frações EFS (F1.1 a F5.3) e EEVc (EB), ambas numa concentração de 5 mg/mL em acetato de etila e volume de aplicação igual a 20 μ L. Fase móvel **(A)**: clorofórmio:acetato de etila:metanol (5,5:3,5:1 v/v); **(B)**: clorofórmio:acetato de etila (6:4 v/v); **(C)**: acetato de etila:acetonitrila (9,8:0,2 v/v). Revelador: ácido sulfúrico 10%. Frações de interesse marcadas em vermelho na cromatoplaça A. forma direta.

5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV/Vis (HPLC-UV)

5.1.2.1 Análise por HPLC-UV das frações e do EEVc

Os cromatogramas obtidos por HPLC-UV (Figura 7) demonstram que ocorreu uma boa separação por meio da EFS inicial e está condizente com a CCD.

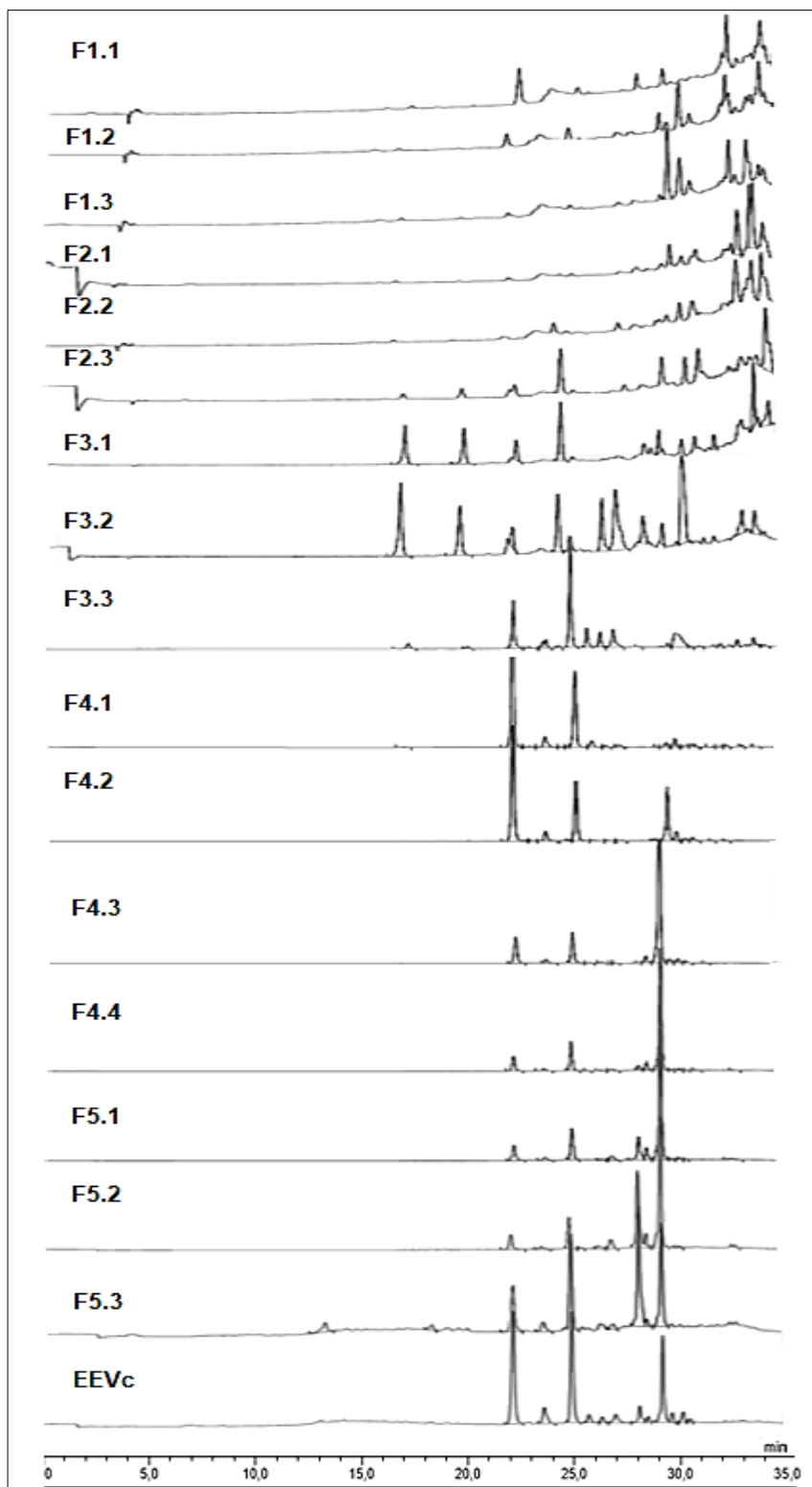


Figura 7: Cromatogramas do EEVc e das frações F1.1 a F5.3 em coluna Thermo Scientific® C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) em gradiente exploratório de 5-100% de metanol por 30 min e 100% de metanol até 35 min. Vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e detecção em 254 nm. Concentração das amostras: 1,0 mg/mL. Cromatógrafo Thermo Scientific Ultimate 3000®.

As frações que mostraram menor número de interferentes em relação aos componentes químicos do EEVc e rendimento obtido na EFS foram escolhidas para o isolamento por cromatografia líquida de alta eficiência no modo preparativo, sendo elas, F4.1 e 4.3 (Figura 7), em que o pico da F4.1 (t_R = 21,9 min) e o pico da fração F4.3 (t_R = 29,1 min) foram escolhidos por causa do seus rendimentos nessas frações.

5.1.3 Isolamento e purificação dos picos das frações 4.1 e 4.3 por HPLC-UV preparativa

O pré-tratamento das frações 4.1 e 4.3 foi idêntico ao descrito no item 4.2.2.1. As condições de fase móvel em modo isocrático foram otimizadas conforme descrito no item 4.2.3. As informações obtidas do método isocrático (Figura 8) serviram de base para o escalonamento para HPLC preparativo. O pico da fração 4.1, correspondente ao t_R = 9,9 min, resultou em 48,7 mg com característica de um pó levemente amarelado, cristalino com forma acicular; já a F4.3, correspondente ao t_R = 30,4 min, resultou em 36,4 mg com característica de um pó branco e amorfo. Outro pico foi isolado da fração F4.1 (t_R = 11,1 min), porém em menor quantidade, não sendo utilizado neste estudo.

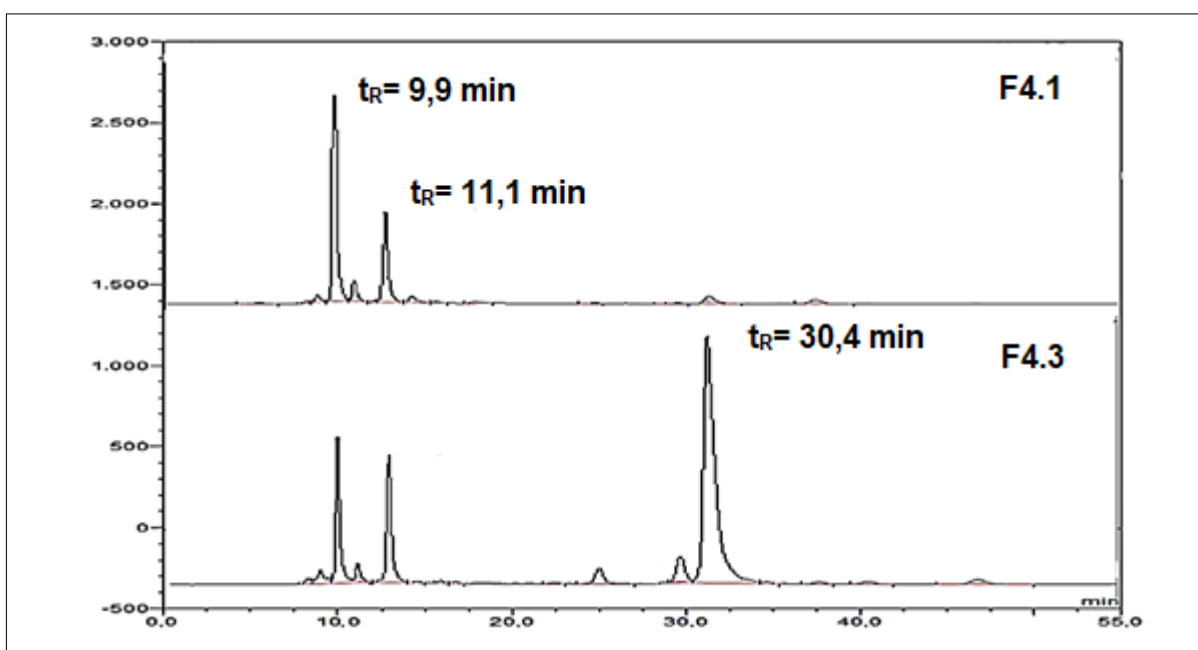


Figura 8: Cromatogramas da fração 4.1 e 4.3 obtidos no modo isocrático metanol:água (75:25 v/v) com volume de injeção igual a 20 μ L em cromatógrafo Perkin Elmer Flexar® UV/Vis utilizando coluna de fase reversa C18 Thermo Scientific® (250 x 4,6 mm; com partículas de 5 μ m), vazão de 0,4 mL/min e com detector com comprimento de onda em 254 nm. Concentração das amostras: 1,0 mg/mL.

Após o isolamento dos picos de interesse, os mesmos foram analisados para que as suas respectivas purezas fossem determinadas (Figura 9). Assim, através da normalização da área dos picos nos cromatogramas, verificou-se que os picos isolados da F4.1 ($t_R = 9,9$ min) e F4.3 ($t_R = 30,4$ min) possuem pureza correspondente a 98,7% e 95,8%, respectivamente (HPLC-UV, 254 nm).

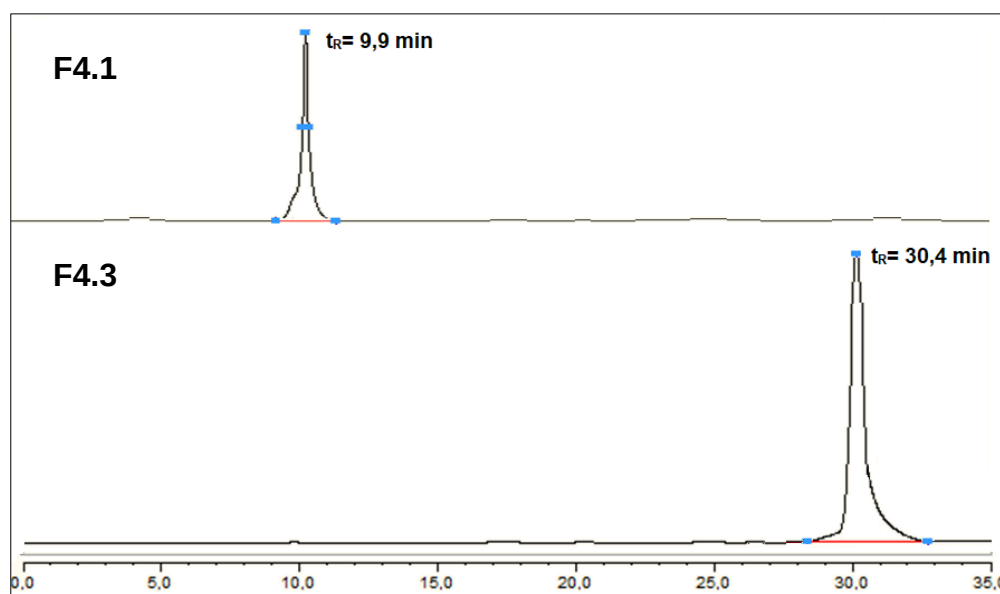


Figura 9: Cromatogramas dos picos isolados das frações F4.1 ($t_R = 9,9$ min) e F4.3 ($t_R = 30,4$ min) obtidos no modo isocrático metanol:água (75:25 v/v) com volume de injeção igual a 20 μ L em cromatógrafo Perkin Elmer Flexar® UV/Vis utilizando coluna de fase reversa C18 Thermo Scientific® (250 x 4,6 mm; com partículas de 5 μ m), vazão de 0,4 mL/min e com detector com comprimento de onda em 254 nm. Concentração das amostras: 1,0 mg/mL.

5.1.4 Análise espectroscópica dos metabólitos secundários isolados de EEVc

5.1.4.1 Determinação estrutural da dihidroxipentametoxiflavona isolada da F4.1

A estrutura química da dihidropentametoxiflavona isolada da F4.1 foi determinada através dos dados espectrométricos obtidos a partir da espectrometria de ressonância magnética nuclear unidimensional (RMN ^1H e ^{13}C), espectrometria de massas (EM), espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV) e no ultravioleta (UV).

De acordo com o espectro no UV (Figura 10A) é possível observar bandas com $\lambda_{\text{máx}}$ 255 e 348 nm, sendo estas características de compostos fenólicos, especialmente de flavonoides, que possuem duas bandas de absorção máxima no

UV entre 240-400 nm. Mabry e colaboradores (1970) atribuem a absorção entre 240-280 nm, devido ao anel A ou sistema benzoil; já a absorção entre 300-380 nm devido a presença do anel B ou sistema cinamoil. Isso, corrobora com a hipótese de a substância em questão pertencer ao subgrupo das flavonas (Figura 10B), já identificadas anteriormente no extrato etanólico desta espécie vegetal (VELDE et al., 1982; SERTIÉ, 1990; 1991).

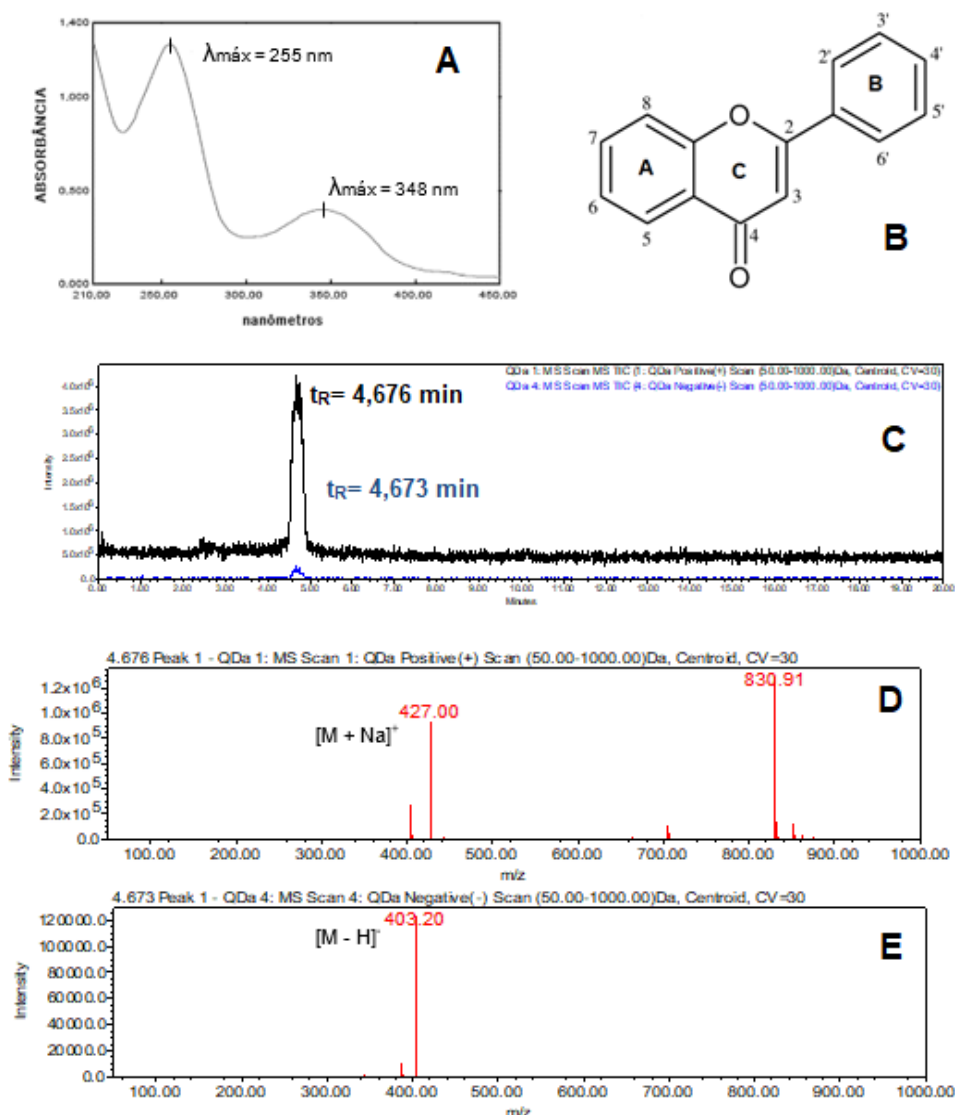


Figura 10: (A) Espectro de varredura UV/Vis (210-450 nm) em espectrofotômetro (BioTek Instruments® Synergy™ H1), de dihidroxipentametoxiflavona (1,0 mg/mL) em metanol; (B) estrutura química das flavonas; (C) cromatograma (TIC, ESI⁺) em preto e (TIC, ESI⁻) em azul de dihidroxipentametoxiflavona (2,0 mg/mL) em metanol obtido por análise em HPLC-MS (Waters® HPLC ACQUITY QDa, coluna C18 (Thermo Scientific®) (250 x 4,6 mm, 5 μm), modo isocrático de metanol:água acidificada com 2% ácido acético (75:25 v/v), tempo de 35 min, com vazão de 1 mL/min e volume de injeção igual a 20 μL ; (D) espectros de massas HPLC-MS de dihidroxipentametoxiflavona obtidos por HPLC-MS no modo positivo (ESI⁺), sendo $m/z = 427,00$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ e (E) no modo negativo (ESI⁻), sendo $m/z = 403,20$ $[\text{M} - \text{H}]^-$.

A análise por HPLC-MS (Figura 10C), forneceu o cromatograma total de íons (TIC) da dihidroxipentametoxiflavona, tanto no modo positivo (em preto), quanto no modo negativo (em azul), com o $t_R = 4,676$ min, tendo apenas um único pico, o que corrobora com a alta pureza encontrada para essa substância HPLC-UV (98,7%). A figura 10D apresenta o espectro de massas no modo positivo e a figura 10E no modo negativo. De acordo com o espectro da figura 10D (ESI^+), é possível visualizar a presença do íon aduto formado com íon sódio $[M + Na]^+$, com $m/z = 427,0$, que corresponde a uma massa molecular de 404,0 Da. Essa informação leva a hipótese que provavelmente o flavonoide isolado não seja a artemetina encontrada por Pereira (2017) no mesmo extrato, já que esta apresenta massa inferior ao encontrado, sendo de 388,1158 Da. Na *V. curassavica* é possível encontrar diferentes flavonoides, sobretudo flavonas polimetoxiladas, com múltiplas posições de metoxilação no anel fundamental flavonoídico (BERIM; GANG, 2016). O pico com valor de $m/z = 830,9$, poderia ser explicado pela dimerização que pode ocorrer durante a análise produzindo o íon $[M+M+Na]^+$, que pode ser influenciado pela diferença entre os potenciais do cone de amostragem de íons e o cone extrator (CROTTI et al., 2006; LEAL, 2017). Já na figura 10E, o pico gerado (ESI^-), corresponde a íon $[M-H]^-$ com valor de $m/z = 403,2$, o que corrobora com os dados encontrados no modo íon positivo.

Com a finalidade de obter mais informações sobre a dihidropentametoxiflavona isolada da F4.1, foram obtidos dados por IV através do sensor de reflexão totalmente atenuada (ATR) em espectrômetro com absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Figura 11). As bandas relevantes à identificação de possíveis grupos funcionais foram elencadas (tabela 1) com seus número de onda e atribuições.

Tabela 1: Bandas de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}) da dihidroxipentametoxiflavona isolado de F4.1 e suas respectivas atribuições aos grupos funcionais.

Flavonoide (cm^{-1})	Literatura (cm^{-1})	Atribuições
3244	3550-3200 (a,b)	ν_s -O-H
3010	3000-3100 (a,b)	ν_s (=C-H) (aromático)
2987	2962 (a,b)	ν_{ass} -C-H (CH ₃)
1702	1700 (a)	ν_s C=O
1604	1600-1650 (a,b)	ν_s C=C
1454	1460 (a,b)	δ_{ass} -C-H (CH ₃)
1371	1375 (a,b)	δ_s -C-H (CH ₃)
1245	1241 (a,b)	δ_s C-O
1002	1100-1000 (a,b)	ν_s C-O (O-H)

880	900-690 ^(b)	δ_s -C-H (aromático)
(a) SILVERSTEIN et al. (2019); (b) NANDIYANTO et al. (2019).		

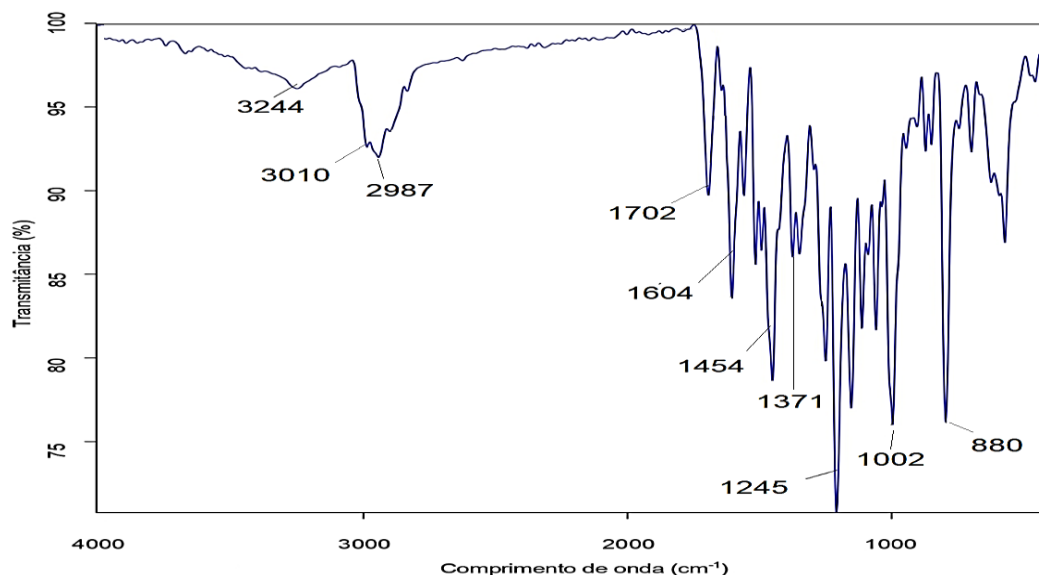


Figura 11: Espectro de absorção infravermelho com transformada de Fourier da dihidroxipentametoxiflavona isolada de F4.1

De acordo com a figura 11 e a tabela 1, foram observadas bandas de absorção em regiões referentes a deformações de ligações de grupos hidroxilas, carbonila, além de ligações duplas (correspondentes aos carbonos em ressonância nos anéis aromáticos) e deformações referentes aos grupos metilas na substância, coerentes com a estrutura química das dihidroxipentametoxiflavonas encontradas por Pereira (2017), os dados da análise por IV serão discutidos com os dados de RMN a seguir.

O espectro de RMN ^{13}C mostrou 20 sinais, sendo coerente com a estrutura do núcleo fundamental de compostos flavonoídicos ($\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$) pentametoxilado (+5 carbonos). Os sinais observados nos espectros de RMN ^{13}C (Tabela 1) com deslocamento químico (δ) de 62,1 q, 60,8 q, 56,0 q, 56,4 q e 56,8 q e RMN ^1H em δ 3,89 s, 3,93 s, 3,97 s, 3,94 s e 3,93 s e a presença de banda no espectro de IV em 2987 cm^{-1} e 1454 cm^{-1} correspondentes ao deformação axial e angular assimétrico da ligação C-H, respectivamente, e 1371 cm^{-1} ao deformação angular simétrico da ligação C-H, evidenciam a presença de cinco grupos metoxilas. Os sinais com valores de δ no espectro de RMN de ^{13}C típicos de carbonos aromáticos oxigenados em δ 152,8 s e 151,3 s foram atribuídos a carbonos ligados a hidroxilas fenólicas; os

sinais dos hidrogênios destas duas hidroxilas foram observados em δ 12,38 s e 7,90 s, em concordância com a banda larga observada no espectro de IV em 3244 cm^{-1} correspondente a deformação axial da ligação O-H, 1002 cm^{-1} para deformação axial simétrica da ligação C-O. As bandas presentes no espectro de IV em 3010 cm^{-1} e 710 cm^{-1} são atribuídas a deformação axial e angular simétrica da ligação C-H de anéis aromáticos. As posições dos grupos substituintes (cinco metoxilas e duas hidroxilas) nos anéis aromáticos (A e B) foram atribuídas com base na multiplicidade dos hidrogênios remanescentes nos anéis aromáticos (todos simpletos), na comparação com dados de RMN de ^{13}C de flavonas polimetoxiladas descritas na literatura e trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (IINUMA et al., 1986; PEREIRA 2017). Os sinais com valores de δ 103,0 d e 111,2 d observados no espectro de RMN de ^{13}C e em δ 6,64 s (1H) e 7,11 s (1H) no espectro de RMN de ^1H foram atribuídos às posições 3' e 6' do anel B. Os sinais em δ 6,52 s no espectro de RMN de ^1H e em δ 90,67 d no espectro de RMN de ^{13}C correspondem ao carbono não substituído do anel A (C8) e seu respectivo hidrogênio (H8). O sinal com valor de deslocamento químico de δ 177,4 s no espectro de RMN de ^{13}C mostrou a presença da carbonila e os sinais em δ 136,6 s (C3) e 155,9 s (C2) são referentes à ligação dupla no anel C.

Estas análises permitiram que fosse identificada a 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona (Figura 12), que ainda possuem não relatos na literatura sobre o seu isolamento em outro material vegetal, apenas por Pereira (2017) que utilizou o mesmo extrato de *V. curassavica* empregado neste trabalho. Iinuma e colaboradores (1986), a sintetizaram em laboratório a partir da substância brinckellina, isolada de *Brinckellia veronicaefolia* e *B. chlorolepis* (ROBERTS et al., 1984). A tabela 1 traz dados espectrométricos obtidos para a 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C .

Tabela 1: Dados espectrométricos de RMN obtidos para a 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-diidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 .

C	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H J (Hz)}^a$	$\delta^{13}\text{C}^b$	$\delta^1\text{H J (Hz)}^b$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H J (Hz)}$
2	155,4 s	----	156,1 s	----	155,9 s	----
3	140,4 s	----	136,7 s	----	136,6 s	----
4	179,0 s	----	177,6 s	----	177,4 s	----
5	153,0 s	----	152,9 s	----	152,8 s	----
6	132,6 s	----	132,6 s	----	132,6 s	----
7	158,7 s	----	159,2 s	----	159,1 s	----

8	90,6 <i>d</i>	6,67 <i>s</i>	90,8 <i>s</i>	6,51 <i>s</i> (1H)	90,6 <i>d</i>	6,52 <i>s</i> (1H)
9	155,4 <i>s</i>	----	153,0 <i>s</i>	----	152,8 <i>s</i>	----
10	113,1 <i>s</i>	----	106,5 <i>s</i>	----	106,4 <i>s</i>	----
1'	107,1 <i>s</i>	----	108,8 <i>s</i>	----	108,7 <i>s</i>	----
2'	152,9 <i>s</i>	----	154,0 <i>s</i>	----	154,0 <i>s</i>	----
3'	99,9 <i>d</i>	6,43 <i>s</i>	103,1 <i>d</i>	6,62 <i>s</i> (1H)	103,0 <i>d</i>	6,64 <i>s</i> (1H)
4'	152,9 <i>s</i>	----	151,3 <i>s</i>	----	151,3 <i>s</i>	----
5'	140,4 <i>s</i>	----	143,7 <i>s</i>	----	143,6 <i>s</i>	----
6'	110,2 <i>d</i>	6,94 <i>s</i>	111,0 <i>s</i>	7,10 <i>s</i> (1H)	111,2 <i>d</i>	7,11 <i>s</i> (1H)
OMe	60,9 <i>q</i>	3,79 <i>s</i>	62,3 <i>q</i>	3,88 <i>s</i> (3H)	62,1 <i>q</i>	3,89 <i>s</i> (3H)
OMe	60,6 <i>q</i>	3,80 <i>s</i>	61,0 <i>q</i>	3,92 <i>s</i> (3H)	60,8 <i>q</i>	3,93 <i>s</i> (3H)
OMe	56,3 <i>q</i>	3,81 <i>s</i>	56,2 <i>q</i>	3,96 <i>s</i> (3H)	56,0 <i>q</i>	3,97 <i>s</i> (3H)
OMe	56,4 ou 56,8 <i>q</i>	nd*	56,5 ou 56,8 <i>q</i>	3,93 <i>s</i> (3H)	56,4 <i>q</i>	3,94 <i>s</i> (3H)
OMe	56,4 ou 56,8 <i>q</i>	nd	56,6 ou 56,8 <i>q</i>	3,93 <i>s</i> (3H)	56,8 <i>q</i>	3,93 <i>s</i> (3H)
4' ou 2'- OH	----	----	----	7,89 <i>s</i> / (1H)	----	7,90 <i>s</i> (1H)
5-OH	----	----	----	12,36 <i>s</i> (1H)	----	12,38 <i>s</i> (1H)

(a) IINUMA et al, 1986; (b) PEREIRA, 2017; *nd= não identificado.

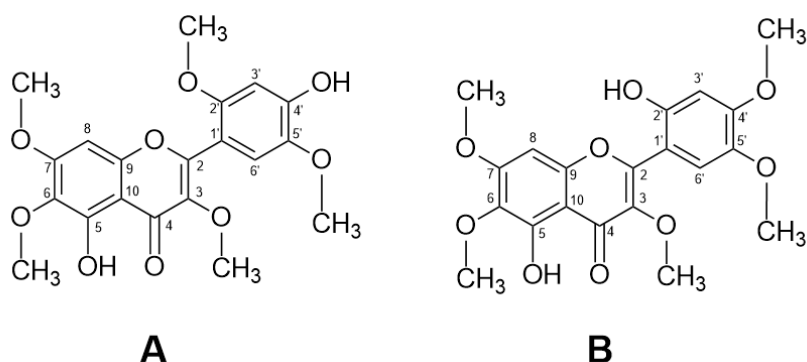


Figura 12: Estrutura química da 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona (A) ou 2',5-dihidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona (B).

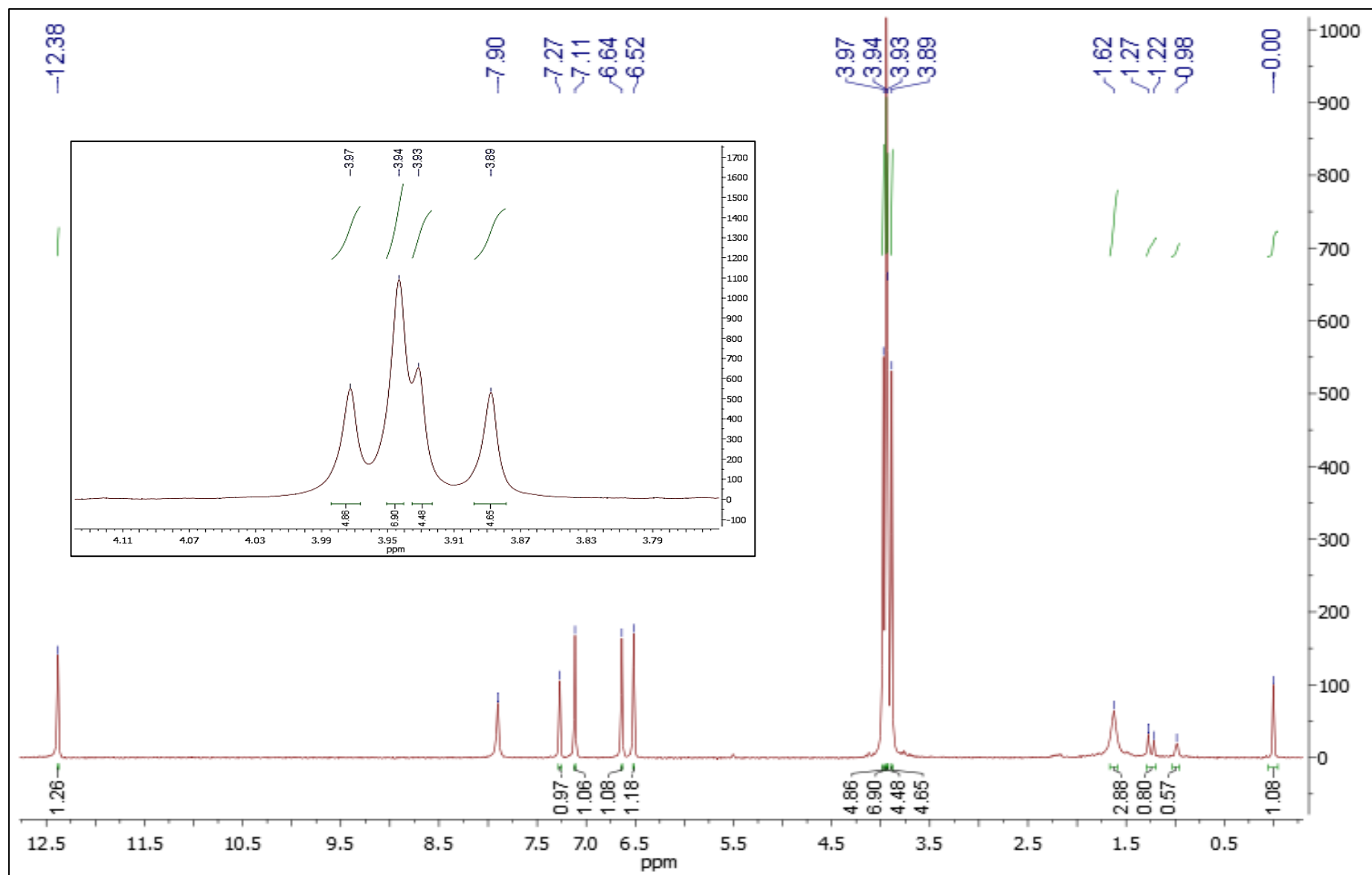


Figura 13: Espectro de RMN de ^1H de 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxyflavona ou 2',5-dihidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxyflavona obtido a 400 MHz em (20 mg/mL)

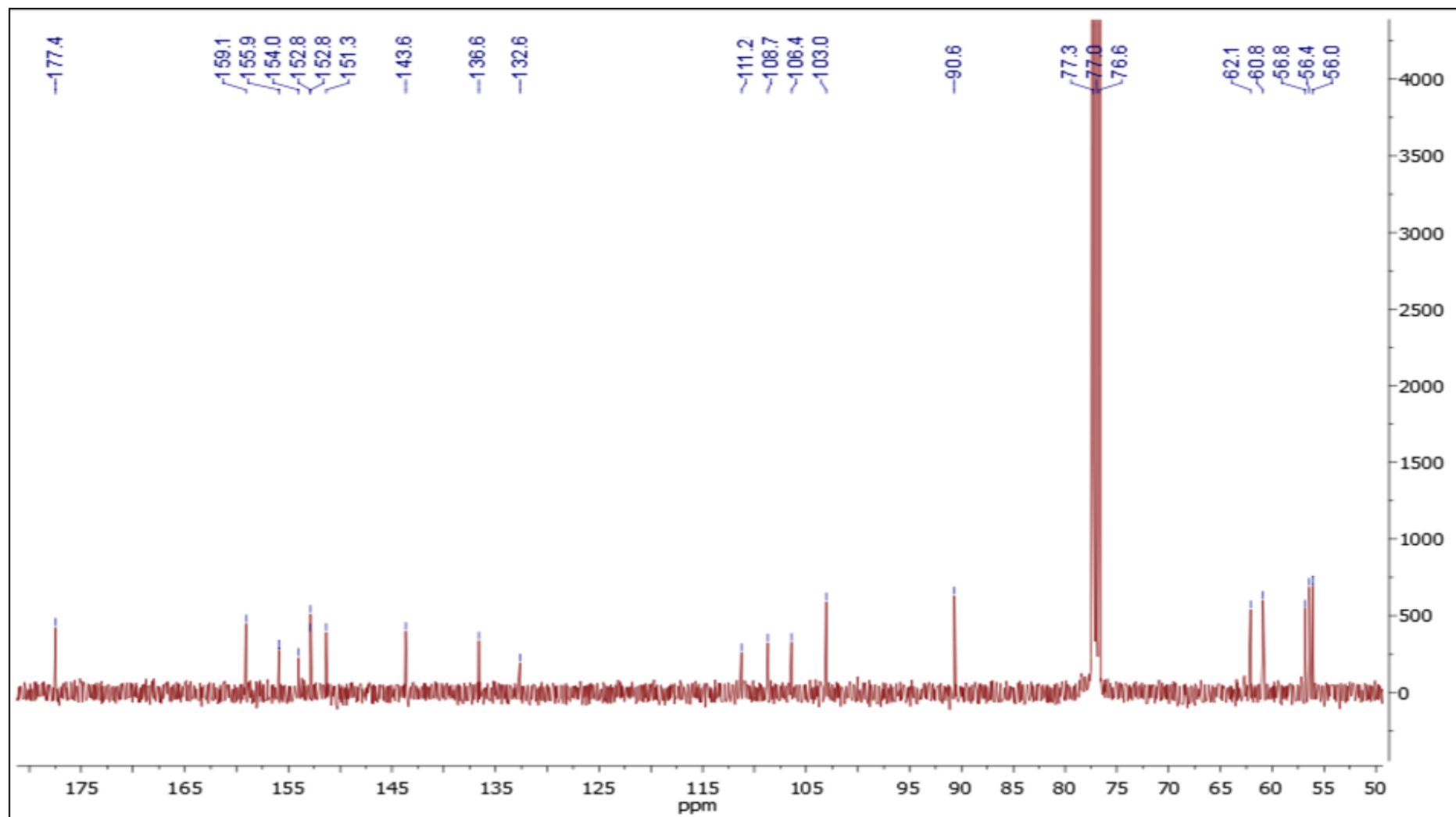


Figura 14: Espectro de RMN de ^{13}C de 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-dihidroxi-4',3,5',6,7-pentametoxiflavona obtido a 75 MHz em CDCl_3 (20 mg/mL).

5.1.4.2 Determinação estrutural da cordialina A isolada da F4.3

A estrutura química da cordialina A isolada da F4.3 foi determinada através dos dados espectrométricos obtidos a partir da espectrometria de ressonância magnética nuclear unidimensional (RMN de ^1H e ^{13}C), espectrometria de massas (EM), espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV) e ultravioleta (UV).

No espectro de UV da figura 15, a banda de absorção máxima foi observada em 255 nm (figura 15A), o que é característico dos triterpenos do tipo damarano presentes em *V. curassavica*, (cordialinas, Figura 15B) devido a presença de uma cetona α,β -insaturada na cadeia lateral. Pereira (2017) isolou e caracterizou também os triterpenos da erva-baleeira, sendo cordialina A e (Z)-cordialina A, Velde e colaboradores (1982), além desta identificaram a cordialina B.

Já a figura 15C, corresponde ao cromatograma (TIC) da cordialina A no modo positivo (ESI^+). Diferentemente do encontrado para a dihidroxipentametoxiflavona, íons não foram detectados em modo negativo. Dois picos foram observados com t_R de 24,885 e 33,083 min, o que corrobora com a alta pureza encontrada para essa substância (95,8%) por HPLC-UV. É possível visualizar a presença de adutos formado com íon sódio $[\text{M} + \text{Na}]^+$, com $m/z = 509,0$ e nas figuras 15D e 15E, que corresponde a massa molecular de 486,0 Da. O pico com valor de $m/z = 995,2$ poderia ser explicado pela dimerização da molécula produzindo o íon $[\text{M} + \text{M} + \text{Na}]^+$, que como dito anteriormente, pode ser influenciado pela diferença entre os potenciais do cone de amostragem de íons e o cone extrator (CROTTI et al., 2006; LEAL, 2017).

Esses resultados são compatíveis com os dados dos triterpenos denominados cordialinas. No TIC (Figura 15C) dessas amostras, como mencionado anteriormente há a presença de dois picos, o que poderia ser explicado pelo isomerismo que as cordialinas apresentam, o que dificulta a separação entre essas substâncias, ainda não se sabe os fatores que contribuem e/ou favorecem a isomerização, sabe-se que a forma mais abundante é a cordialina A, em relação ao seu isômero (Z)-cordialina A (VELDE et al., 1982; PEREIRA 2017).

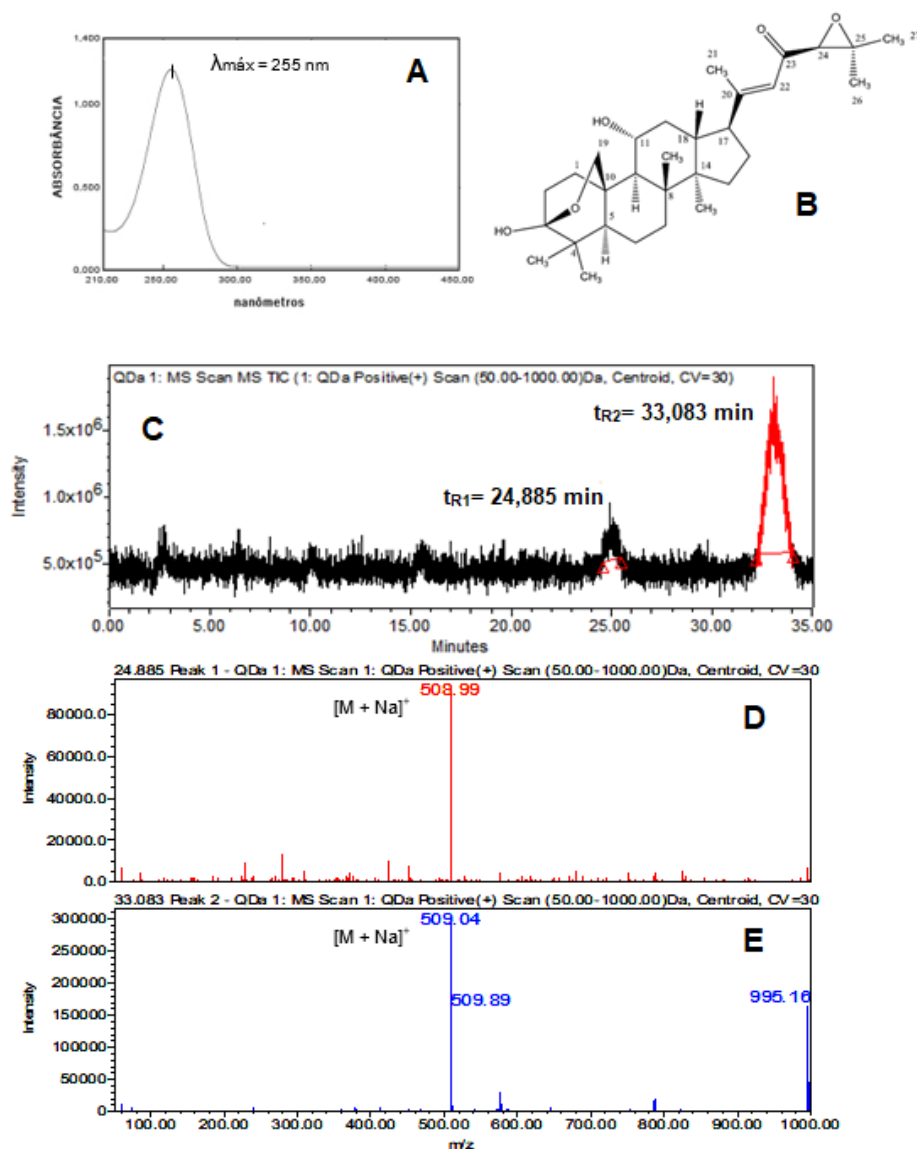


Figura 15: (A) Espectro de varredura UV/Vis (210-450 nm) em espectrofotômetro (BioTek Instruments® Synergy™ H1), de cordialina A (1,0 mg/mL) em metanol; (B) estrutura química da cordialina A; (C) cromatograma (TIC, ESI⁺) de cordialina A (2,0 mg/mL) em metanol obtido por análise em HPLC-MS (Waters® HPLC ACQUITY QDa), coluna C18 (Thermo Scientific®) (250 x 4,6 mm, 5 μ m), modo isocrático de metanol:água acidificada com 2% ácido acético (75:25 v/v), tempo de 35 min, com vazão de 1 mL/min e volume de injeção igual a 20 μ L; (D) espectros de massas de cordialina A obtidos por HPLC-MS no modo positivo (ESI⁺), sendo $m/z = 508,99$ $[M+Na]^+$ e (E) no modo positivo (ESI⁺), sendo $m/z = 509,04$ $[M+Na]^+$.

Também com a finalidade de obter mais informações sobre o triterpeno isolado da F4.3, foram obtidos dados por espectrometria no IV através do sensor ATR em espectroscopia FTIR (Figura 16). As bandas relevantes à identificação de possíveis grupos funcionais foram elencadas na Tabela 2 com seus respectivos número de onda e atribuições.

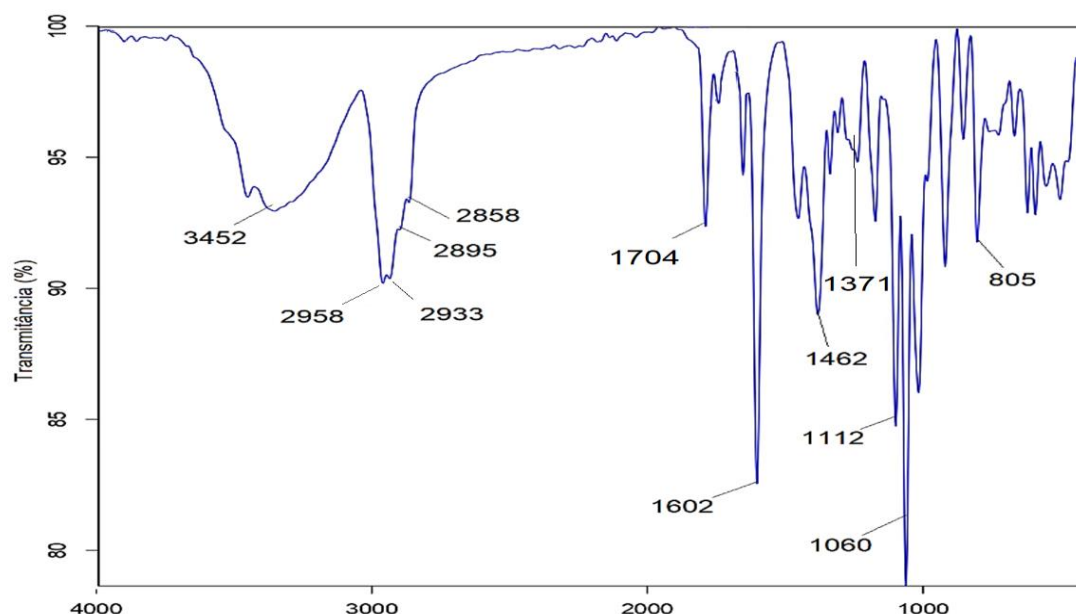


Figura 16: Espectro de absorção infravermelho com transformada de Fourier do triterpeno isolado de F4.3.

Tabela 2: Bandas de absorção na região do infravermelho do triterpeno isolado de F4.3 e suas respectivas atribuições aos grupos funcionais.

Triterpeno (cm ⁻¹)	Literatura (cm ⁻¹)	Atribuições
3452	3550-3200 (a,b)	ν_s -O - H
2958	2962 (a,b)	ν_{ass} -C - CH ₃
2933	2922 (a,b)	ν_s -C - CH ₂
2895	2870 (a,b)	ν_s -CH ₂
2858	2854 (a,b)	ν_s -C - CH ₂
1704	1700 (a,c)	ν_s C=O
1602	1600 - 1650 (c)	ν_s C=C
1462	1460 (a,b)	δ_{ass} -C - CH ₃
1371	1375 (b)	δ_s -C-H (CH ₃)
1112	1300-1100 (a,b)	ν_s C-C(=O)-C
1060	1100-1000 (a,b)	ν_s (C-O)
805	810 (a,b)	ν_s C-C=C-H trissubstituído

(a) SILVERSTEIN et al. (2019); (b) NANDIYANTO et al. (2019); (c) VELDE et al. (1982).

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram coerentes ao núcleo triterpênico do tipo damarano encontrado por Velde e colaboradores (1982) e Pereira (2017) (Tabela 3) e permitiram identificar a estrutura da cordialina A (Figura 17). Os sinais com valores de δ no espectro de RMN de ¹³C (Figura 18) em 98,3 s (C3) foi atribuído a hidroxila presente no anel A do núcleo tipo damarano, no espectro no IV a banda correspondente apresenta absorção em 3452 cm⁻¹. Já os valores de δ no espectro de RMN de ¹³C em 37,1 t (C12), 17,1 q (C21), 24,8 q, 18,6 q, 26,3 q, 18,8 q e 16,7 q (C26-C30) e no espectro de RMN ¹H (Figura 19) de 1,89 m, 2,12 m, 1,43 s,

1,27 *d*, 1,04 *s*, 1,01 *s*, 0,91 *s* correspondem aos sete grupos metilas presentes na cordialina A, relativas à absorções no espectro IV em 2958 e 1462 cm^{-1} correspondem a deformação axial e angular assimétrica da ligação C-CH₃. O valor de δ no espectro de RMN ^{13}C de 195,6 *s* foi atribuído ao grupo cetona presente em C23, absorvendo em 1704 cm^{-1} no espectro no IV. A absorção no IV em 1060 cm^{-1} indica a presença de grupo éter, sendo conferido ao C3 e ao C19, que no RMN ^{13}C , apresentou valor de δ igual a 98,3 *s* e 67,8 *t*. A absorção no IV em 805 cm^{-1} sugere a presença de uma ligação dupla trissubstituída, sendo conferido entre o C20 e C22, que no RMN ^{13}C , apresentou valor de δ igual a 164,2 *s* e 120,3 *d*.

Tabela 3: Dados espectrométricos de RMN obtidos para a cordialina A a 400 MHz para ^1H e a 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 .

C	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H J (Hz)}^a$	$\delta^{13}\text{C}^b$	$\delta^1\text{H J (Hz)}^b$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H J (Hz)}$
1	29,8 <i>t</i>	3,12 <i>td</i> (12,5; 6,0)	30,0 <i>t</i>	3,11 <i>td</i> (12,7; 5,9)	30,0 <i>t</i>	3,12 <i>td</i> (12,4; 5,9)
2	37,8 <i>t</i>	nd*	37,9 <i>t</i>	nd	37,8 <i>t</i>	nd
3	98,7 <i>s</i>	----	98,6 <i>s</i>	----	98,4 <i>s</i>	----
4	36,1 <i>s</i>	----	36,1 <i>s</i>	----	36,1 <i>s</i>	----
5	50,9 <i>d</i>	nd	50,9 <i>d</i>	1,31 <i>dl</i> (3,3)	51,0 <i>d</i>	1,31 <i>dl</i> (2,8)
6	19,4 <i>t</i>	nd	19,4 <i>t</i>	1,67 <i>dd</i> (12,3; 3,3) 1,48 <i>m</i>	19,4 <i>t</i>	1,66 <i>m</i> 1,48 <i>m</i>
7	34,3 <i>t</i>	nd	34,4 <i>t</i>	nd	34,3 <i>t</i>	nd
8	39,9 <i>s</i>	----	39,9 <i>s</i>	----	39,9 <i>s</i>	----
9	50,0 <i>d</i>	nd	50,1 <i>d</i>	1,56 <i>d</i> (11,0)	50,1 <i>d</i>	1,57 <i>d</i> (10,8)
10	41,0 <i>s</i>	nd	41,0 <i>s</i>	nd	40,9 <i>s</i>	nd
11	70,5 <i>d</i>	3,65 <i>td</i> (10,5; 4,2)	70,8 <i>d</i>	3,65 <i>td</i> (11,0; 3,9)	70,9 <i>d</i>	3,67 <i>td</i> (10,8; 4,0)
12	36,9 <i>t</i>	nd	37,2 <i>t</i>	1,85 <i>td</i> (11,2; 3,9)	37,2 <i>t</i>	1,89 <i>m</i>
13	44,8 <i>d</i>	nd	44,7 <i>d</i>	nd	44,6 <i>d</i>	nd
14	49,0 <i>s</i>	----	49,0 <i>s</i>	----	49,0 <i>s</i>	nd
15	31,7 <i>t</i>	nd	31,7 <i>t</i>	nd	31,6 <i>t</i>	----
16	27,9 <i>t</i>	nd	27,8 <i>t</i>	nd	27,8 <i>t</i>	nd
17	51,5 <i>d</i>	2,40 <i>td</i> (11,0; 6,0)	51,4 <i>d</i>	2,38 <i>td</i> (10,5; 5,7)	51,3 <i>d</i>	2,38 <i>td</i> (10,4; 6,0)
18	15,4 <i>q</i>	0,95 <i>s</i>	15,4 <i>q</i>	0,95 <i>s</i>	15,4 <i>q</i>	0,95 <i>s</i>
19	67,8 <i>t</i>	$\alpha\text{-H}$ 4,15 <i>dd</i> (8,5; 0,7) $\beta\text{-H}$ 4,32 <i>dd</i> (8,5; 2,0)	67,9 <i>t</i>	4,15 <i>dd</i> (8,5; 1,0) 4,31 <i>dd</i> (8,5; 2,5)	67,8 <i>t</i>	4,16 <i>dd</i> (8,6; 1,4) 4,33 <i>dd</i> , (8,6; 2,5)
20	164,8 <i>s</i>	----	164,6 <i>s</i>	----	164,3 <i>s</i>	----
21	17,3 <i>q</i>	2,12 <i>sl</i>	17,3 <i>q</i>	2,11 <i>sl</i>	17,2 <i>q</i>	2,12 <i>d</i> (0,8)
22	120,4 <i>d</i>	6,28 <i>sl</i>	120,5 <i>d</i>	6,27 <i>sl</i>	120,3 <i>d</i>	6,28 <i>sl</i>
23	195,7 <i>s</i>	----	195,7 <i>s</i>	----	195,7 <i>s</i>	----
24	66,4 <i>d</i>	3,34 <i>s</i>	66,4 <i>d</i>	3,33 <i>s</i>	66,3 <i>d</i>	3,34 <i>s</i>
25	61,2 <i>s</i>	----	61,2 <i>d</i>	----	61,0 <i>s</i>	----
26	24,9 <i>q</i>	1,42 <i>s</i>	25,0 <i>d</i>	1,42 <i>s</i>	24,9 <i>q</i>	1,43 <i>s</i>

27	18,6 <i>q</i>	1,27 <i>s</i>	18,7 <i>q</i>	1,26 <i>s</i>	18,7 <i>q</i>	1,27 <i>s</i>
28	26,4 <i>q</i>	1,03 <i>s</i>	26,4 <i>q</i>	1,03 <i>s</i>	26,3 <i>q</i>	1,04 <i>s</i>
29	18,8 <i>q</i>	1,01 <i>s</i>	18,9 <i>q</i>	1,00 <i>s</i>	18,9 <i>q</i>	1,01 <i>s</i>
30	16,8 <i>q</i>	0,90 <i>s</i>	16,9 <i>q</i>	0,90 <i>s</i>	16,8 <i>q</i>	0,91 <i>s</i>

(a) VELDE et al. (1982); (b) PEREIRA (2017); *nd= não detectado.

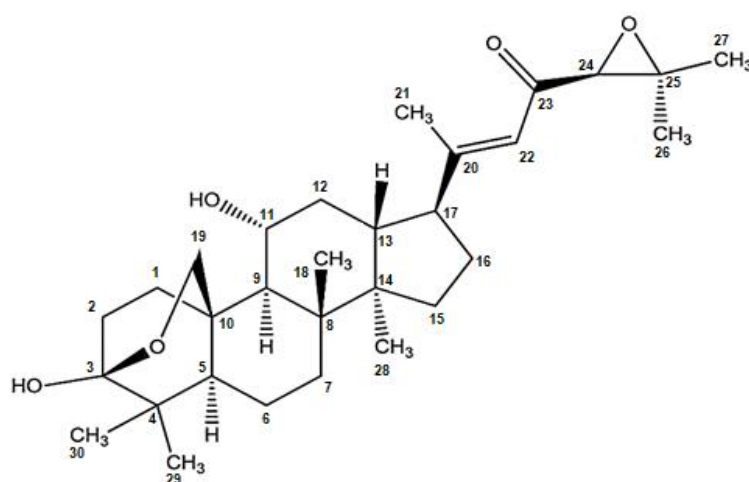


Figura 17: Estrutura química da cordialina A.

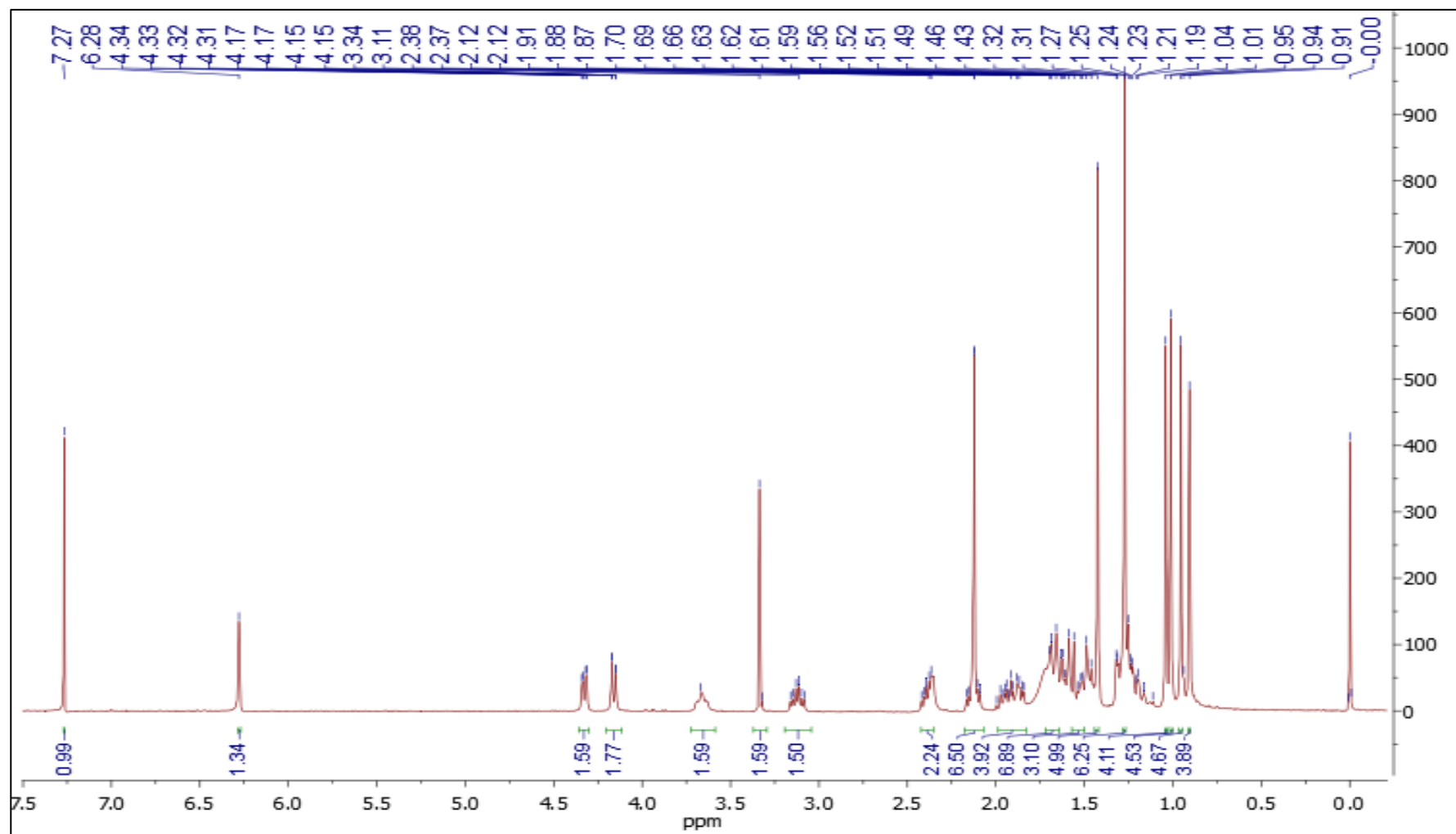


Figura 18: Espectro de RMN de ^1H de cordialina A obtido a 400 MHz em CDCl_3 (20 mg/mL).

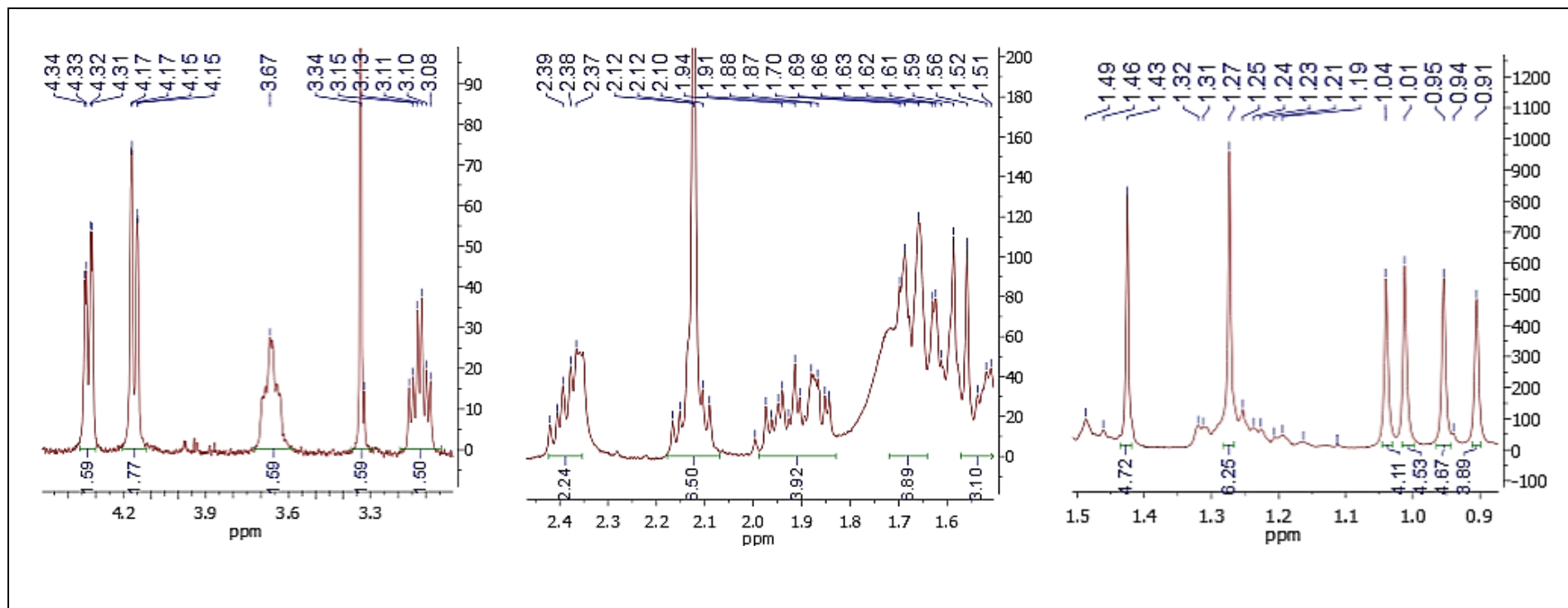


Figura 19: Expansão do espectro de RMN de ^1H de cordialina A obtido a 400 MHz em CDCl_3 (20 mg/mL).

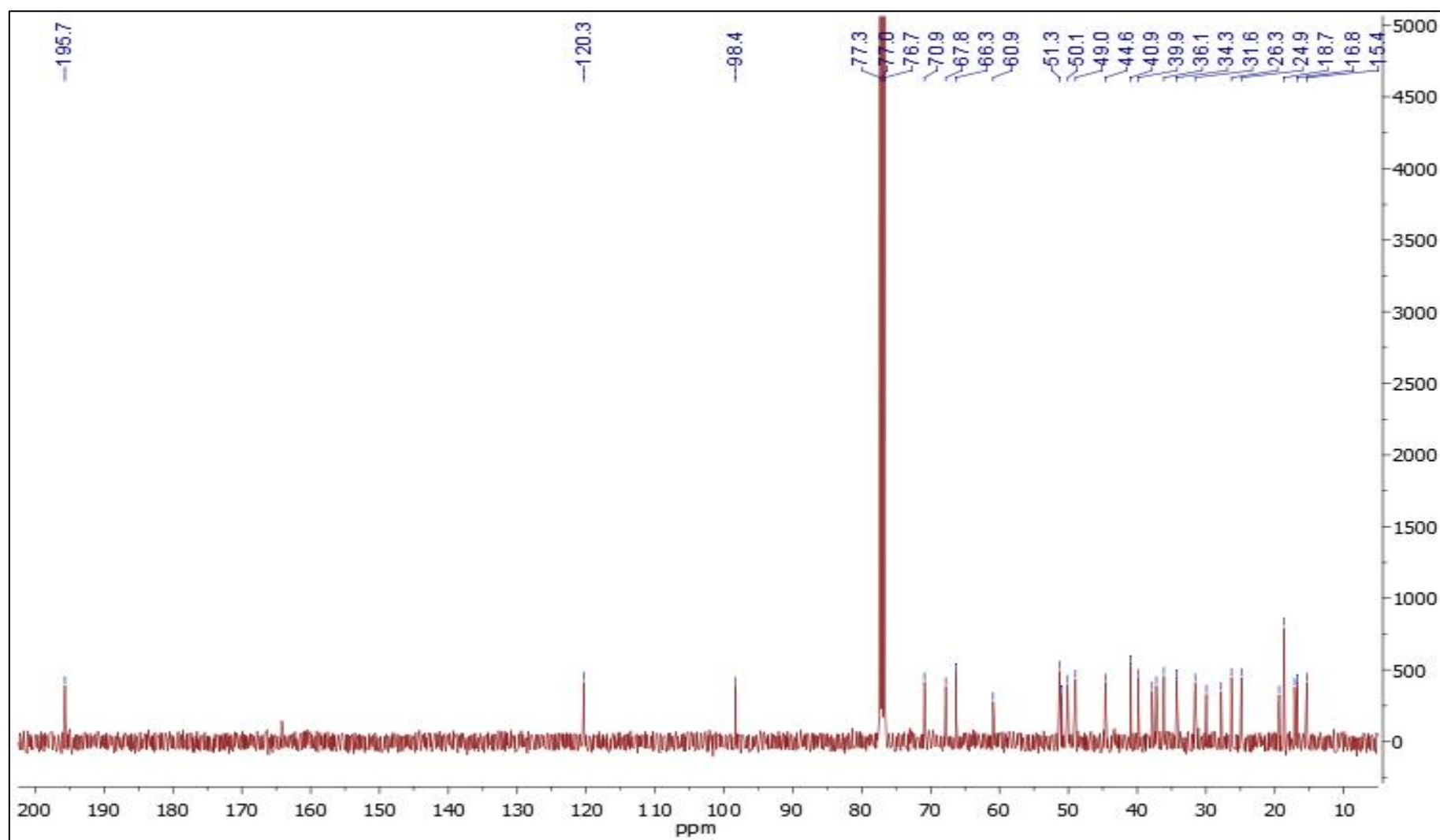


Figura 20: Espectro de RMN de ^{13}C de cordialina A obtido a 100 MHz em CDCl_3 (20 mg/mL).

5.1.5 Quantificação de dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A no EEVc

A quantificação seguiu como descrito no item 4.2.4, onde os padrões de dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A foram preparados, individualmente, nas concentrações de 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 $\mu\text{g/mL}$ em metanol e a solução de EEVc foi de 1000 $\mu\text{g/mL}$. A identificação dos picos obtidos na amostra do EEVc, foi com base no tempo de retenção encontrado para os padrões (Figura 21). Através de sucessivas injeções, as respectivas áreas de absorção dos picos obtidos em cada uma das concentrações foram plotadas em um gráfico de dispersão e analisados através da regressão linear (Figura 22 e 23).

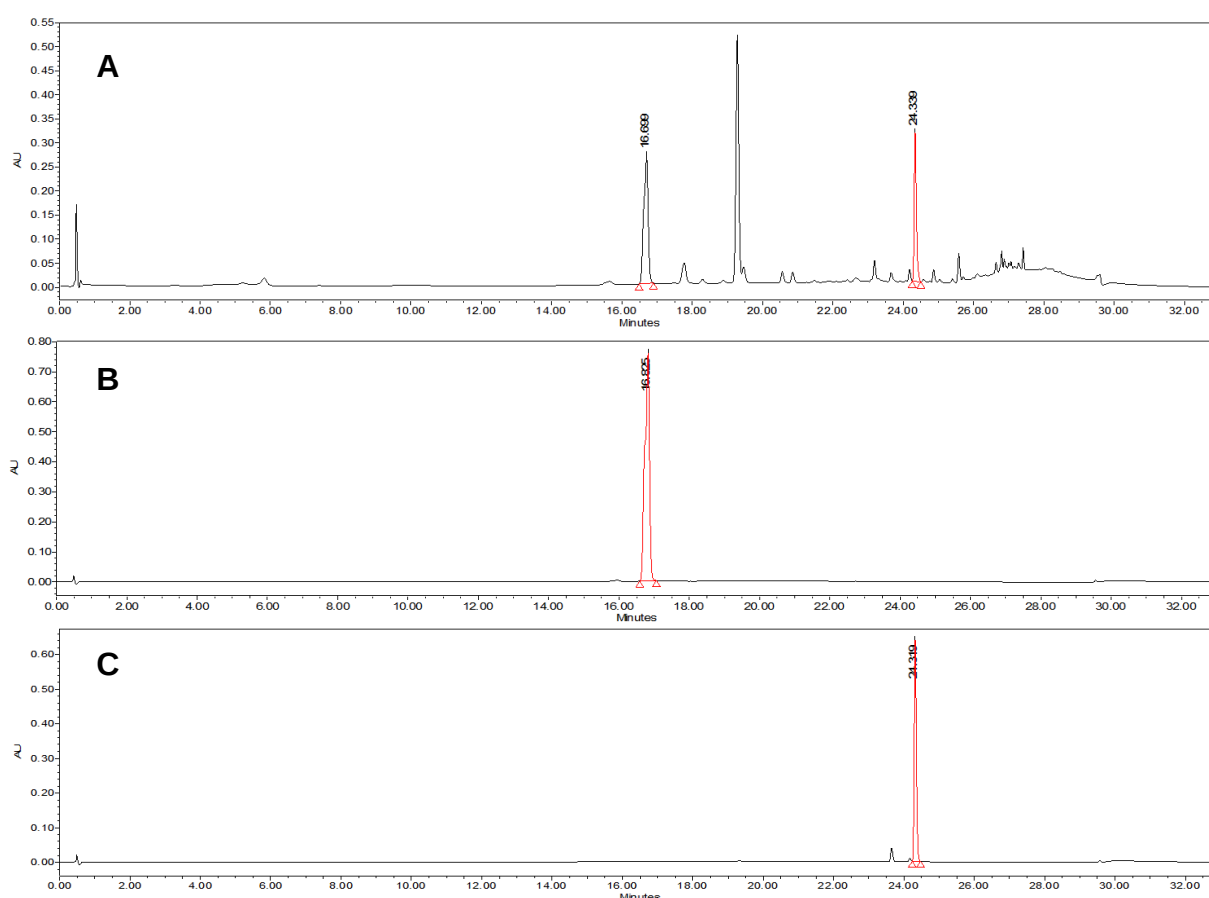


Figura 21: (A) cromatograma da solução de EEVc 1000 $\mu\text{g/mL}$, (B) dihidroxipentametoxiflavona 100 $\mu\text{g/mL}$ e (C) cordialina A 100 $\mu\text{g/mL}$ obtidos com a fase móvel: (A) água acidificada com 2% de ácido acético e (B) metanol. O método gradiente seguiu 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,300 mL/min e volume de injeção de 5,0 μL , forno de coluna em 50°C. E como fase estacionária coluna C18 (Waters® Acquity UPLC BEH 50 x 2,1 mm; 1,7 μm) em cromatógrafo UPLC Waters® Acquity H Class PLUS com detector em 254 nm.

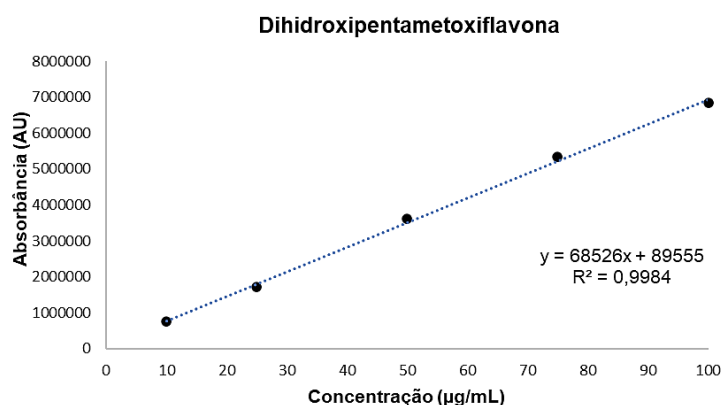


Figura 22: Curva analítica do padrão de dihidroxipentametoxiflavona nas concentrações de 10 a 100 µg/mL.

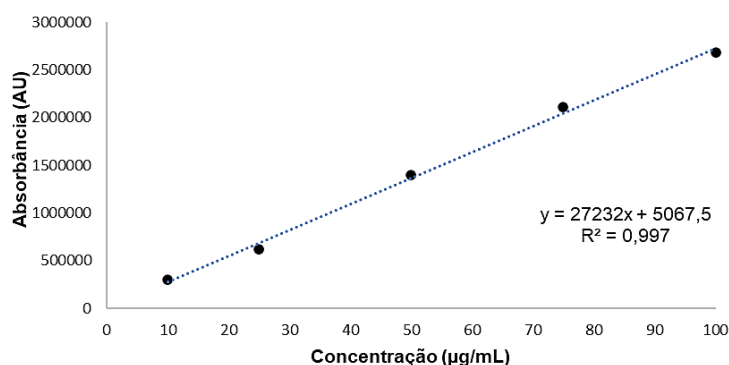


Figura 23: Curva analítica do padrão de cordialina A nas concentrações de 10 a 100 µg/mL.

O cromatograma do EEVc (Figura 21A) apresentou três picos no tempo de retenção (R_t) de, aproximadamente, $R_t = 16,7$; $19,4$ e $24,3$ minutos. Comparado com os R_t dos padrões, no mesmo método cromatográfico, foi possível identificar os picos relacionados a cada um, sendo, $R_t = 16,7$ e $R_t = 24,3$ minutos referentes a dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A, respectivamente. Assim, a equação da reta para a dihidroxipentametoxiflavona foi $y = 68526x + 89555$ (Figura 22) e para cordialina A, igual a $y = 27232x + 5067,5$ (Figura 23) e o coeficiente de determinação de r^2 de 0,9984 (coef. de correlação de $r = 0,9991$) e 0,997 (coef. de correlação de $r = 0,9984$), respectivamente. Desta forma, as áreas dos picos de interesse no cromatograma de EEVc levaram a quantificação de 3,20% e 4,89% (m/m) de dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A, respectivamente, no EEVc.

5.2 Atividade antiglicação do EEVc, dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A

5.2.1 Determinação de AGE fluorescentes em sistema-modelo *in vitro* com metilglioxal

Os efeitos prejudiciais causados pela presença de AGE no organismo, afetam principalmente as proteínas de vida longa (hemoglobina, colágeno, elastina e outros), contudo, sua ação sobre proteínas de vida curta, como a albumina plasmática, se faz relevante, já que as alterações comprometem sua integridade estrutural e funcional (VETTER; INDURTHI, 2011).

A albumina constitui cerca de 50% das proteínas presentes no plasma de indivíduos saudáveis e é veículo para substâncias como colesterol, ácidos graxos, óxido nítrico, fármacos e outros (EVANS, 2002; ROSENOER; ORATZ; ROTHSCILD, 2014). Desta maneira, sistemas-modelo *in vitro* de glicação proteica incubada com açúcares têm sido utilizados para investigar as consequências deletérias da glicação proteica com metilglioxal (MGO) (ARASTEH et al., 2014). Em termos práticos, a albumina sérica bovina (BSA) tem sido uma escolha viável por apresentar homologia com a albumina sérica humana (aproximadamente 76%). Os dados foram monitorados através da intensidade de fluorescências em consequência à formação dos AGE, ao longo dos dias 0, 1, 2, 4, e 8. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM. Análise de Variância (ANOVA) One-Way seguido por teste de Newman-Keuls, diferenças consideradas estatisticamente significativas se $p < 0,05$.

As intensidades de fluorescência relativa à formação de AGE tiveram aumento progressivo nas incubações de BSA + MGO quando comparadas com BSA sozinha. Consequentemente, BSA + MGO + AG diminuiu a formação de AGE, mostrando a resposta deste modelo *in vitro* de glicação proteica às intervenções para inibir os danos proteicos devidos à glicação (Figura 24). Também é possível notar que nenhuma das amostras testadas (EEVc, dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A) + BSA promoveram agressão a BSA tanto quanto o MGO (APÊNDICE II - V). Os gráficos de absorção (APÊNDICE VI - XVI), demonstram que as amostras EEVc e cordialina A em tampão sem BSA tiveram absorção igual BSA + MGO nos dias 0 e 1 o que pode estar associado a algum tipo de interação com o tampão ou o

cossolvente, porém nos demais dias, a absorção de BSA + MGO foi mais expressiva, superando qualquer amostra e concentração.

Na incubação das amostras com o BSA + MGO, todas as amostras testadas minimizaram a geração de AGE. Na figura 24A, o EEVc inibiu a formação de AGE até o último dia de experimento. A maior concentração de EEVc (250 µg/mL) foi a mais eficiente na proteção da BSA, destacando que no dia 2 não houve diferença significativa entre o EEVc 250 µg/mL e AG (1mM). Entre as concentrações de EEVc 125 e 62,5 µg/mL, também não houve diferença significativa nos dias 2 e 8.

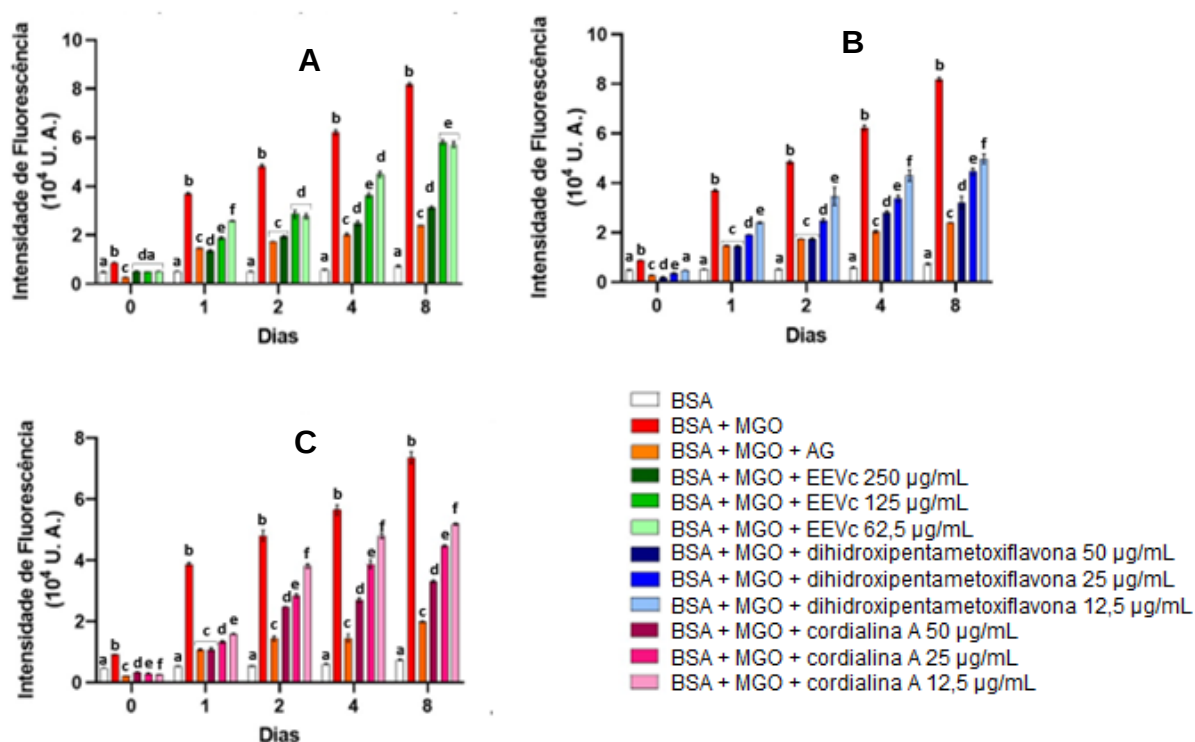


Figura 24: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A), dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de AGEs fluorescentes em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* com BSA + MGO. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de *V. curassavica*.

A amostra dihidroxipentametoxiflavona (Figura 24B), demonstrou o mesmo comportamento que o padrão AG até 48h após a incubação. Nos dias posteriores, foram verificados valores de fluorescência maiores que do padrão, com comportamento concentração-dependente. Já no caso da amostra cordialina A (Figura 24C), não houve diferença com a AG apenas no dia 1, sendo os demais também resposta concentração-dependente.

Na literatura é conhecido que as plantas medicinais e os polifenóis possuem atividade antiglicação e atuam em alvos diversos que culminam na depleção de AGE no organismo (CHINCHANSURE et al., 2015; YEH et al., 2017; TORRES et al., 2018). Plantas pertencentes a mesma família que a espécie *V. curassavica*, Boraginaceae, mostraram atividade antiglicação, sendo a *Cordia platythyrsa* Baker (ATCHADE et al., 2012) e a *Cordia sinensis* Lam. (AL-MUSAYEIB et al., 2011).

Chinchansure e colaboradores (2015) consideram que as plantas ricas em compostos fenólicos, como flavonoides e triterpenos são vantajosas, uma vez que, essas classes de compostos podem exibir ação antioxidante e antiglicação, o que resultaria num sinergismo frente a formação e acúmulo de AGE, bem como na redução do estresse oxidativo. Em *V. curassavica* foram identificados compostos como, ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido gálico e ácido clorogênico; as isoflavonas 7,4'-dihidroxi-5'-carboximetóxi-isoflavona e 7,4'-dihidroxi-5'-metil-isoflavona; flavonas polimetoxiladas como a artemetina e a 5,6'-dihidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona; e os triterpenos cordialina A, (Z)-cordialina e cordialina B, (VELDE et al., 1982; LINS et al., 1990; BAYEUX et al., 2002; TICLI et al., 2005; AMEIRA et al., 2009; MATIAS et al., 2013a; 2013b; ROMÃO, 2016; OZA; KULKARNI, 2017; PEREIRA, 2017). Roldão (2008), conduziu ensaios *in vitro* com o extrato etanólico de *V. curassavica* que inibiu de forma concentração-dependente a peroxidação lipídica induzida nas membranas hepáticas de ratos. A CE_{50} foi de $76,11 \pm 3,76 \mu\text{g/mL}$, e a quercetina, utilizada como padrão, foi de $4,58 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$. Enquanto que outro extrato etanólico de *V. curassavica*, analisado por Santi e colaboradores (2014) apresentou uma CE_{50} foi de $316,7 \pm 23,16 \mu\text{g/mL}$ no ensaio com DPPH e quercetina como controle ($CE_{50} = 2,33 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$). O teor de fenóis totais foi de $79,48 \pm 0,63 \text{ mgEAG.g}^{-1}$ (expresso em equivalentes de ácido gálico (mg) por grama de extrato) (SANTI et al., 2014). Pereira (2017) já relatou a variação do rendimento da obtenção do EEVc em relação a droga vegetal (DV), sendo o maior rendimento conferente aos meses de maio ($\sim 70 \text{ mg/g}$ de DV) e menor para os meses de janeiro ($\sim 40 \text{ mg/g}$ de DV).

Rohn (2014) mostra que os polifenóis podem interagir com várias proteínas, incluindo BSA, através de interações covalentes ou não, e dentre os resíduos suscetíveis à interação com polifenóis estão, principalmente, cadeias nucleofílicas de lisina e cisteína, sendo frequentemente associados à glicação de proteínas

(POULSEN et al., 2013). Dentre os polifenóis, a classe que comumente aparece nos estudos são os flavonoides, o que pode ser justificado dada sua distribuição abrangente nos vegetais e às atividades biológicas como, antioxidante e anti-inflamatória (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016; MATSUDA et al., 2003; GONZÁLEZ; MORALES; ROJAS, 2020). Santi e colaboradores (2014) verificaram que o total de flavonoides no EEVc foi de $65,03 \pm 4,59 \text{ mgEQ.g}^{-1}$ (expresso em equivalentes de quercetina (mg) por grama de extrato). O estudo de variabilidade sazonal conduzido por Pereira (2017), mostra que março é o mês em que o teor de dihidroxipentametoxiflavona é maior que no restante do ano, chegando a 3,5% no EEVc e o horário de coleta com maior rendimento corresponde às 16 horas e 30 minutos, e a quantificação encontrada no EEVc foi de 3,2% (m/m). A dihidroxipentametoxiflavona na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ inibiu a formação de AGE até 48h após o início do experimento, sem diferença significativa com o padrão AG (1 mM), e manteve atividade nos dias seguintes, junto com as demais concentrações que procederam de forma dependente à concentração.

Xie e Chen (2013) propuseram a relação estrutura-atividade (REA) antiglicação para flavonoides. A presença de grupos hidroxilas no anel A e B melhoram a inibição de AGE diferente do que se ocorresse no anel C. Como exemplo, a luteolina é mais eficiente que a quercetina, com concentrações inibitórias de 99M e 151M, respectivamente (MATSUDA et al., 2003). A atividade diminui com a metilação ou glicosilação dos grupamentos hidroxilas. Matsuda e colaboradores (2003) acrescentaram que a subclasse das flavonas apresenta atividade maior do que flavonois, flavanonas e isoflavonas (Figura 25).

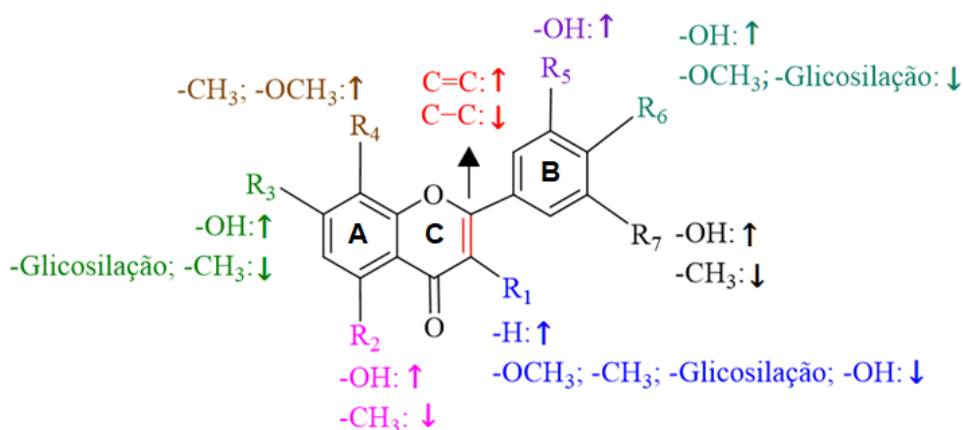


Figura 25: Proposta da relação estrutura-atividade antiglicação para flavonoides. FONTE: Adaptado de Xie e Chen (2013) e Matsuda e colaboradores (2003).

Os triterpenos podem inibir a interação de açúcares redutores com proteínas e conseqüentemente a formação de AGE e diminuir o estresse oxidativo (YIN, 2012). Alguns exemplos conhecidos na literatura são: os triterpenos do tipo astragalosídeos que inibem a formação de carboximetilisina (MOTOMURA et al., 2009), o ácido ursólico e o eritrodiol que possuem ação antioxidante e anti-inflamatório, acredita-se que estes modulem a glicação minimizando o estresse oxidativo e inflamatório (LIU Y.; HARTLEY; LIU J., 1998; YAMAGUCHI et al., 2006; FRANDSEN; NARAYANASAMY, 2017).

A cordialina A, inibiu a formação de AGE com resposta concentração-dependente. Como citado anteriormente, a *V. curassavica* possui os triterpenos cordialina A, (Z)-cordialina A e cordialina B (VELDE et al., 1982; PEREIRA, 2017). O estudo de variabilidade sazonal conduzido por Pereira (2017), mostra que janeiro é o mês em que o teor de cordialina A é maior que no restante do ano, chegando a 4,5% no EEVc e o horário de coleta com maior rendimento corresponde às 10 horas e 30 minutos e a quantificação encontrada no EEVc foi de 4,89% (m/m). De acordo com os dados descritos na literatura, acredita-se que a eficiência dos triterpenos sobre os AGE no organismo ocorra de maneira mais ampla, podendo estar relacionado na interação das macromoléculas envolvidas no processo de glicação (YIN, 2012). Por exemplo, há triterpenos que atuam modulando a atividade e/ou expressão de algumas enzimas como é o caso do ácido oleanólico e ursólico sobre a aldose redutase, sorbitol desidrogenase, resultando na redução da formação de AGE, e na glioxalase I, facilitando a metabolização dos AGE e, assim, diminuindo seu acúmulo na circulação e nos tecidos (WANG et al., 1998; JANG et al., 2010).

Outra maneira indireta que os triterpenos podem contribuir para a redução de AGE é devido a capacidade de sequestrar radicais livres, somando com as substâncias antioxidantes não enzimáticas como, a glutatona reduzida, ácido ascórbico e o α -tocoferol na defesa do organismo (YAMAGUCHI et al., 2006). Os triterpenoides lupeol e linoleato de lupeol aumentaram a atividade das enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e glutatona S-transferase (SUDHAHAR; KUMAR; VARALAKSHMI, 2006).

De modo geral, tanto o EEVc quanto as substâncias isoladas, dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A, em todas as concentrações testadas promoveram proteção a BSA, inibindo a formação de AGE até o último dia de análise, dia 8 (Figura 26). A AG utilizada como padrão na incubação inibiu 70,7% dos AGE. Sabe-se que a AG reage com compostos dicarbonílicos, como o metilglioxal, formando triazinas (THORNALLEY, 2003; TORRES et al., 2018). Não houve diferença estatística significativa entre EEVc 250 µg/mL e dihidroxipentametoxiflavona 50 µg/mL, ambos reduziram a formação de AGE em 61,7% e 60,8%, respectivamente. A cordialina A na concentração de 50 µg/mL também foi capaz de inibir mais da metade a formação de AGE, sendo igual a 54,9%. As concentrações de 25 µg/mL para dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A, tiveram desempenho igual, sendo 44,3% e 45,4%, respectivamente. O mesmo ocorreu com EEVc 125 µg/mL, dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A 12,5 µg/mL, que minimizaram a formação de AGE em 34,4%, 37,6% e 35,3%, respectivamente.

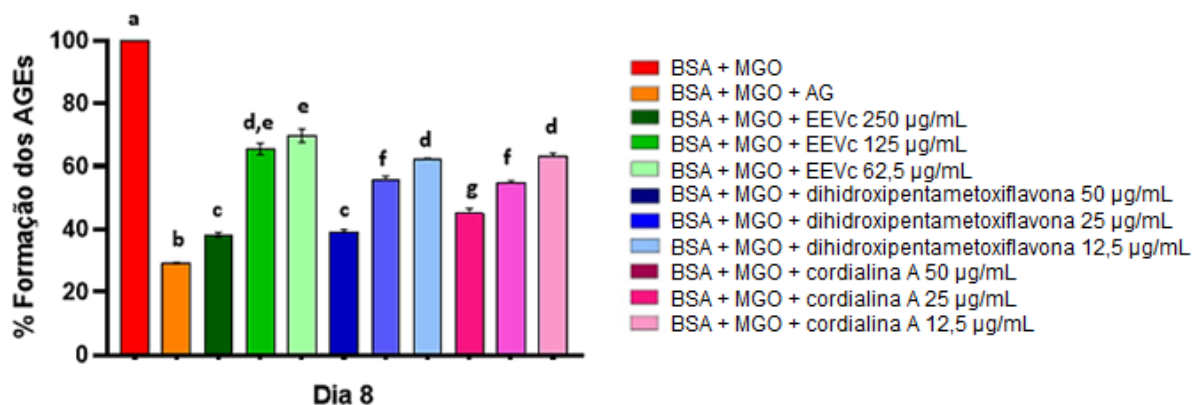


Figura 26: Percentual da formação de AGEs em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* com BSA + MGO no dia 8. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de *V. curassavica*.

5.2.2 Determinação da formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos

A glicação proteica é frequentemente acompanhada de danos oxidativos (SADOWSKA-BARTOSZ; GALINIAK; BARTOSZ, 2014; LENNICKE et al., 2016). As intensidades de fluorescência da ditirosina, *N'*-formilquinurenina e quinurenina foram

monitoradas como marcadores de alterações oxidativas da incubação de BSA + MGO na presença de EEVc, dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A.

As intensidades de fluorescência relativa à formação de resíduos de aminoácidos tiveram aumento progressivo nas incubações de BSA + MGO quando comparadas com BSA sozinha. BSA + MGO + AG diminuiu a sua formação, mostrando a resposta deste modelo *in vitro* de glicação proteica às intervenções para inibir os danos proteicos devidos à glicação (Figura 27). Também é possível notar que nenhuma das amostras testadas (EEVc, dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A) + BSA promoveu agressão tanto quanto BSA + MGO (APÊNDICE IV - VI).

Na figura 27, a formação de resíduos de ditirosina causado pela interação BSA + MGO foi crescente e progressiva ao longo dos dias do experimento, sendo maior que todas as amostras, exceto para cordialina A, em que nos dias 4 e 8 não houve diferença estatisticamente significativa entre BSA + MGO e cordialina A 12,5 µg/mL.

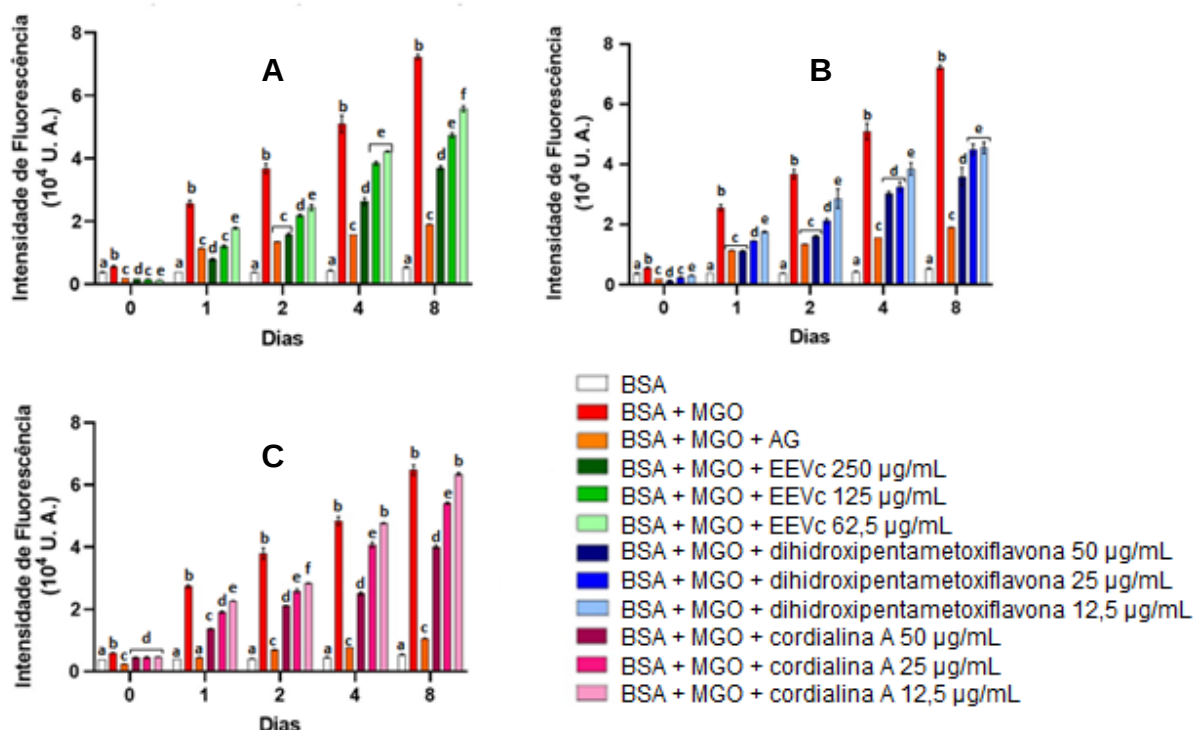


Figura 27: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A), dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de ditirosina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* com BSA + MGO. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de *Varronia curassavica*.

Ainda nesta figura 27A a incubação de EEVc protegeu a BSA frente a formação do resíduo de ditirosina em todas as concentrações, sendo que no dia 2 EEVc 250 µg/mL e AG foram estatisticamente iguais, assim como EEVc 125 e 62,5 µg/mL no dia 4. Na figura 27B, a incubação com dihidroxipentametoxiflavona também foi eficiente na redução da formação dos resíduos de ditirosina, até o dia 2, dihidroxipentametoxiflavona na concentração de 50 µg/mL foi igual a atividade exercida por AG, já no dia 8, as concentrações menores, dihidroxipentametoxiflavona 25 µg/mL e 12,5 µg/mL tiveram o mesmo desempenho. A incubação com cordialina A (Figura 27C), atenuou a formação de ditirosina com resposta concentração-dependente, contudo no dia 4 e 8 não houve diferença com BSA + MGO como mencionado anteriormente.

O mecanismo de formação da ditirosina em proteínas foi revisado e detalhado por Guilivi e colaboradores (2003), resumidamente, começa com a formação de um radical tirosil, e culmina na sua dimerização com outro radical tirosil. Para que essa reação possa ocorrer, é necessário um ambiente altamente oxidante e a presença de radicais, como radical hidroxil, por exemplo (DAVIES et al., 1987). Desta maneira, uma atividade antioxidante associada parece favorecer a inibição desses resíduos. A amostra cordialina A 12,5 µg/mL nos dias 4 e 8 não foi capaz de impedir a formação dos resíduos de ditirosina, ao passo que não houve diferença comparada com o BSA + MGO, diferente das demais amostras e concentrações até o dia 8.

Os resíduos de ditirosina podem ser encontrados em diversas proteínas como um produto de degradação proteica, sendo que agentes endógenos e exógenos como a radiação ultravioleta, exposição à radicais livres, hidroperóxidos lipídicos e o envelhecimento podem levar a formação de ditirosina (GIULIVI; TRAASETH; DAVIES, 2003). A ditirosina tem sido usada como marcador específico para a oxidação de proteínas e assim, consequentemente mensurar o estresse oxidativo. Também como marcador de proteólise seletiva, pois sua presença no organismo ocorre somente após um estresse oxidativo, como a exposição a H₂O₂, e subsequente proteólise (GIULIVI; DAVIES, 2001). Heinecke (2002) demonstrou que as concentrações de ditirosina foram 100 vezes mais altas em lipoproteínas de baixa densidade isoladas de lesões ateroscleróticas do que as encontradas pacientes saudáveis. Também estão presentes nos processos inflamatórios e infecciosos (GIULIVI; TRAASETH; DAVIES, 2003).

A formação de resíduos de *N'*-formilquinurenina, também foi expressiva e crescente de BSA + MGO, sendo superior a todas as demais amostras e concentrações (Figura 28). Na figura 28A a incubação com EEVc demonstrou resposta concentração-dependente em todas as concentrações e dias de

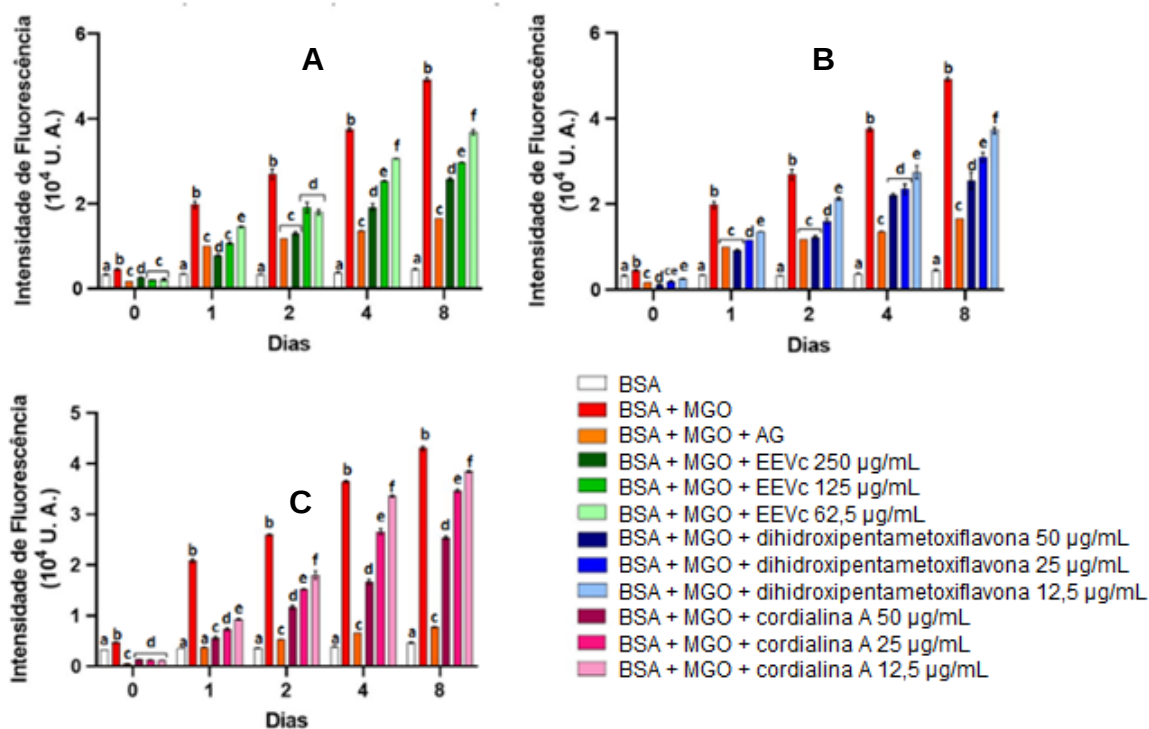


Figura 28: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A), dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de *N'*-formilquinurenina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* com BSA + MGO. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de *V. curassavica*.

experimento, exceto para o dia 2 em que a concentração EEVc 250 µg/mL e AG foram estatisticamente iguais, assim como EEVc 125 e 62,5 µg/mL no mesmo dia. Na figura 28B, até o dia 2, dihidroxipentametoxiflavona 50 µg/mL e AG protegeram a BSA da mesma maneira, terminando o dia 8 com resposta concentração-dependente.

No organismo a *N'*-formilquinurenina e a quinurenina são formadas a partir da oxidação do triptofano, processo este que depende da presença de espécies reativas de oxigênio e enzimas como 2,3-dioxigenase e indoleamina-2,3-dioxigenase (BASRAN et al., 2011). Assim, de modo geral, tanto o EEVc e o dihidroxipentametoxiflavona, na maior concentração, nas primeiras 48h de incubação impediram a formação de *N'*-formilquinurenina, o que pode estar

associado ao sinergismo com a atividade antioxidante do EEVc (ROMÃO, 2008) e a fração enriquecida com compostos flavonoídicos de *V. curassavica* (SERTIÉ, 1989; 1990). Segundo Chertyrkin e colaboradores (2008), a degradação oxidativa ou do intermediário proteína-produtos de Amadori causam modificação dos resíduos de triptofano da albumina por oxidação via radical hidroxila, afetando sua função em condições fisiologicamente relevantes (MANZANARES et al., 2007).

Semelhante a formação de resíduos dos aminoácidos anteriores, BSA + MGO se mostrou crescente e progressivo, superior a todas as concentrações em todos os dias de experimento (Figura 29). Na figura 29A, a incubação com EEVc e 28C com cordialina A, o comportamento ocorreu resposta concentração-dependente. Já na figura 29B no dia 8, o dihidroxipentametoxiflavona na concentração de 50 µg/mL

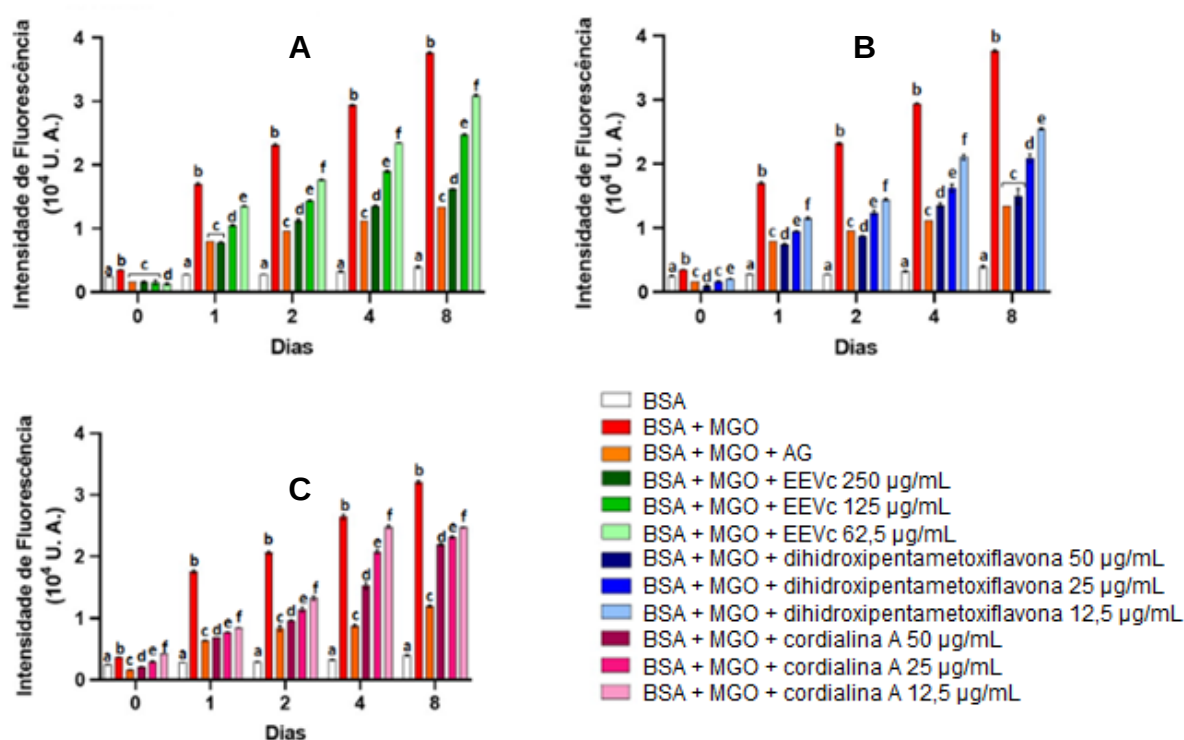


Figura 29: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A), dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de quinurenina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* com BSA + MGO. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de *V. curassavica*.

inibiu a formação de resíduos de quinurenina assim como a AG.

Do ponto de vista clínico, o catabolismo do triptofano é relevante devido aos metabólitos que são gerados, como o ácido 3-hidroxiantranílico, ácido antranílico e o

ácido quinólico. Esses metabólitos estão associados a várias doenças e distúrbios neurológicos, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose amiotrófica lateral (TAYLOR et al., 2007; IRVINE et al., 2008), aterosclerose (GIEBAUF et al., 1996), bem como a formação de catarata e a supressão da proliferação de células imunológicas, como as células T (RÖHRIG et al., 2010).

Uma revisão feita por Chen e Guillemin (2009), reforça como que o desequilíbrio nas concentrações de triptofano e quinurenina estão associados a doenças neurodegenerativas, até o momento sabe-se que as quinureninas, como ácido quinolínico, 3-hidroxiquinurenina e ácido quinurênico, são neuroativas. Um dos apontamentos feitos pelos autores é que a quinurenina e seus derivados são superestimados quando a resposta imunológica é ativada, fazendo com que a depleção de triptofano e aumento de quinurenina tenha papel modulador frente a resposta imune.

5.2.3 Quantificação de proteínas carboniladas

A glicação proteica e o processo de formação dos AGE tem como resultado a geração de intermediários altamente reativos, como os compostos dicarbonílicos e espécies reativas de oxigênio (ERO) (DEAN et al., 1997). A prevalência das ERO no organismo e a consequente ineficiência da atuação dos mecanismos antioxidantes endógenos configuram o estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTRIDGE, 2015). O acúmulo de ERO sob condições de estresse oxidativo induz as reações de peroxidação lipídica e glicoxidação, o que faz com que a via de formação de AGE e ERO sejam retroalimentadas, intensificando os danos oxidativos ao organismo (BERLETT; STADTMAN, 1997; MOLDOGAZIEVA et al., 2019).

Dentre os diversos alvos biológicos suscetíveis aos danos oxidativos, as proteínas carboniladas tem sido utilizada como biomarcadores do estresse oxidativo (DEAN et al., 1997; DALLE-DONNE et al., 2003). Pesquisas tem mostrado que doenças inflamatórias de caráter crônico e doenças neurodegenerativas possuem em comum o aumento das proteínas carboniladas (PCO) (RABBANI; THORNALLEY, 2018; SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020). Os produtos formados na carbonilação proteica são quimicamente estáveis o que favorece seu acúmulo e detecção no organismo.

A metodologia mais empregada na detecção dos grupos carbonilas proteicos tem como princípio a derivatização da carbonila com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) que resulta na formação do produto estável de dinitrofenilhidrazona (DNP)

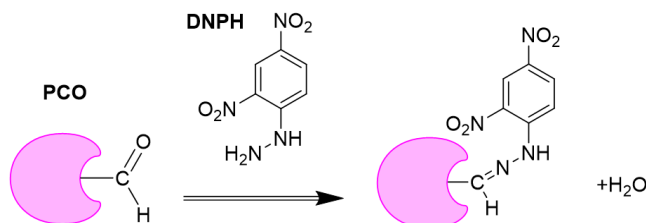


Figura 30: Esquema da reação entre a proteína carbolinada (PCO) e a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). FONTE: Adaptado de Levine et al. (1994). (Figura 30). Os meios de detecção podem ser por ensaios espectrofotométricos, imunoensaio enzimáticos e eletroforese uni- ou bidimensional seguida de imunoensaio Western Blot (SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010; HALLIWELL; GUTTRIDGE, 2015). Desta maneira a quantificação de PCO seguiu conforme descrito no item 4.3.3.

Os níveis de PCO no último dia de análise, dia 8, foram avaliados em reação com DNPH, formando a dinitrofenilhidrazona derivada, monitorada à 370 nm (LEVINE et al., 1994). De acordo com a figura 31, é possível notar que os controles BSA incubada sozinha, BSA + AG (1 mM), aparentemente, não ocorreu a formação de grupos carbonilas na proteína. Assim como a BSA na presença de EEVc e cordialina A nas maiores concentrações testadas, 250 µg/mL e 50 µg/mL, e dihidroxipentametoxiflavona em todas as concentrações, de 12,5, 25 e 50 µg/mL.

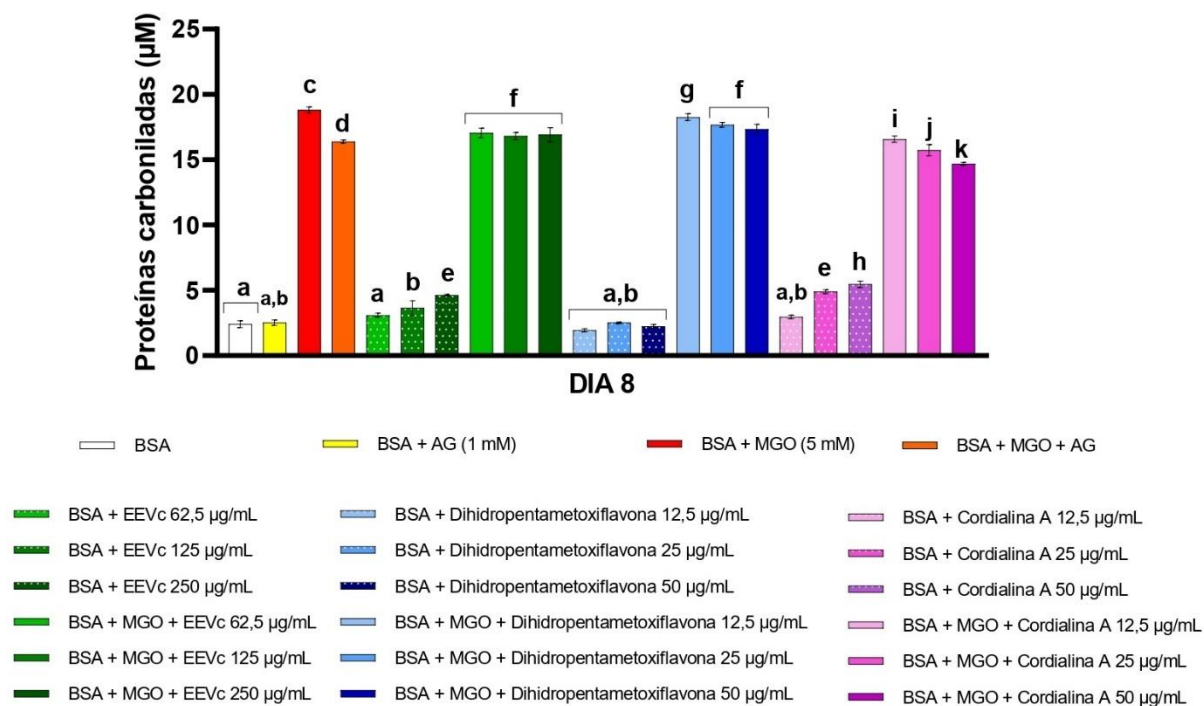


Figura 31: Quantificação de proteínas carboniladas obtido no dia 8 em sistema modelo *in vitro* de glicação de proteínas usando BSA e MGO. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de *V. curassavica*.

Entretanto, BSA incubada na presença de MGO (5 mM) obteve o máximo de formação de PCO, enquanto que a AG incubada com BSA + MGO, teve uma atividade na inibição de carbonilação proteica. Colzani e colaboradores (2016), compararam diferentes agentes sequestrantes de espécies carbonílicas reativas como a AG, hidralazina, piridoxamina e carnosina frente a 4-hidroxi-*trans*-2-nonenal, MGO, glioxal e malondialdeído. Este estudo concluiu que a atividade dos compostos testados foi dependente das espécies carbonílicas reativas utilizadas, de forma que a AG foi mais eficiente para MGO e glioxal, contudo, a AG não é empregada na terapêutica (THORNALLEY, 2003).

Dentre as amostras investigadas, o EEVc e a dihidropentametoxiflavona em todas as concentrações testadas não inibiram a formação de PCO tanto quanto a AG no dia 8 de análise. Entretanto, dentre as amostras, a cordialina A teve o melhor desempenho, sendo que a inibição da formação de PCO foi resposta concentração-dependente, em que cordialina 25 e 50 µg/mL mais efetiva que AG.

Os grupos carbonílicos, sejam aldeídos ou cetonas, são gerados nas cadeias laterais dos aminoácidos quando estes são oxidados, principalmente nos

aminoácidos: prolina, arginina, lisina e treonina (Figura 32). Também podem ser inseridos pela reação secundária das cadeias laterais nucleofílicas de cisteína, histidina e lisina com aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica ou derivados carbonílicos reativos formados a partir das reações de glicação e glicosidação (BERLETT; STADTMAN, 1997; DEAN et al., 1997; HALLIWELL; GUTTRIDGE, 2015).

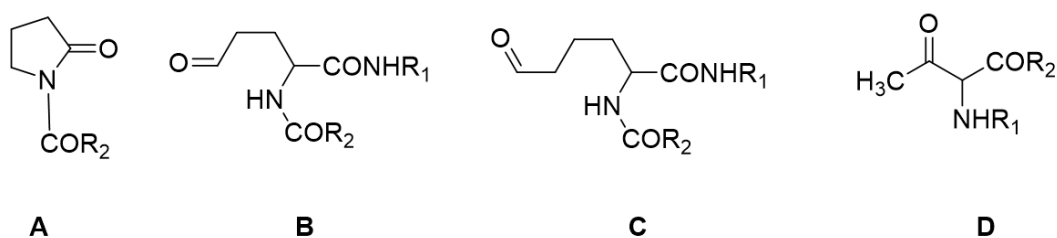


Figura 32: A estrutura dos derivados carbonílicos produzidos pela oxidação direta de cadeias laterais de aminoácidos: (A) 2-pirrolidona de resíduo de prolil; (B) semialdeído glutâmico de resíduo de arginil e prolil; (C) semialdeído α-aminoadípico de resíduo de lisil. E (D) ácido 2-amino-3-cetobutírico de resíduo de treonil.

As proteínas moderadamente carboniladas ainda podem ser degradadas por três principais vias: pelo sistema proteassomal, lisossomal e o autofágico (KÖNIG; JUNG; GRUNE, 2017). No entanto, aquelas fortemente carboniladas tendem a formar agregados de elevado peso molecular e resistentes a degradação, o que favorece seu acúmulo no organismo (DALLE-DONNE, 2006), condição esta que é dependente do avanço da idade (KÖNIG; JUNG; GRUNE, 2017).

O EEVc possui compostos de origem fenólica como já citado anteriormente (SERTIÉ et al., 1990; 1991; ROLDÃO et al., 2008; PEREIRA, 2017), contudo, algumas hipóteses podem explicar a sua ineficiência frente a formação de PCO. Primeiramente, sabe-se que os compostos dicarbonílicos, como o MGO, interagem com proteínas podem formar intermediários carbonílicos reativos e ERO que aumentam a agressão à proteína (BERLETT; STADTMAN, 1997; MOLDOGAZIEVA et al., 2019).

Assim, como o estresse oxidativo está correlacionado com o aumento de ERO no organismo, a avaliação da capacidade antioxidante do EEVc se faz relevante. Moro (2022) e Romão (2016) desenvolveram seus trabalhos neste mesmo grupo de pesquisa com o EEVc e dentre seus resultados analisaram a atividade

antioxidante do EEVc frente ao DPPH e encontraram CE_{50} igual a 41,5 e 35,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, enquanto o controle positivo, quercetina, foi 2,7 $\mu\text{g/mL}$ em cada um, aproximadamente. O EEVc apresentou 4,7% de compostos fenólicos expressos em equivalentes de ácido gálico (MORO, 2022), valor menor do que o encontrado por Santi e colaboradores (2014) que encontraram 7,94% de compostos fenólicos expressos em equivalentes de ácido gálico em seu extrato etanólico de *V. curassavica* (expresso em equivalentes de ácido gálico). Pereira (2017) já havia relatado a variabilidade sazonal no rendimento da obtenção de EEVc, sendo maior no mês de maio e menor no mês de janeiro. A dihidroxipentametoxiflavona obteve valores de CE_{50} bem próximos do EEVc analisado por Moro (2022), correspondendo a 40,5 $\mu\text{g/mL}$ frente ao radial DPPH.

Apesar do radical DPPH ser amplamente utilizado para determinar a capacidade antioxidante de uma substância química, o uso de ERO endógenas se faz relevante, por conferir maior proximidade com o esperado no organismo. A atividade antioxidante quando comparada ao ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), a dihidroxipentametoxiflavona tem CE_{50} de 291,0 $\mu\text{g/mL}$ e o EEVc o CE_{50} foi >1000 $\mu\text{g/mL}$ (MICHIELIN et al., 2011; MORO, 2022). O $\text{O}_2^{\cdot-}$ é um agente oxidante produzido no organismo, fazendo parte de importantes processos fisiológicos como, respiração e sinalização celular e que quando em excesso tende a interagir com outras moléculas como, proteínas, e desencadeia a formação de outras ERO (MOLDOGAZIEVA et al., 2019). O baixo desempenho do EEVc e da dihidroxipentametoxiflavona frente a formação de PCO quanto na inibição de $\text{O}_2^{\cdot-}$ sugerem que estes são mais eficazes na estabilização direta de compostos dicarbonílicos, como o MGO usado na incubação, que nos danos oxidativos gerados em decorrência da exposição da BSA ao MGO.

O desempenho da cordialina A foi diferente das demais amostras, ao passo que, quanto maior a concentração, menor foi a quantidade de PCO, isso corrobora com os achados referentes à formação de AGE e a formação dos resíduos de aminoácidos (ditirosina, quinurenina e *N'*-formilquinurenina). A atividade antioxidante também foi testada por Moro (2022) e a CE_{50} para DPPH e $\text{O}_2^{\cdot-}$ não foram atingidos até a maior concentração testada, de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 350 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Como já abordado na revisão, dados na literatura mostram que a eficiência dos triterpenos sobre os AGE no organismo ocorre de maneira mais ampla, podendo

estar: (a) relacionado na interação com as macromoléculas envolvidas no processo de glicação (SUDHAHAR; KUMAR; VARALAKSHMI, 2006; YIN, 2012) seja modulando a atividade e/ou expressão de enzimas, (b) facilitando a metabolização dos AGE (WANG et al., 1998; JANG et al., 2010) ou (c) pela capacidade de sequestrar radicais livres (YAMAGUCHI et al., 2006). Até o momento, os resultados sugerem que a cordialina A interage com a proteína, o que minimiza os danos causados pelo MGO, contudo essa hipótese ainda precisa ser melhor investigada.

5.2.4 Modificação da BSA via formação de ligações cruzadas

O processo de glicação de proteínas leva a uma série de alterações em sua estrutura, dentre elas, o *crosslinking* ou reticulação proteica. A reticulação proteica se forma a partir da interação de compostos dicarbonílicos com resíduos de aminoácidos presentes em proteínas e/ou rearranjos dos produtos de Amadori. Alguns estudos mostram que alguns resíduos de aminoácidos possuem maior suscetibilidade a essas ligações, como arginina e lisina (VISTOLI et al., 2013; EMEL'YANOV, 2017; LIU, et al., 2017).

A reticulação proteica é acelerada pela presença de radicais livres, sobretudo radicais hidroxil, onde a ação oxidativa pode levar à clivagem e a produção de fragmentos proteicos e sua consequente interação com proteínas íntegras. Isso faz com que sua estabilidade, atividade, propriedades físicas e químicas, estrutura e funções proteicas fiquem prejudicadas (SHAKLAI; GARLICK; BUNN, 1984; VISTOLI et al., 2013). No organismo saudável é possível encontrar de 1 a 10% de proteínas modificadas, enquanto que em indivíduos diabéticos, esse valor pode ser 2 ou 3 vezes maior, fazendo com que este se torne um importante marcador bioquímico (SHAKLAI; GARLICK; BUNN, 1984; BOURDON; LOREAU; BLACHE, 1999; LEE et al., 2011).

Dentre os métodos para determinação de proteínas glicadas, a eletroforese é uma das mais usuais, onde os dímeros de proteínas se tornam detectáveis (MORAIS et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2019; MOTTA et al., 2020). A formação de ligações cruzadas em proteínas foi analisada via eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Com posterior coloração em solução de *Coomassie blue*, sucessivas etapas de lavagens seguida por permanência de 48 horas em solução descorante.

A corrida eletroforética foi realizada com as amostras referentes ao dia 0 e no dia 8 da incubação de BSA na presença de MGO (Figura 33). As amostras avaliadas foram EEVc nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/mL; dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A ambas nas concentrações de 50, 25 e 12,5 µg/mL, tendo como controle a AG (1 mM). Como dito anteriormente, a formação de *crosslinking* acarreta danos estruturais nas proteínas e, assim com a eletroforese, é possível visualizar uma banda acima da correspondente à BSA (66 kDa). Com isso, a densidade gerada por essa nova banda, é diretamente relacionada ao dano oxidativo sofrido pela BSA (LIU; JING, 2016). Assim, foram realizados cálculos densitométricos, por meio do programa Image J® 1.53k nas bandas geradas na região do *crosslinking*, para melhor mensurar as diferenças dentre as amostras (APÊNDICE XVII).

Ainda na figura 33, estão apresentados os dados obtidos no dia 0 e no dia 8. No dia 0, é possível notar que, visualmente, nenhuma das amostras testadas promoveu interações com a BSA de maneira relevante que acarretasse na formação de reticulação imediata da proteína, além de evidenciar a integridade desta para prosseguimento do experimento. No dia 8, último dia de análise, foi perceptível a formação de reticulação proteica na BSA + MGO, processo que não ocorreu na BSA incubada sozinha e na presença de AG no mesmo dia de análise.

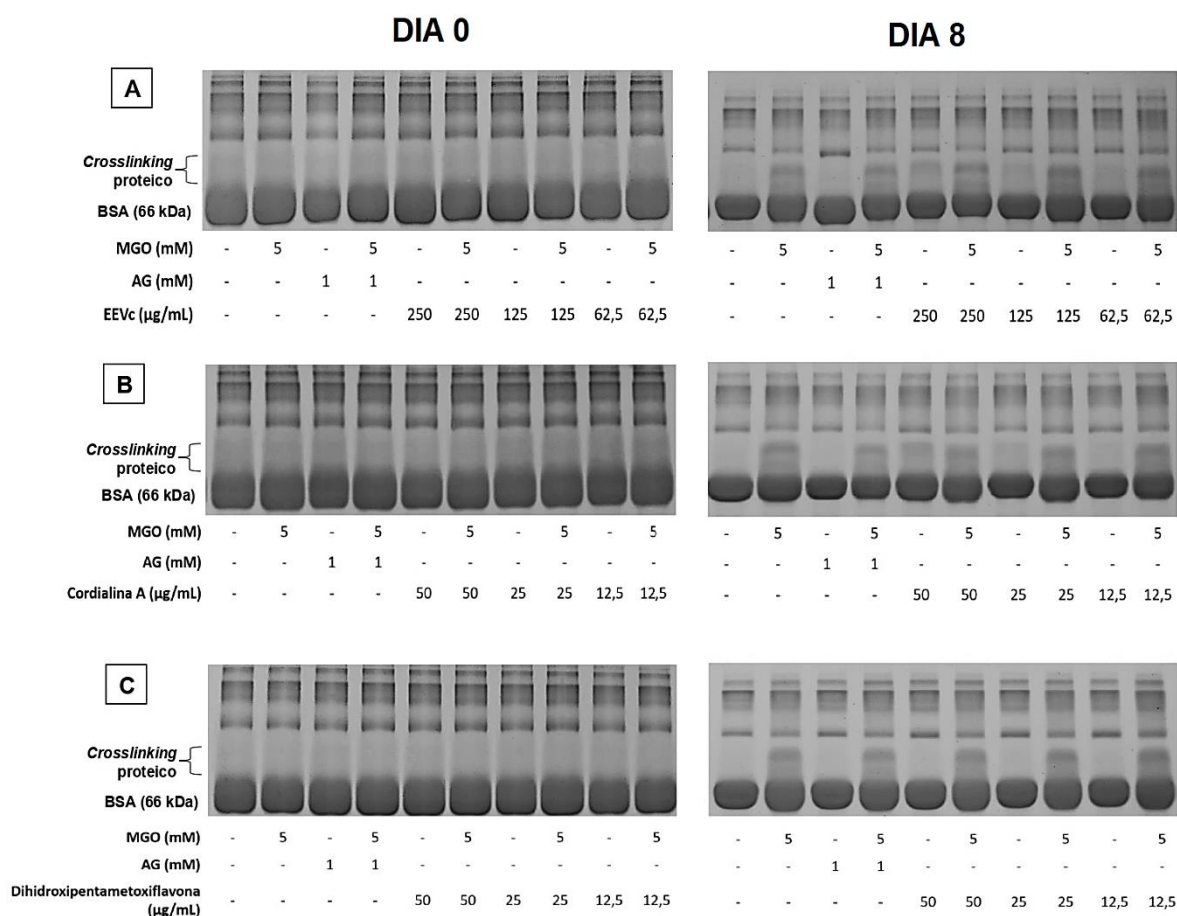


Figura 33: Efeitos de (A) EEVc, (B) cordialina A e (C) dihidroximetoxiflavona na formação de reticulação proteica (*crosslinking*) no dia 0 e dia 8 em sistema modelo *in vitro* de glicação de proteínas usando BSA e MGO. BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de *V. curassavica*.

A mesma intensidade densitométrica entre BSA + MGO e BSA + MGO + AG, sugere que AG não contribui para a reticulação proteica, de modo que quando incubada apenas com BSA, esse processo é ainda suprimido. O mesmo decorre na incubação com BSA + dihidroxipentametoxiflavona nas concentrações de 50 e 25 µg/mL, em que ambas não contribuíram para a formação de *crosslinking*, se igualando ao padrão AG. Vale destacar que o inverso aconteceu com a cordialina A, o triterpeno isolado de EEVc, mostrou formação de *crosslinking* com BSA diretamente proporcional à sua concentração, onde a concentração de cordialina A 50 µg/mL promoveu maior reticulação na BSA que a cordialina A 12,5 µg/mL, o que reforça a hipótese de que a cordialina A interaja com a BSA influenciando nos danos causados à exposição com MGO.

No que diz respeito a incubação das amostras com BSA + MGO, percebe-se que a inibição de reticulação proteica é concentração-dependente. De modo geral, o

melhor desempenho foi de dihidroxipentametoxiflavona onde, todas as concentrações testadas, geraram menor dano à BSA comparado com as respectivas concentrações (alta, média e baixa) das demais amostras. O EEVc também promoveu a formação de reticulação proteica, o que pode ser justificado por conter cordialina A e outras substâncias ainda desconhecidas em sua composição, contudo, ainda sim, teve desempenho satisfatório.

De acordo com Fu et al. (1992), a presença de um composto com ação antioxidante eficaz resulta na prevenção do acúmulo de AGE, bem como reduz o *crosslinking* proteico. Esses dados complementam os obtidos na determinação dos resíduos de aminoácidos, estudos mostram que a formação de ditirosina, tem contribuído na promoção de reticulação proteica (FOERDER; SHAPIRO, 1977; GIULIVI; DAVIES, 1994). Segundo Giulivi e Davies (2001), a produção de ditirosina resulta na formação de dímeros proteicos detectáveis pela SDS-PAGE.

A albumina desempenha papel importante na farmacocinética de metabólitos endógenos e medicamentos, neste último, pode influenciar significativamente sua ação farmacológica ou toxicidade (VASAN et al., 1996). Estudos tem mostrado como que a interação da albumina glicada com medicamentos impacta em sua farmacocinética, como por exemplo, os anti-inflamatórios (OKABE; HASHIZUME, 1994; GHUMAN et al., 2005; ROBERTS; PEA; LIPMAN, 2013; TRYNDA-LEMIESZ; WIGLUSZ, 2011; SZKUDLAREK et al., 2016). Assim, torna-se desejável que as substâncias com potencial antiglicação, não promovam a reticulação proteica, e sim, atuem inibindo ou minimizando esses danos oxidativos, de modo geral as amostras analisadas aqui mostraram potencial antiglicação podendo contribuir como uma alternativa terapêutica os malefícios dos danos oxidativos. De acordo com os dados apresentados, é notório o potencial antiglicação que *V. curassavica* e seus metabólitos secundários podem promover. Isso abre caminho para que outros desdobramentos possam ocorrer e expandir o arsenal terapêutico para muitas patologias que os AGE estão envolvidos. Agentes terapêuticos que possam intervir sobre a glicação proteica, seja por ação direta ou indireta sobre os AGE, enzimas envolvidas na via do poliol, atenuação ou inibição de receptores de AGE, são de grande interesse. Além de atuar efetivamente os danos oxidativos e/ou retardar a progressão patológica, podem contribuir para o entendimento e exploração de diferentes mecanismos de fisiológicos associados a diversas doenças.

CONCLUSÕES

O processo de isolamento/purificação proporcionou substâncias com alto grau de pureza, dihidroxipentametoxiflavona (98,7%) e cordialina A (95,8%) no EEVc, de forma eficiente e rápida, uma vez que não foi necessário a etapa de cromatografia em coluna e nem a utilização do solvente benzeno usado em metodologias anteriores, tópicos como este vão de encontro com os requisitos da química verde. A quantificação dessas substâncias foi de 32,09 e 48,97 µg/mL em 1000 µg/mL no EEVc. O extrato etanólico de folhas *Varronia curassavica* Jacq. (EEVc) e os dois compostos isolados de EEVc (dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A), se mostraram candidatos potenciais frente a inibição da formação de AGE. O EEVc 250 µg/mL, a dihidroxipentametoxiflavona 50 µg/mL e a cordialina A 50 µg/mL reduziram a formação de AGE em 61,7; 60,8; e 54,9%, respectivamente, no dia 8. Vale destacar que não houve diferença significativa entre a inibição promovida pela dihidroxipentametoxiflavona e pelo EEVc nas maiores concentrações (50 e 250 µg/mL), sendo a dihidroxipentametoxiflavona foi ativa em uma concentração 5 vezes menor que EEVc. Todas as amostras reduziram os prejuízos causados pelo dano oxidativo, que foram determinados pela formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos e pela formação de reticulação proteica. A quantificação de proteínas carboniladas mostrou que todas as amostras em todas as concentrações tiveram perfil semelhante ao padrão aminoguanidina, sendo a cordialina A 50 µg/mL a única amostra que superou o desempenho do padrão. A cordialina A promoveu *crosslinking* incubado com albumina, com resposta concentração-dependente, o que pode explicar a leve reticulação que o EEVc também promoveu.

REFERÊNCIAS

ABATE, G. et al. Advanced glycation end products (AGEs) in food: focusing on mediterranean pasta. **Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 5, n. 6, 2015.

Acheflan® Aerosol, 2016. Bula. Achè Laboratórios Farmacêuticos S.A. <<http://www.ache.com.br/arquivos/Acheflan-aerosol-03-10-2016.pdf>> (Acessado em: 18/09/2021).

Acheflan® Creme, 2016. Bula. Achè Laboratórios Farmacêuticos S.A. <<http://www.ache.com.br/arquivos/Acheflan-DC-creme-05-10-2016.pdf>> (Acessado em: 18/09/2021).

ALDINI, G. et al. Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycoxidation and advanced lipoxidation end products. **Free Radical Research**, v. 47, n. sup1, p. 93-137, 2013.

AL-MUSAYEIB, N. et al. Antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Cordia sinensis*. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10214-10226, 2011.

AMEIRA, O. A. et al. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonoides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.1, p.7-11, 2009.

ARASTEH, A. et al. Glycated albumin: an overview of the in vitro models of an in vivo potential disease marker. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2014.

ASGARPANAHA, J.; AMIN, G.; PARVIZ, M. *In vitro* antiglycation activity of *Eremurus persicus* (Jaub. ET Sp.) Boiss. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 54, p. 11287-11289, 2011.

ATCHADE, T. et al. Chemical constituents of *Cordia platythyrsa* and evaluation of their glycation and urease inhibition activities. **Natural Products**, v. 8, p. 346-351, 2012.

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.

BASRAN, J. et al. The mechanism of formation of N-formylkynurenine by heme dioxygenases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 40, p. 16251-16257, 2011.

BAVELONI, F. G. **Estudo do potencial antitumoral da cordialina A em sistema nanoemulsionado para tratamento de linhagens celulares de tumor cervical humano**. 2018. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2018.

BAYEUX, M. C. et al. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n. 10, p. 1229-1232, 2002.

BERIM, A.; GANG, D. R. Methoxylated flavones: occurrence, importance, biosynthesis. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 3, p. 363-390, 2016.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 33, p. 20313-20316, 1997.

BORHIDI, A.; GONDÁR, E.; OROSZ-KOVÁCS, Z. S. The reconsideration of the genus *Cordia*. **Acta Botanica Hungarica**, v. 34, n. 3-4, p. 375-423, 1988.

BOURDON, E.; LOREAU, N.; BLACHE, D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 2, p. 233-244, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília-DF, 2 ed. p. 57, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: PNPIC-SUS**. 2006. Acesso em: 26 dez 2020. Disponível em: <<https://cutt.ly/7tQi91w>>.

BYUN, K. et al. Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: a common contributor to inflammation and degenerative diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 177, p. 44-55, 2017.

CAMPOS-RIOS, M. G.; CHIANG-CABRERA, F. El género *Varronia* P. Browne (Cordiaceae, Boraginales) en México. **Polibotánica**, n. 33, p. 01-32, 2012.

CHAUDHARY, A. et al. Ferulic acid: a promising therapeutic phytochemical and recent patents advances. **Recent patents on inflammation & allergy drug discovery**, v. 13, n. 2, p. 115-123, 2019.

CHAUDHURI, J. et al. The role of advanced glycation end products in aging and metabolic diseases: bridging association and causality. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 337-352, 2018.

CHEN, Y.; GUILLEMIN, G. J. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy states. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 2, p. 2097, 2009.

CHINCHANSURE, A. A. et al. Recent development of plant products with anti-glycation activity: a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 39, p. 31113-31138, 2015.

COHEN, M, P. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 25-30, 2003.

COLZANI, M. et al. Reactivity, selectivity, and reaction mechanisms of aminoguanidine, hydralazine, pyridoxamine, and carnosine as sequestering agents of reactive carbonyl species: a comparative study. **ChemMedChem**, v. 11, n. 16, p. 1778-1789, 2016.

CORY, H. et al. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, p. 87, 2018.

CRASCI, L. et al. Natural antioxidant polyphenols on inflammation management: Anti-glycation activity vs metalloproteinases inhibition. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 6, p. 893-904, 2018.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287-292, 2006.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.

DARIYA, B.; NAGARAJU, G. P. Advanced glycation end products in diabetes, cancer and phytochemical therapy. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 9, p. 1614-1623, 2020.

DAVIES, K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 20, p. 9895-9901, 1987.

DEAN, R. T. et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochemical Journal**, v. 324, n. 1, p. 1-18, 1997.

DE CARVALHO JR, P.M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p. 297–301, 2004.

DE LAS HAZAS, M. C. L et al. Hydroxytyrosol: emerging trends in potential therapeutic applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 19, p. 2157-2179, 2018.

DOS SANTOS, C. H. C. et al. New compounds of *Siolmatra brasiliensis* and inhibition of in vitro protein glycation damage. **Fitoterapia**, v. 133, p. 109-119, 2019.

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

EVANS, T. W. Albumin as a drug—biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, p. 6-11, 2002.

FERNANDEZ-GOMEZ, B. et al. Inhibitors of advanced glycation end products from coffee bean roasting by-product. **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 6, p. 1101-1110, 2018.

FOERDER, C. A.; SHAPIRO, B. M. Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 10, p. 4214-4218, 1977.

FRANDSEN, J.; NARAYANASAMY, P. Flavonoid enhances the glyoxalase pathway in cerebellar neurons to retain cellular functions. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

FU, M. X. et al. Role of oxygen in cross-linking and chemical modification of collagen by glucose. **Diabetes**, v. 41, n. Supplement 2, p. 42-48, 1992.

GHUMAN, J. et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **Journal of Molecular Biology**, v. 353, n. 1, p. 38-52, 2005.

GIEBAUF, A. et al. Formation of N-formylkynurenine suggests the involvement of apolipoprotein B-100 centered tryptophan radicals in the initiation of LDL lipid peroxidation. **FEBS Letters**, v. 389, n. 2, p. 136-140, 1996.

GIULIVI, C.; DAVIES, K. J. A. Dityrosine: A marker for oxidatively modified proteins and selective proteolysis. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 363-371, 1994.

GIULIVI, C.; DAVIES, K. J. A. Mechanism of the formation and proteolytic release of H₂O₂-induced dityrosine and tyrosine oxidation products in hemoglobin and red blood cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 26, p. 24129-24136, 2001.

GIULIVI, C.; TRAAETH, N. J.; DAVIES, K. J. A. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. **Amino Acids**, v. 25, n. 3-4, p. 227-232, 2003.

GODYŃ, J. et al. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 1, p. 127-138, 2016.

GÓMEZ, B. F. **Sustainable use of coffee silverskin as a natural source of bioactive compounds for diabetes**. 2016. 193f. Tese (Doutorado) - Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 2016.

GONZÁLEZ, I.; MORALES, M. A.; ROJAS, A. Polyphenols and AGEs/RAGE axis. Trends and challenges. **Food Research International**, v. 129, p. 108843, 2020.

GOTTSCHLING, M. et al. Congruence of Cordiaceae (Boraginales) inferred from ITS1 sequence data with morphology, ecology, and biogeography. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 92, n. 3, p. 425-437, 2005.

GUGLIUCCI, A. et al. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v. 80, n. 6, p. 339-344, 2009.

GUGLIUCCI, A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. **Journal of Osteopathic Medicine**, v. 100, n. 10, p. 621-634, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HARTOG, J. W. L. et al. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. **European Journal of Heart Failure**, v. 9, n. 12, p. 1146-1155, 2007.

HEINECKE, J. W. Oxidized amino acids: culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1090-1101, 2002.

HELLWIG, M.; HENLE, T. Baking, ageing, diabetes: a short history of the Maillard reaction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 39, p. 10316-10329, 2014.

HERNÁNDEZ, T. et al. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlan de las Salinas, Puebla (Mexico). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 181-188, 2003.

IINUMA, M. et al. Flavonoids synthesis. I.: Synthesis and spectroscopic properties of flavones with two hydroxy and five methoxy groups at C-2', 3', 4', 5, 6, 6', 7 and C-2', 3, 4', 5, 5', 6, 7. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 4, p. 1656-1662, 1986.

IRVINE, G. B. et al. Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 7, p. 451-464, 2008.

JAHAN, H.; CHOUDHARY, M. I. Glycation, carbonyl stress and AGEs inhibitors: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 25, n. 11, p. 1267-1284, 2015.

JANG, S. et al. Inhibitory effects of ursolic acid on hepatic polyol pathway and glucose production in streptozotocin-induced diabetic mice. **Metabolism**, v. 59, n. 4, p. 512-519, 2010.

KANLAYA, R.; THONGBOONKERD, V. Molecular mechanisms of epigallocatechin-3-gallate for prevention of chronic kidney disease and renal fibrosis: preclinical evidence. **Current Developments in Nutrition**, v. 3, n. 9, p. nzz101, 2019.

KESAVAN, S. K. et al. Proteome wide reduction in AGE modification in streptozotocin induced diabetic mice by hydralazine mediated transglycation. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2013.

KHAN, M. et al. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. **Food Research International**, v. 130, p. 108933, 2020.

KOKILA, N. R. et al. Antiglycation and antioxidant activity of polysaccharides isolated from fruit extract of pomegranate (*Punica granatum*). **Pharmacology Online**, v. 1, p. 821-829, 2010.

KÖNIG, J.; JUNG, T.; GRUNE, T. Protein carbonylation in aging and senescence. **Protein Carbonylation: Principles, Analysis, and Biological Implications**, p. 272-290, 2017.

KUMAR, S. et al. Anti-inflammatory activity of herbal plants: a review. **International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 272-281, 2013.

KVIECINSKI, M. R. Study of the antitumor potential of Brazilian *Bidens pilosa* L., *Casearea sylvestris* S., *Cordia verbenacea* DC and *Croton celtidifolus* B. In.: **Anais do Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais**, p. 21, 2010.

LADEIRA, R. S. **Preparação do extrato seco de *Cordia verbenacea***. Monografia (Especialização). Instituto Brasileiro de Estudos Homeopáticos, Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo, Porto Alegre. 2002.

LEAL, R. V. P. **Aplicação da espectrometria de massa por eletrospray na análise de biodiesel para predição de propriedades físicas e quantificação de ésteres metílicos**. Rio de Janeiro 2017. Tese (Doutorado do Programa de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

LEE, E. Y. et al. Glycated albumin is a useful glycation index for monitoring fluctuating and poorly controlled type 2 diabetic patients. **Acta Diabetologica**, v. 48, n. 2, p. 167-172, 2011.

LENNICKE, C. et al. Redox proteomics: methods for the identification and enrichment of redox-modified proteins and their applications. **Proteomics**, v. 16, n. 2, p. 197-213, 2016.

LEVINE, R. L.; et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, 346-357, 233, 1994.

LINS, A. P. et al. Two flavonoids from *Cordia verbenacea*. **Revista Latino-Americana de Química**, v. 21, n. 82, 1990.

LIU, J.; JING, H. Glycation of bovine serum albumin with monosaccharides inhibits heat-induced protein aggregation. **RSC Advances**, v. 6, n. 116, p. 115183-115188, 2016.

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2017.

LIU, Y.; HARTLEY, D. P.; LIU, J. Protection against carbon tetrachloride hepatotoxicity by oleanolic acid is not mediated through metallothionein. **Toxicology Letters**, v. 95, n. 2, p. 77-85, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, p. 100, 2002.

LUEBERT, F. et al. Familial classification of the Boraginales. **Taxon**, v. 65, n. 3, p. 502-522, 2016.

LUO, J. P.; DENG, Y. Y.; ZHA, X. Q. Mechanism of polysaccharides from *Dendrobium huoshanense*. On Streptozotocin-induced diabetic cataract. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 4, p. 243-249, 2008.

LV, L. et al. Purification, antioxidant activity and antiglycation of polysaccharides from *Polygonum multiflorum* Thunb. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 765-773, 2014.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. In: **The Systematic Identification of Flavonoids**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1970. p. 41-164.

MANZANARES, D. et al. Modification of tryptophan and methionine residues is implicated in the oxidative inactivation of surfactant protein B. **Biochemistry**, v. 46, n. 18, p. 5604-5615, 2007.

MARTIM, J. K. P.; MARANHO, L. T.; COSTA-CASAGRANDE, T. A. Role of the chemical compounds present in the essential oil and in the extract of *Cordia verbenacea* DC as an anti-inflammatory, antimicrobial and healing product. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113300, 2021.

MATIAS, E. F. F. et al. Atividade antibacteriana *in vitro* de *Croton campetris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**. V. 8, n.3, p. 294-298, 2010.

MATIAS, E. F. F. et al. Biological activities and chemical characterization of *Cordia verbenacea* DC. as tools to validate the ethnobiological usage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 213, 2013a.

MATIAS, E. F. F. et al. Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Cordia verbenaceae* DC. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 137, n. 1, p. 178, 2013b.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3. Ed. Fortaleza: Edições UFC, p. 148, 2009.

MATSUDA, H. et al. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 24, p. 5317-5323, 2003.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MEEPROM, A. et al. Isoferulic acid, a new anti-glycation agent, inhibits fructose-and glucose-mediated protein glycation *in vitro*. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6439-6454, 2013.

MELO, J. I. M.; LEMOS, L. P. L. Sinopse taxonômica de Boraginaceae sensu lato A. Juss. no Estado de Alagoas, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 701-710, 2008.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC. obtained by different methods. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 89-96, 2011.

MILLER, J. S.; GOTTSCHLING, M. Generic classification in the *Cordiaceae* (Boraginales): resurrection of the genus *Varronia* P. Br. **Taxon**, v. 56, n. 1, p. 163-169, 2007.

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

MONTANARI JR., I. **Variabilidade genética em uma população de *Cordia verbenacea* DC. para características agronômicas e fitoquímicas**. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu, 2011.

MORAIS, M. P. P. et al. Analysis of protein glycation using phenylboronate acrylamide gel electrophoresis. In: **Protein Electrophoresis**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 93-109, 2012.

MORO, I. J. ***Cordia verbenacea* DC.: estudo químico-biológico relacionado ao seu uso tradicional**. 2022. 112 f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2022.

MOSTAFA, A. A. et al. Plasma protein advanced glycation end products, carboxymethyl cysteine, and carboxyethyl cysteine, are elevated and related to nephropathy in patients with diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 302, n. 1, p. 35-42, 2007.

MOTOMURA, K. et al. Astragalosides isolated from the root of astragalus radix inhibit the formation of advanced glycation end products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7666-7672, 2009.

MOTTA, B. P. et al. *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**, v. 34, n. 16, p. 2389-2393, 2020.

NADEEM, M. et al. Therapeutic potential of rosmarinic acid: A comprehensive review. **Applied Sciences**, v. 9, n. 15, p. 3139, 2019.

NANDIYANTO, A. B. D.; OKTIANI, R.; RAGADHITA, R. How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. **Indonesian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 97-118, 2019.

NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 12, p. 3071-3109, 2009.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

OKABE, N.; HASHIZUME, N. Drug binding properties of glycosylated human serum albumin as measured by fluorescence and circular dichroism. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, n. 1, p. 16-21, 1994.

OLIVEIRA, L. G. S. Avaliação da atividade antifúngica e toxicidade do extrato etanólico de *Cordia verbenacea*. In: **Anais do Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais**, p. 29, 2010.

OZA, M. J.; KULKARNI, Y. A. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the medicinal species of the genus *Cordia* (Boraginaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 755-789, 2017.

PAN, L. et al. Structural characterization and anti-glycation activity in vitro of a water-soluble polysaccharide from *Dendrobium huoshanense*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 313-321, 2013.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016.

PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323-333, 2006.

PEREIRA, J. A. S. **Avaliação da variabilidade do metabolismo secundário de *Cordia verbenacea* DC.** 2017. 157 f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2017.

PERRONE, A. et al. Advanced glycation end products (AGEs): biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, n.1, p. 578-611, 2020.

PINTO, J.E.B.P. et al. **Compêndio de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/ FAEPE, p. 205, 2000.

PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonoides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**. V.11, n. 11, p. 7-11, 2009.

POULSEN, M. W et al. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. **Food Chemistry Toxicology**, 60, 10-37, 2013.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 93, n. 4, p. 803-813, 2018.

RABBANI, N.; XUE, M.; THORNALLEY, P. J. Dicarbonyl stress, protein glycation and the unfolded protein response. **Glycoconjugate Journal**, p. 1-10, 2021.

RAUF, A. et al. Proanthocyanidins: a comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 116, p. 108999, 2019.

RAZA, R. et al. Identification of highly potent and selective α -glucosidase inhibitors with antiglycation potential, isolated from *Rhododendron arboreum*. **Records of Natural Products**, v. 9, n. 2, p. 262, 2015.

RECIO, M. C.; ANDUJAR, I.; L RIOS, J. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2088-2103, 2012.

ROBERTS, J. A.; PEA, F.; LIPMAN, J. The clinical relevance of plasma protein binding changes. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2013.

ROBERTS, M. F. et al. Brickellin, a novel flavone from *Brickellia veronicaefolia* and *B. chlorolepis*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 1, p. 163-165, 1984.

ROHN, S. Possibilities and limitations in the analysis of covalent interactions between phenolic compounds and proteins. **Food Research International**, v. 65, p. 13-19, 2014.

RÖHRIG, U. F. et al. Rational design of indoleamine 2, 3-dioxygenase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 1172-1189, 2010.

ROLDÃO, E. F. et al. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 94-98, 2008.

ROMÃO, G. B. **Estudo *in vitro* da ação de extrato hidroetanólico de *Cordia verbenacea* DC. Em espécies reativas de oxigênio de importância biológica.** 2016. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2016.

ROSENOER, V. M.; ORATZ, M.; ROTHCHILD, M. A. 1 ed. **Albumin: Structure, function and uses.** Elsevier, 2014.

SABITHA, R. et al. *p*-Coumaric acid ameliorates ethanol-induced kidney injury by inhibiting inflammatory cytokine production and NF- κ B signaling in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 9, n. 5, p. 188, 2019.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; GALINIAK, S.; BARTOSZ, G. Kinetics of glycoxidation of bovine serum albumin by methylglyoxal and glyoxal and its prevention by various compounds. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 4880-4896, 2014.

SANTI, M. M. et al. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 256-261, 2014.

SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. A. Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other AGE-related diseases. **Physiological Reviews**, v. 100, p. 407-461, 2019.

SEMCHYSHYN, H. M. Fructation *in vivo*: detrimental and protective effects of fructose. **BioMed Research International**, v. 1. n.1, 2013.

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

SERTIÉ, J. A. A. et al. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 338-344, 2005.

SERTIÉ, J. A. et al. Antiinflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Medica**, v. 56, n. 1, p. 36-40, 1990.

SERTIÉ, J. A. et al. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: oral and topical antiinflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, n. 2, p. 239-247, 1991.

SERTIÉ, J. A. et al. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*. Part 1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves. **Planta Medica**, n. 54, v. 1, p. 7-10, 1988.

SHAKLAI, N.; GARLICK, R. L.; BUNN, H. F. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 6, p. 3812-3817, 1984.

SILVA, T. S.; SILVA, L. P.; MELO, J. I. M. Nomenclatural Updates in *Varronia* (Cordiaceae, Boraginales) from South America. **Harvard Papers in Botany**, v. 24, n. 1, p. 25-26, 2019.

SILVERSTEIN, R.M. et al. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 8ª edição, Editora LTC, 2019.

SINGH, P. et al. Potential dual role of eugenol in inhibiting advanced glycation end products in diabetes: proteomic and mechanistic insights. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

SINGH, R. et al. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129-146, 2001.

STAPF, M. N. S.; SILVA, T.S. 2020. **Varronia in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB105279>>. Acesso em: 20 dez. 2021.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; VARALAKSHMI, P. Role of lupeol and lupeol linoleate on lipemic–oxidative stress in experimental hypercholesterolemia. **Life Sciences**, v. 78, n. 12, p. 1329-1335, 2006.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein carbonylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 3, p. 323-325, 2010.

SZKUDLAREK, A. et al. Alteration of human serum albumin tertiary structure induced by glycation. Spectroscopic study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 153, p. 560-565, 2016.

TARODA, N.; GIBBS, P. E. revision of the brazilian species of *Cordia* subgenus *Varronia* (Boraginaceae). **Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh**, 1986.

TAYLOR, D. M. et al. Tryptophan 32 potentiates aggregation and cytotoxicity of a copper/zinc superoxide dismutase mutant associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 22, p. 16329-16335, 2007.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 31-40, 2003.

TICLI, F. K. et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, n. 3, p. 318-327, 2005.

TÖLKE, E. E. A. D. et al. Leaf anatomy with emphasis on separation of two species of *Varronia* P.Br. (Cordiaceae) of the Brazilian semi-arid region. **Brazilian Journal Botany**, v. 36, p. 189–201, 2013.

TORRES, N. M. P. O et al. A química dos produtos finais de glicação avançada. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, p. 375-392, 2018.

TRYNDA-LEMIESZ, L.; WIGLUSZ, K. Effects of glycation on meloxicam binding to human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 995, n. 1-3, p. 35-40, 2011.

UMADEVI S.; GOPI V.; ELANGO VAN V. Regulatory mechanism of gallic acid against advanced glycation end-products induced cardiac remodeling in experimental rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 208, n. 1, p. 28-36, 2014.

VAN PUTTE, L.; DE SCHRIJVER, S.; MOORTGAT, P. The effects of advanced glycation end products (AGEs) on dermal wound healing and scar formation: a systematic review. **Scars, Burns & Healing**, v. 2, p. 2059, 2016.

VASAN, S. et al. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. **Nature**, v. 382, n. 6588, p. 275-278, 1996.

VELDE, V.V. et al. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. **Journal of the Chemical Society Erkin Trans**, v. 1, p. 2697-2700, 1982.

VETTER, S. W.; INDURTHI, V. S. K. Moderate glycation of serum albumin affects folding, stability, and ligand binding. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 23-24, p. 2105-2116, 2011.

VETTER, S. W.; INDURTHI, V. S. K. Moderate glycation of serum albumin affects folding, stability, and ligand binding. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 23-24, p. 2105-2116, 2011.

VISTOLI, G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47, n. sup1, p. 3-27, 2013.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlim: Springer Verlag, p. 320, 1984.

WANG, Z. et al. Anti-glycative effects of oleanolic acid and ursolic acid in kidney of diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 628, n. 1-3, p. 255-260, 2010.

WEI, Z; HUANG Q. et al. Adverse health consequences of dietary advanced glycation end products (AGEs) and inhibitory effects of natural ingredients on ages. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 1, n. 5, p. 1386-1390, 2017.

WU, C. H.; YEN, G. C. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3167-3173, 2005.

XIE, Y.; CHEN, X. Structures required of polyphenols for inhibiting advanced glycation end products formation. **Current Drug Metabolism**, v. 14, n. 4, p. 414-431, 2013.

YAMAGUCHI, F. et al. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 180-185, 2000.

YAMAGUCHI, Y. et al. Corosolic acid prevents oxidative stress, inflammation and hypertension in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 79, n. 26, p. 2474-2479, 2006.

YANG, B.; ZHAO, M.; JIANG, Y. Anti-glycated activity of polysaccharides of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp treated by ultrasonic wave. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 629-633, 2009.

YEH, W. et al. 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.

YILMAZ, Z. et al. The effect of resveratrol on glycation and oxidation products in plasma and liver of chronic methylglyoxal-treated rats. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 3, p. 584-590, 2018.

YIN, M. Anti-glycative potential of triterpenes: a mini-review. **BioMedicine**, v. 2, n. 1, p. 2-9, 2012.

ZENG, C. et al. Clinical/translational aspects of advanced glycation end-products. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 12, p. 959-973, 2019.

ZHANG, Q. et al. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 2, p. 754-769, 2009.

ZHAO, M. et al. Structural characterization of water-soluble polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladodes in relation to their anti-glycated activities. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1480-1486, 2007.

ZIEMAN, S. J.; KASS, D. A. Advanced glycation end products cross-linking: pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease. **Congest Heart Fail**, v. 10, n. 3, p. 144-151, 2004.

APÊNDICES

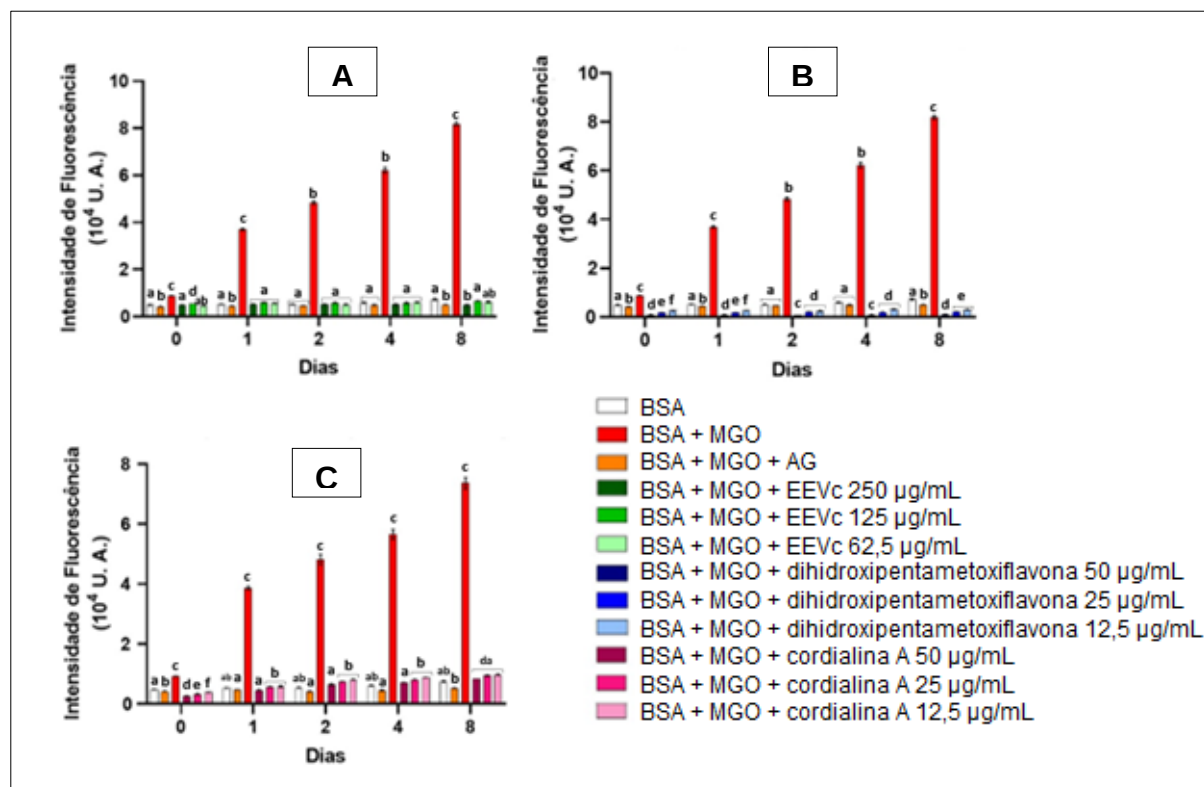
Apêndice I: Representação esquemática da incubação esquemática da incubação com metilglioxal, cada célula representa um frasco com seus respectivos constituintes do qual a incubação procedeu. Todo o experimento foi realizado em triplicatas. C1: dihidroxipentametoxiflavona; e C2: cordialina A.

	1	2	3	4
A	BSA	MGO	AG	BSA + MGO
B	BSA + AG	MGO + AG	BSA + MGO + AG	
C	EEVc 250 µg/mL	EEVc 250 µg/mL + MGO	BSA + EEVc 250 µg/mL	BSA + MGO + EEVc 250 µg/mL
D	EEVc 125 µg/mL	EEVc 125 µg/mL + MGO	BSA + EEVc 125 µg/mL	BSA + MGO + EEVc 125 µg/mL
E	EEVc 62,5 µg/mL	EEVc 62,5 µg/mL + MGO	BSA + EEVc 62,5 µg/mL	BSA + MGO + EEVc 62,5 µg/mL
F	C1 50 µg/mL	C1 50 µg/mL + MGO	BSA + C1 50 µg/mL	BSA + MGO + C1 50 µg/mL
G	C1 25 µg/mL	C1 25 µg/mL + MGO	BSA + C1 25 µg/mL	BSA + MGO + C1 25 µg/mL
H	C1 12,5 µg/mL	C1 12,5 µg/mL + MGO	BSA + C1 12,5 µg/mL	BSA + MGO + C1 12,5 µg/mL
I	C2 50 µg/mL	C2 50 µg/mL + MGO	BSA + C2 50 µg/mL	BSA + MGO + C2 50 µg/mL
J	C2 25 µg/mL	C2 25 µg/mL + MGO	BSA + C2 25 µg/mL	BSA + MGO + C2 25 µg/mL
K	C2 12,5 µg/mL	C2 12,5 µg/mL + MGO	BSA + C2 12,5 µg/mL	BSA + MGO + C2 12,5 µg/mL

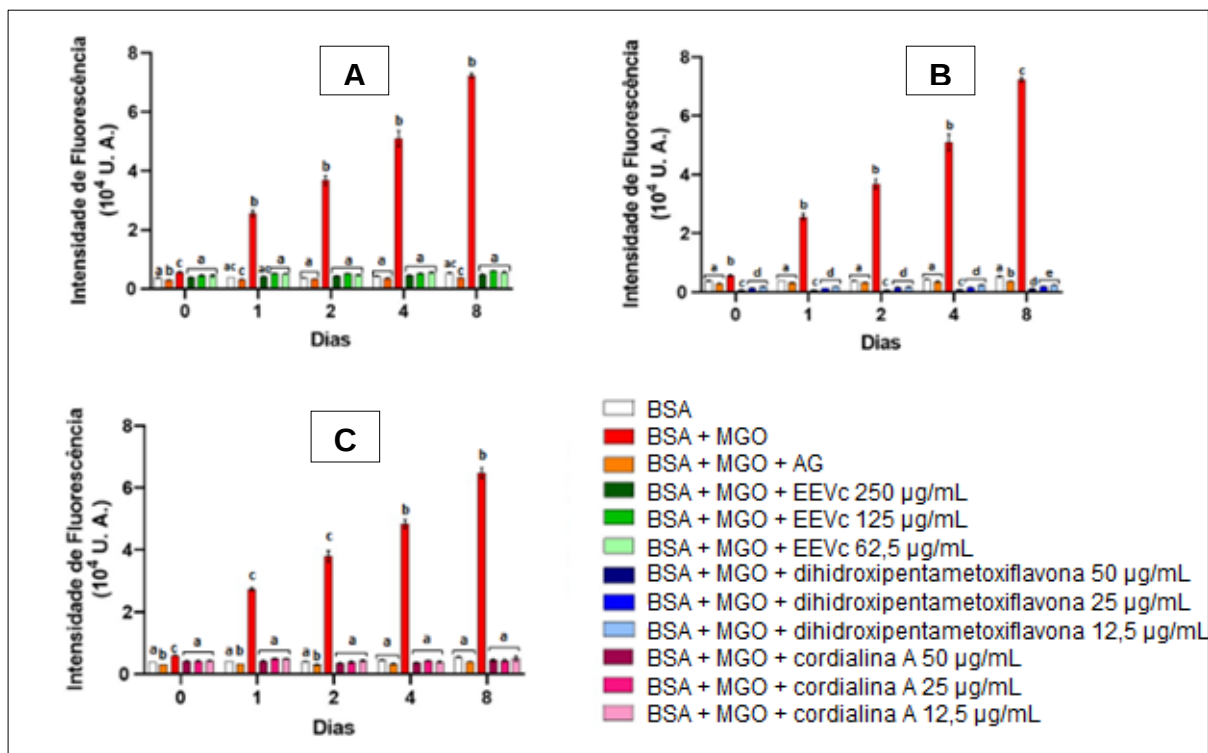
BSA: albumina sérica bovina; MGO: metilglioxal; AG: aminoguanidina; EEVc: extrato etanólico de *Varronia curassavica* Jacq.; C1: Flavonoide isolado de EEVc e; C2: Triterpeno isolado de EEVc.

Controles do experimento
Experimento com EEVc
Experimento com C1
Experimento com C2

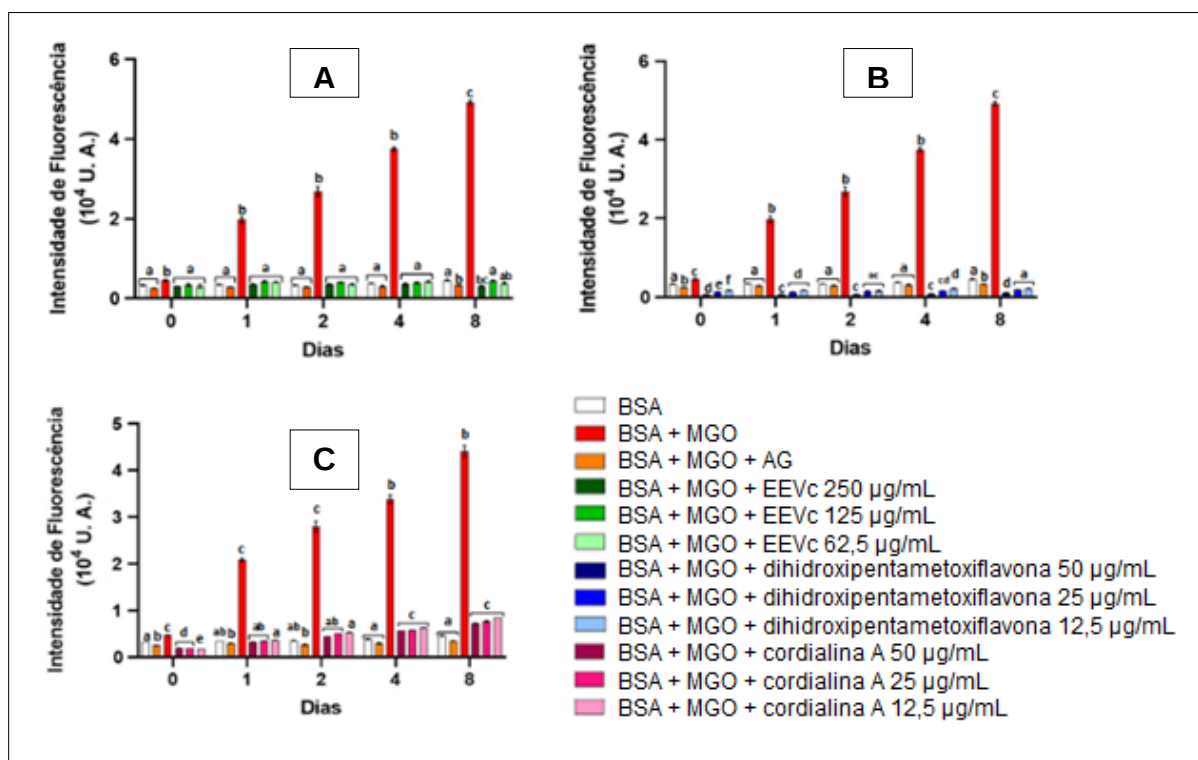
Apêndice II: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A) extrato etanólico de *V. curassavica*, dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de AGEs fluorescentes em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* apenas com BSA.



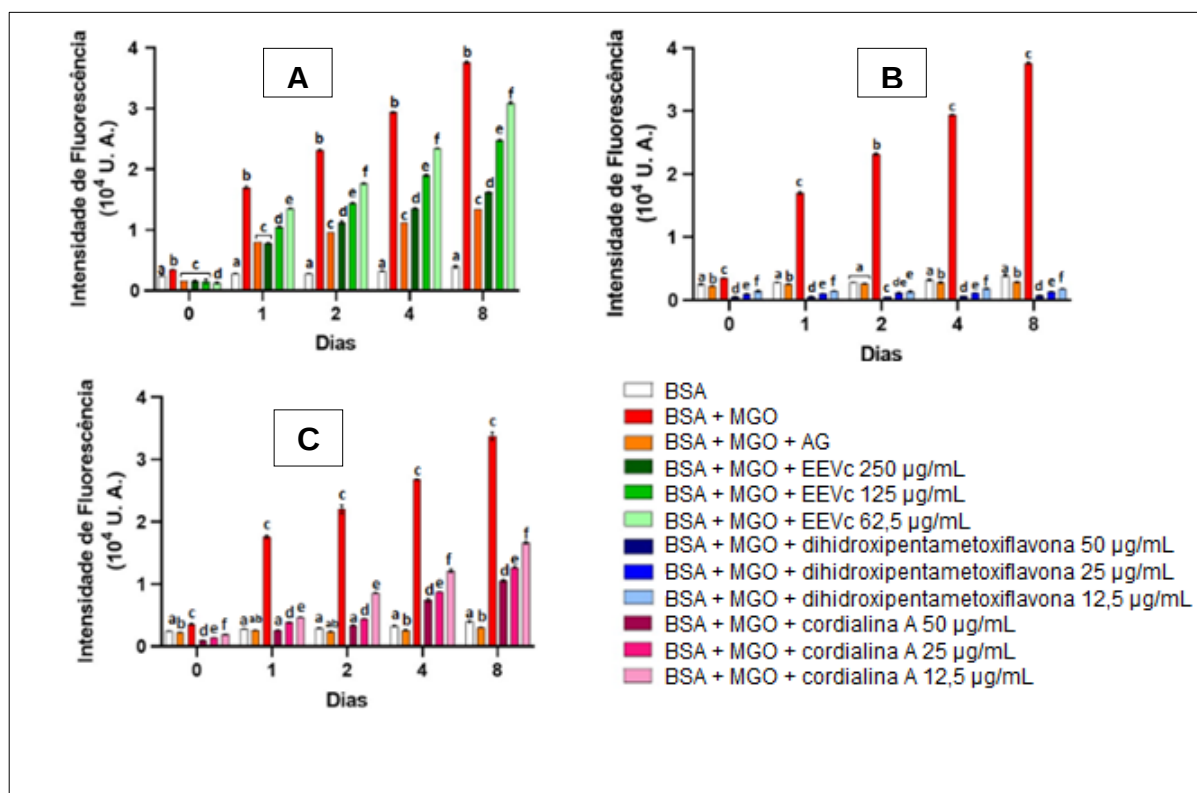
Apêndice III: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A) extrato etanólico de *V. curassavica*, dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de Ditirosina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* apenas com BSA.



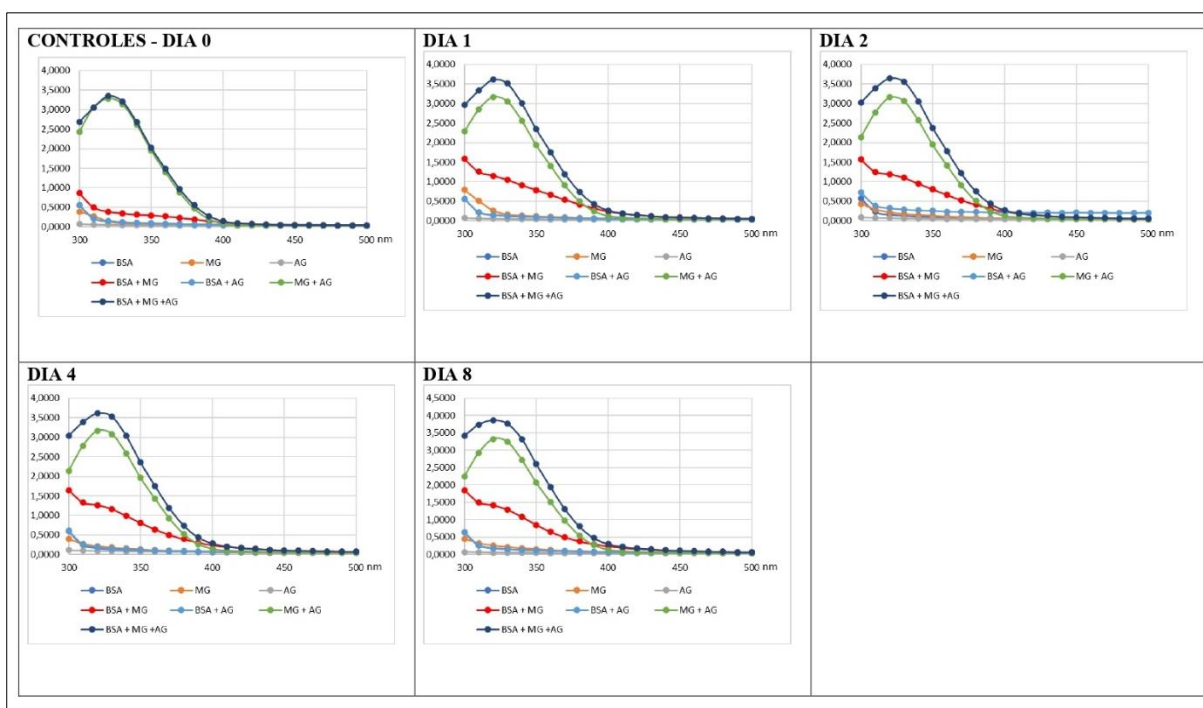
Apêndice IV: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A) extrato etanólico de *V. curassavica*, dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de N'-formilquinurenina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* apenas com BSA.



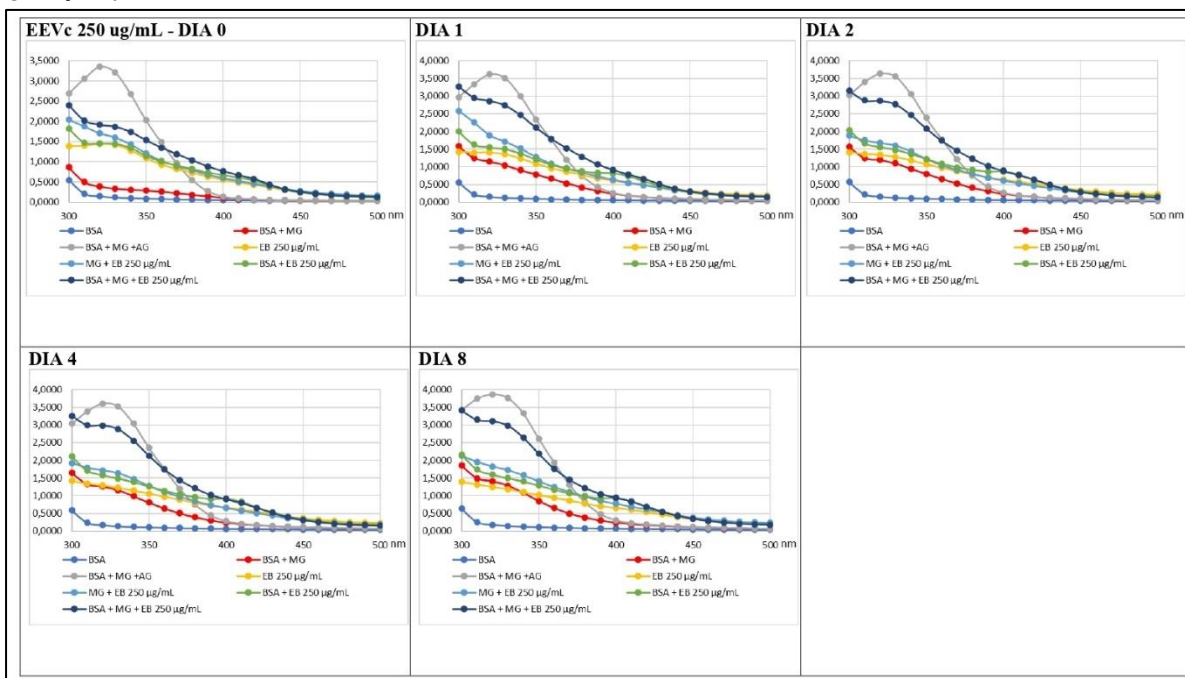
Apêndice V: Efeitos das diferentes concentrações de EEVc (A) extrato etanólico de *V. curassavica*, dihidroxipentametoxiflavona (B) e cordialina A (C) na formação de Quinurenina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* apenas com BSA.



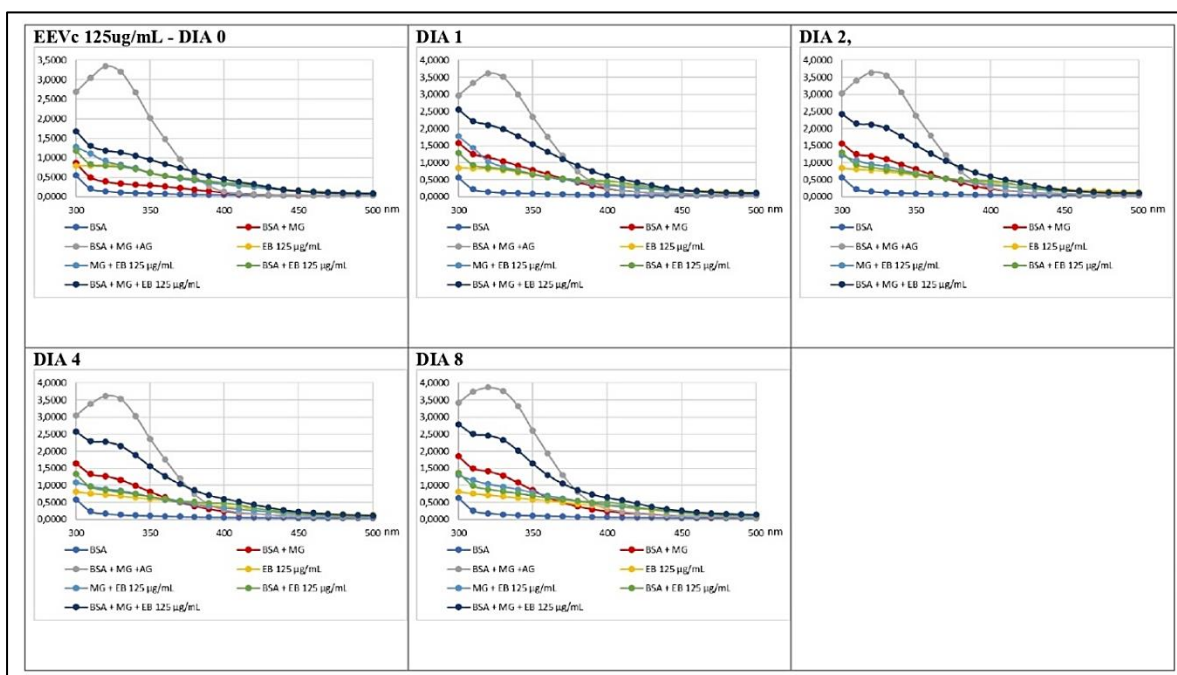
Apêndice VI: Gráficos de absorção dos controles utilizados no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



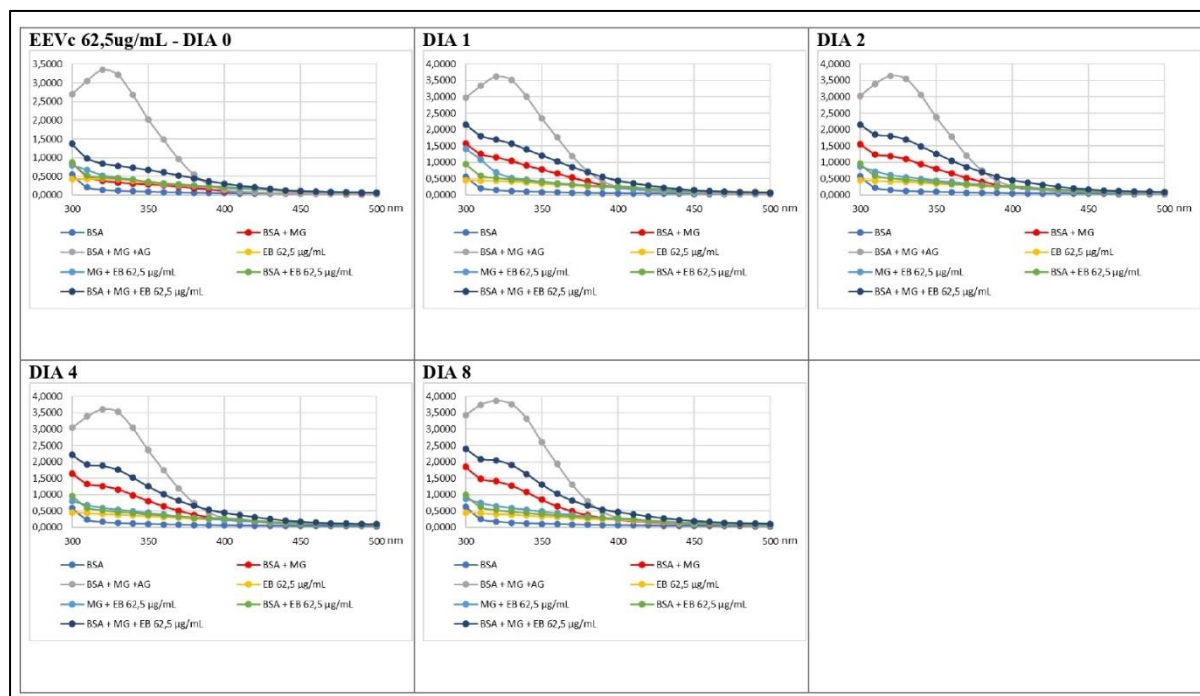
Apêndice VII: Gráficos de absorção do EEVc 250 µg/mL utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



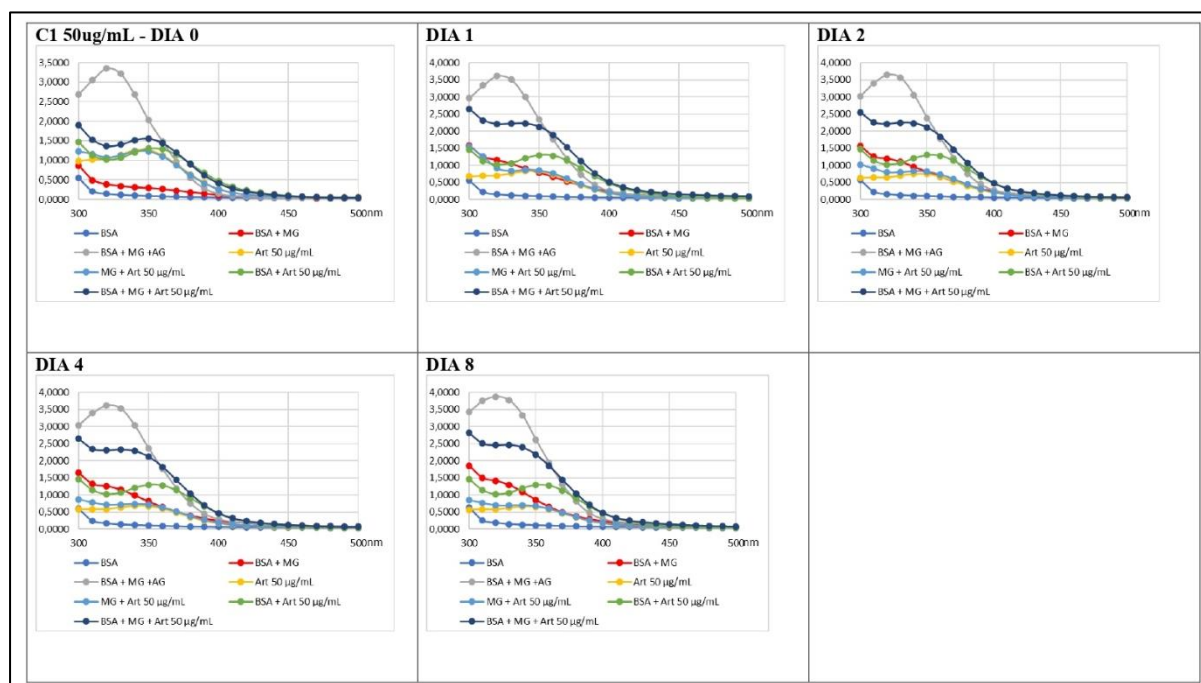
Apêndice VIII: Gráficos de absorção do EEVc 125 µg/mL utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



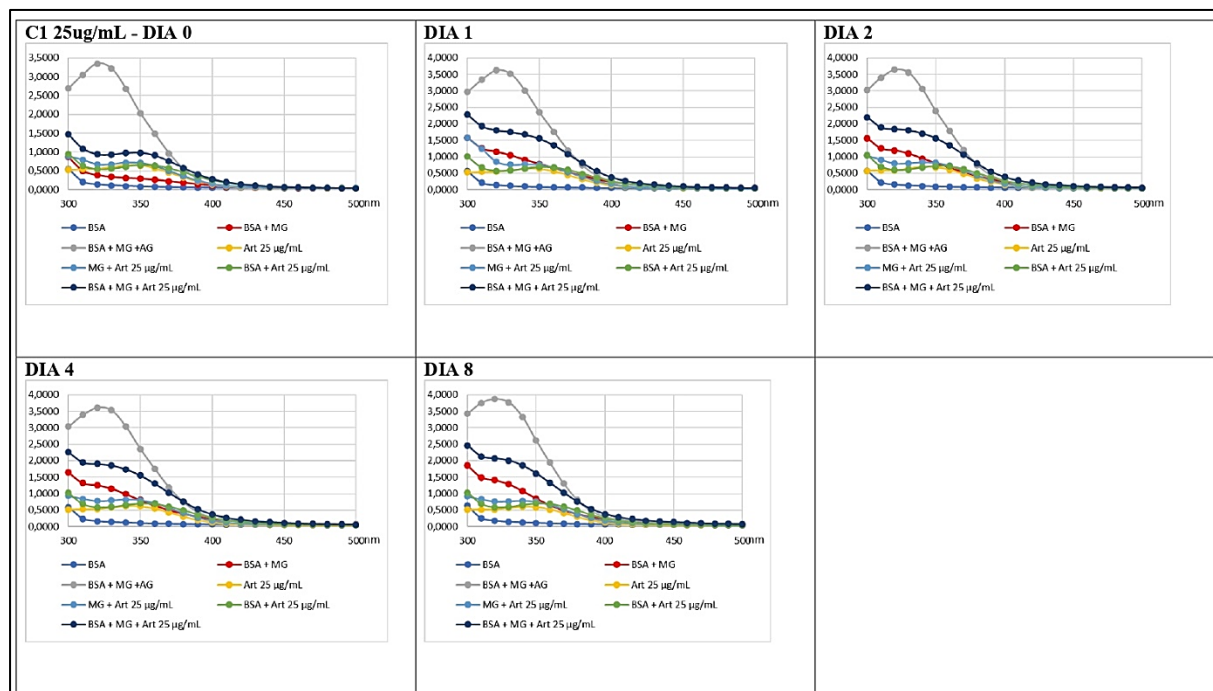
Apêndice IX: Gráficos de absorção do EEVc 62,5 µg/mL utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



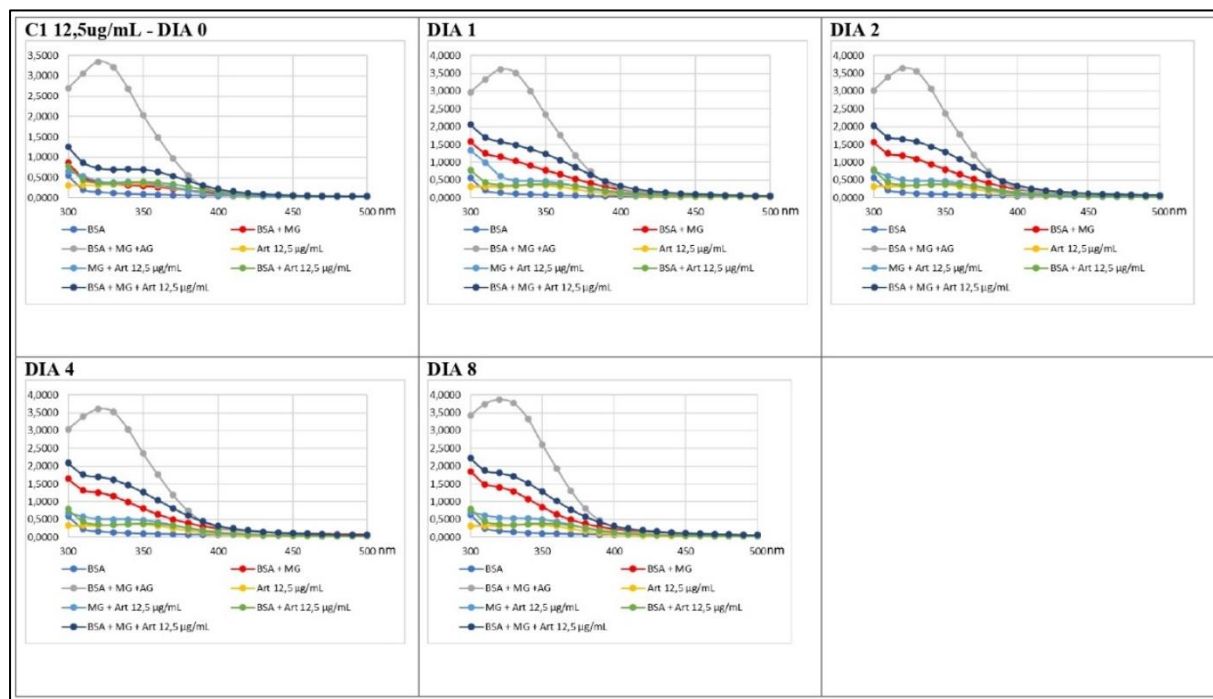
Apêndice X: Gráficos de absorção do dihidroxipentametoxiflavona 50 µg/mL utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



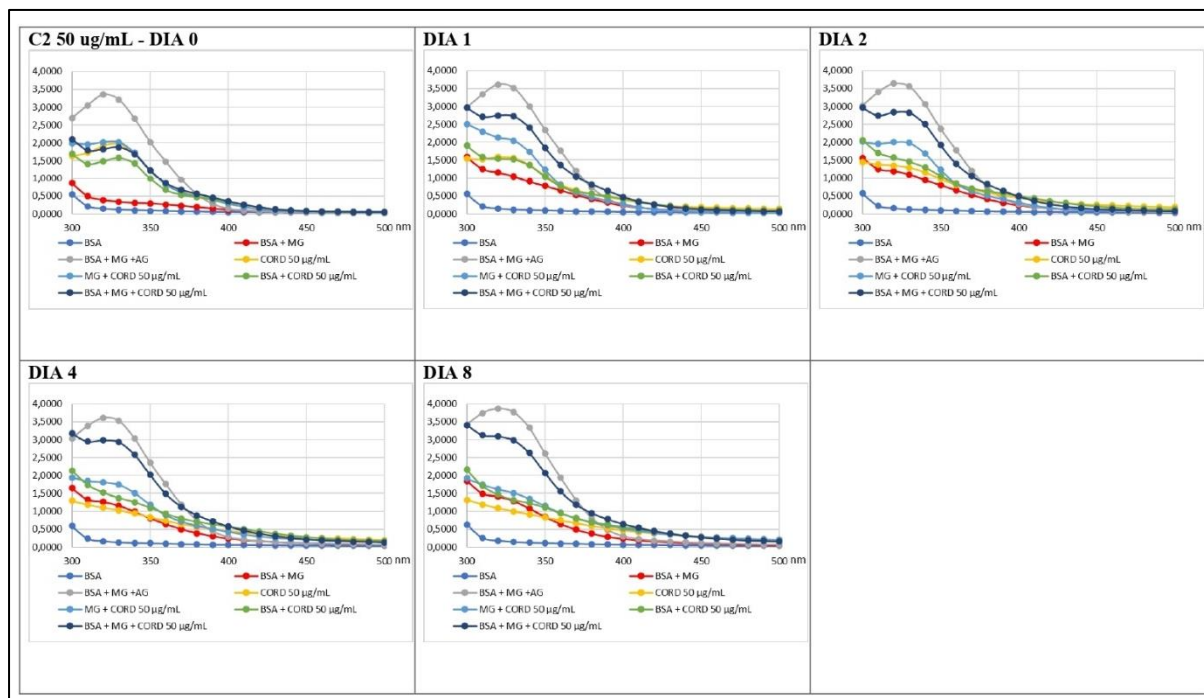
Apêndice XI: Gráficos de absorção do dihidropentametoxiflavona 25 µg/mL utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



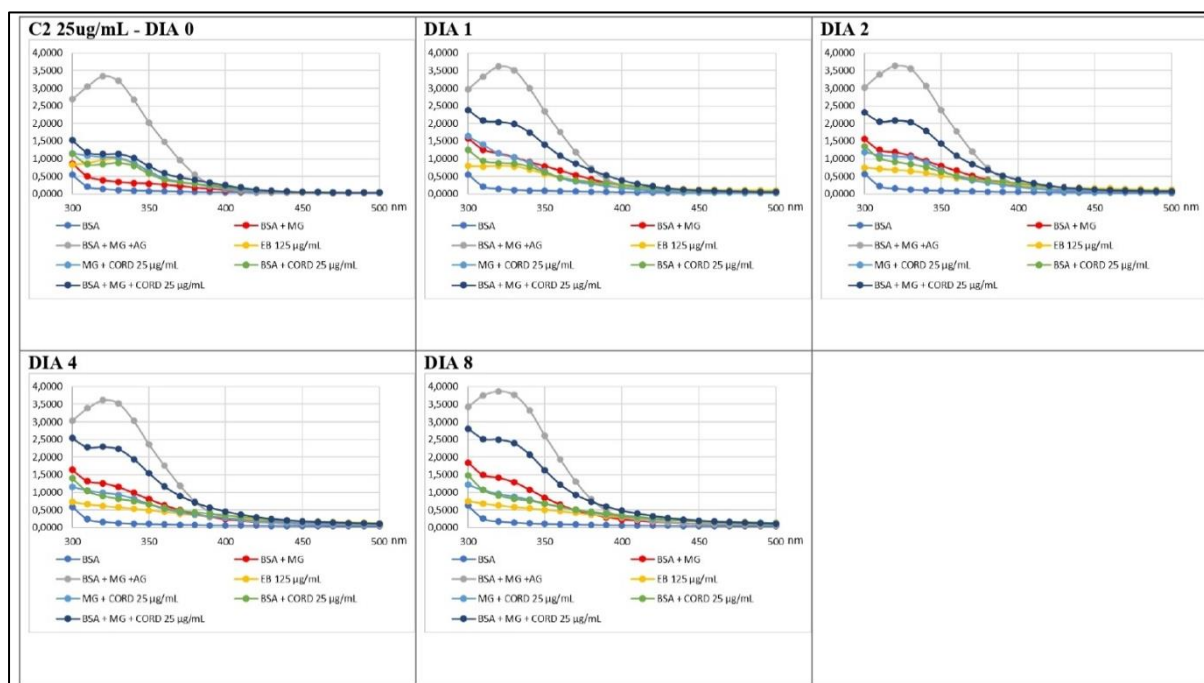
Apêndice XII: Gráficos de absorção do dihidropentametoxiflavona 12,5 µg/mL utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



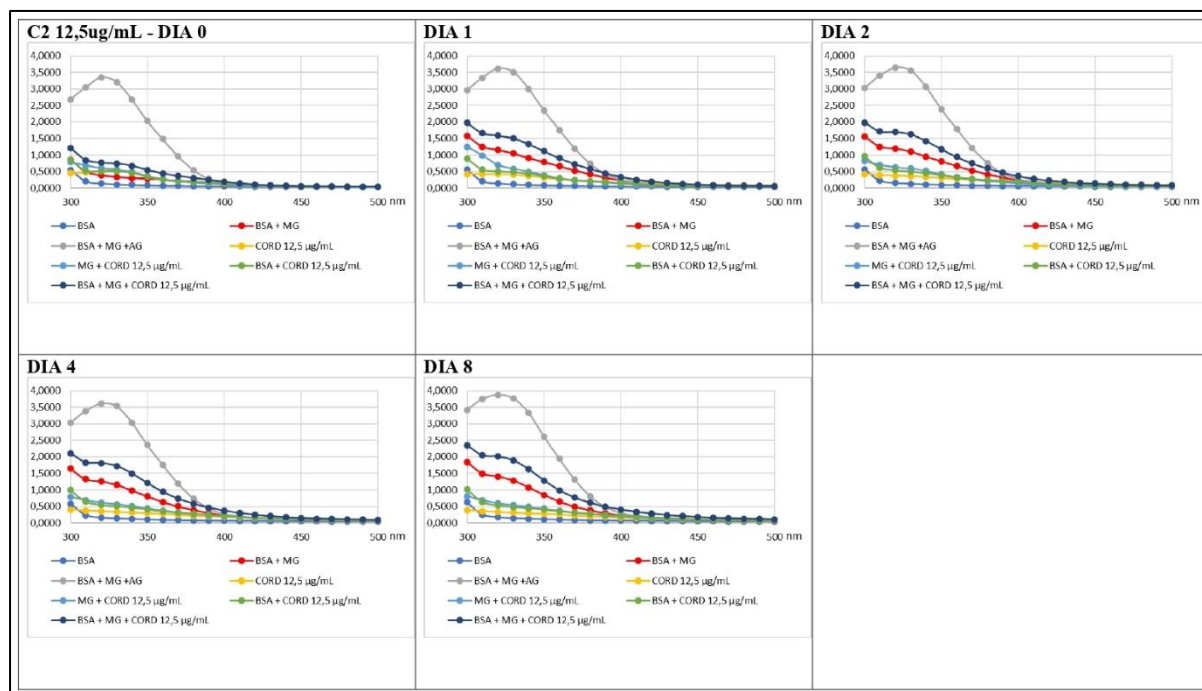
Apêndice XIII: Gráficos de absorção do cordialina A 50 $\mu\text{g/mL}$ utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



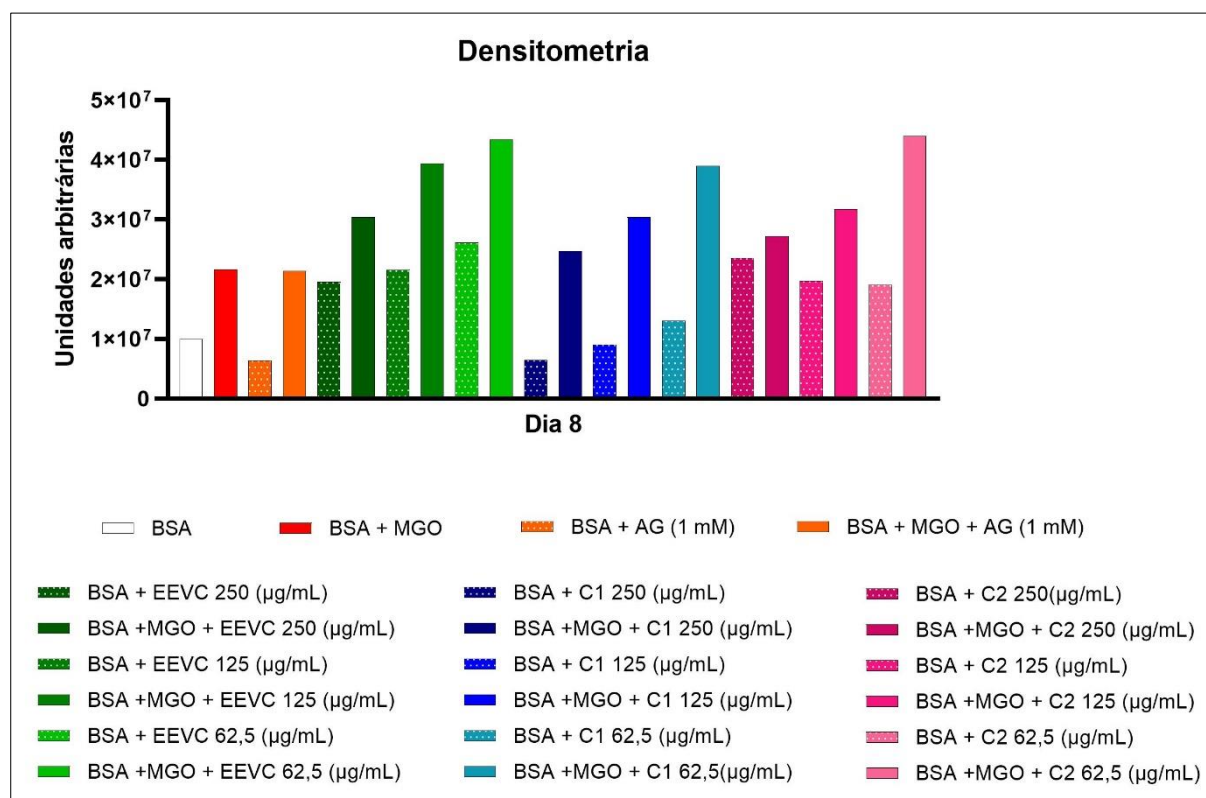
Apêndice XIV: Gráficos de absorção do cordialina A 25 $\mu\text{g/mL}$ utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



Apêndice XV: Gráficos de absorção do cordialina A 12,5 µg/mL utilizado no sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



Apêndice XVI: Representação gráfica do cálculo de densitometria gerada pelo programa ImageJ® 1.53k referentes a formação de *crosslinking* das amostras de EEVc, dihidroxipentametoxiflavona e cordialina A em diferentes concentrações incubadas com BSA+MGO no dia 8.



ANEXOS

ANEXO I: Descrição da coleta e preparo do extrato etanólico de *Varronia curassavica* Jacq.

De acordo com Pereira (2017), partes aéreas de *Varronia curassavica* foram coletadas da coleção de plantas medicinais, localizada no campo experimental do CPQBA – Unicamp, no Distrito de Betel – Paulínia, SP (22°47'15.91"S 47°06'42.87"O). A coleta foi realizada no dia 31/10/2013 às 12h (27° C, UR de 65%, clima nublado). Foram coletados exemplares destinados à preparação de exsiccatas, as quais foram enviadas para tombamento no Herbário São José do Rio Preto (Ibilce/Unesp) sob o número 31235.

O método escolhido para obtenção do extrato etanólico das folhas foi a maceração, realizada em 3 etapas, sendo a primeira de 24h e as duas subsequentes de 48 h, a 35° C, sob agitação ocasional e utilizando 1 Kg de droga vegetal pulverizada. A relação droga vegetal: solvente total foi de 1:15 (g/mL), utilizando 5 L de etanol grau PA em cada etapa. As soluções extrativas obtidas foram filtradas, reunidas, secas em capela sob vazão de ar e em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida. O rendimento do extrato seco em relação à droga vegetal utilizada foi de 13%, ou seja, 130 g de resíduo seco.

ANEXO II: Certidão cadastral do projeto ao acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado no SisGen.



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Certidão
Cadastro nº A55E317**

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A55E317**
 Usuário: **UNESP**
 CPF/CNPJ: **48.031.918/0001-24**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Cordia verbenacea

Título da Atividade: **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória de metabólitos secundários de Cordia verbenacea A.DC.**

Equipe

André Gonzaga dos Santos	UNESP
Isabela Jacob Moro	UNESP
André Faibicher	UNESP
Winner Duque Rodrigues	UNESP

Data do Cadastro: **09/08/2018 08:05:51**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 23:38 de 16/03/2021.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**