

# RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **TESE** será disponibilizado somente a partir de 26/02/2023.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus de Araraquara  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo do potencial antioxidante e antiglicação de**  
***Siolmatra brasiliensis* (cogn.) Baill. em sistema-**  
**modelo de estresse glico-oxidativo *in vitro* em soro**  
**sanguíneo**

Anderson Kiyoshi Kaga

Orientador: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

**Araraquara - SP**

**2021**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus de Araraquara  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo do potencial antioxidante e antiglicação de**  
***Siolmatra brasiliensis* (cogn.) Baill. em sistema-**  
**modelo de estresse glico-oxidativo *in vitro* em soro**  
**sanguíneo**

Anderson Kiyoshi Kaga

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Profa. Dra. Amanda Martins  
Baviera

**Araraquara - SP**

**2021**

---

**K14e**

Kaga, Anderson Kiyoshi.

Estudo do potencial antioxidante e antiglicação de *Siolmatra brasiliensis* (cogn.) Baill. em sistema-modelo de estresse glicoxidativo *in vitro* em soro sanguíneo / Anderson Kiyoshi Kaga. - Araraquara: [S.n.], 2021.  
168 f. : il.

Tese (Doutorado) - 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.

Orientadora: Amanda Martins Baviera.

1. Diabetes mellitus. 2. Sistemas-modelo *in vitro*. 3. Produtos avançados da glicação. 4. Paraoxonase 1. I. Baviera, Amanda Martins, orient. II. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: Estudo do potencial antioxidante e antiglicação de *Siolmatra brasiliensis* (Cogn.) Baill. em sistema-modelo de estresse glico-oxidativo in vitro em soro sanguíneo

**AUTOR: ANDERSON KIYOSHI KAGA**

**ORIENTADORA: AMANDA MARTINS BAVIERA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. AMANDA MARTINS BAVIERA (Participação Virtual)  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP

Profa. Dra. SILVIA DE PAULA GOMES (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Biológicas / Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. EDUARDO CARVALHO LIRA (Participação Virtual)  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia / Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. IGUATEMY LOURENCO BRUNETTI (Participação Virtual)  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara - UNESP

Prof. Dr. MARCELO BISPO DE JESUS (Participação Virtual)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual / Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas

Araraquara, 26 de fevereiro de 2021

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

*Agradeço aos meus pais, Aimar e Kiyosi, a minha tia Ayako por me incentivarem e apoiarem a realização deste sonho;*

*As minhas amadas amigas, “irmãs” de Botucatu, Ketlin, Priscila e Talita, e a minha amiga “irmã” de coração, Fabiana, por estarem presentes mesmo que a distância, mesmo essa distância não nos separou, a amizade sincera que muitas das vezes foram responsáveis por uns puxões de orelha, em momentos oportunos;*

*Aos meus novos amigos e grandes companheiros de laboratório, que formei durante este período de doutorado: Carlos, Mariana, Maiara, Ingrid, Marcel, Camila, Juliana, Bruno, Renata, Tayra e Maira. Amigos que contribuíram muito para o meu desenvolvimento técnico científico, e serviram de apoio em momentos difíceis;*

*Aos alunos de iniciação científica que tive a oportunidade de participar de sua formação, mesmo que tenha sido pouco: Priscila, Megley, Carlos, Tainá, Natália, Giovanna, Felipe, Lorena, Marina. Especialmente ao Bruno, Tassiana e Danyelle, alunos de iniciação científica que pude participar mais de perto e pude dividir momentos de aprendizado seja no dia a dia, quanto a como ser um orientador, devido a participar como co-orientador em seus trabalhos;*

## **AGRADECIMENTOS**

*A minha orientadora profa. Dra. Amanda Martins Baviera pela orientação e apoio no desenvolvimento deste projeto, bem como sua paciência e dedicação em contribuir com o meu desenvolvimento como pesquisador;*

*Ao prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, o qual favoreceu ao meu desenvolvimento técnico científico, muita das vezes o responsável por semear o conhecimento seja científico ou até mesmo sobre coisas do cotidiano, além dos grandes momentos de descontração, os quais ficarão sempre guardados na memória.*

*Ao prof. Dr. Fernando Rogério Pavan por permitir a utilização de seu laboratório de pesquisa para realizar algumas análises;*

*A secretária e aos servidores do departamento de Análises Clínicas, Cristina, Marcos, Rose e Sérgio (in memorium), pessoas que me auxiliam durante minha permanência no departamento e sempre dispostos a ajudar;*

*Ao departamento de Análises Clínicas por fornecer a estrutura física necessária para o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa;*

*A seção de pós-graduação e a coordenação do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo suporte acadêmico;*

*A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Araraquara, pela estrutura concedida para a realização do meu projeto de pesquisa;*

*A CAPES por ter contribuído significativamente ao desenvolvimento deste trabalho por fornecer o apoio financeiro, através da bolsa de estudos.*

## RESUMO

O diabetes mellitus é uma síndrome metabólica caracterizada por deficiência na produção e/ou ações da insulina, culminando em hiperglicemia crônica, a qual encontra-se associada ao desenvolvimento das complicações diabéticas. A hiperglicemia contribui para os processos de glicação proteica e de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Dentre as substâncias que contribuem para a formação dos AGEs, destacam-se os compostos dicarbonílicos, incluindo o metilglioxal. O metilglioxal (MGO) é capaz de reagir com resíduos de aminoácidos em proteínas presentes em domínios funcionais, culminando em perda de função. Sistemas-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* mimetizam os impactos negativos da hiperglicemia sobre biomoléculas. A maioria dos estudos que empregam sistemas-modelo de glicação *in vitro* utilizam proteínas isoladas, poucos são os estudos com matrizes complexas, incluindo o soro sanguíneo humano. Estudos são necessários para padronização de sistemas-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* com soro sanguíneo humano, com vistas em sua utilização para o *screening* de compostos bioativos ou preparações com potencial antiglicação e/ou anti-AGE. Estudos têm demonstrado a atividade antidiabética de preparações do caule de *Siolmatra brasiliensis* (Cogn.) Bail, uma espécie nativa do Cerrado e Pantanal brasileiros. Recentemente, demonstrou-se que preparações dessa planta também possuem atividade antiglicação, pois foi capaz de diminuir marcadores do estresse glico-oxidativo em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* (albumina sérica bovina incubada com glicose). O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações em biomarcadores do estresse glico-oxidativo em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano, incubado na presença de metilglioxal, e na ausência ou presença de extrato hidroetanólico ou fração clorofórmica ou fração acetato de etila do caule de *Siolmatra brasiliensis*, ou de substância isolada, a naringenina. Foram realizados quatro experimentos utilizando amostras de soro controle de origem humana: (I) **sistema-modelo de glicação *in vitro* na presença de glicose**, no qual o soro sanguíneo humano foi incubado a 37°C por 40 dias, e avaliadas as atividades de enzimas antioxidantes (catalase e paraoxonase), níveis de biomarcadores de peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), níveis dos grupos carbonilas em proteínas, estimativa de AGEs fluorescentes e estudo de modificações estruturais em proteínas; (II) **sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* na presença de MGO**, para padronização da melhor concentração de MGO a ser utilizada, no qual soro sanguíneo humano foi incubado a 37°C por 48 horas na presença de MGO nas concentrações de 5, 10 e 20 mM, e em diferentes tempos monitorou-se os AGEs fluorescentes e a presença de modificações estruturais em proteínas; (III) **sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* na presença de MGO e avaliação dos efeitos do extrato, fração e substância isolada de caule de *Siolmatra brasiliensis***, no qual soro sanguíneo humano foi incubado a 37°C por 48 horas na presença de 10 mM de MGO, e na ausência ou presença de distintas concentrações de extrato hidroetanólico (SbExt) ou fração clorofórmica (SbCHCl<sub>3</sub>) do caule de *Siolmatra brasiliensis*, ou de substância isolada, a naringenina (NAR); em diferentes tempos foram monitorados os níveis de diversos marcadores bioquímicos, formação de AGEs fluorescentes, formação de produtos de oxidação dos resíduos de triptofano e tirosina, níveis de grupos carbonil em proteínas (PCO), análise de modificações estruturais em proteínas e as atividades arilesterase e lactonase da paraoxonase 1. (IV) **sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* na presença de MGO e**

**avaliação dos efeitos da fração acetato de etila do caule de *Siolmatra brasiliensis***, no qual soro sanguíneo humano foi incubado a 37°C por 48 horas na presença de 10 mM de MGO, e na ausência ou presença de distintas concentrações da fração acetato de etila (SbAcE) do caule de *Siolmatra brasiliensis*; em diferentes tempos foram monitorados os níveis de diversos marcadores bioquímicos, formação de AGEs fluorescentes, formação de produtos de oxidação dos resíduos de triptofano e tirosina, níveis de grupos carbonil em proteínas (PCO), análise de modificações estruturais em proteínas e atividades arilesterase e lactonase de paraoxonase 1. Em (I) foi possível observar aumento gradual na intensidade de fluorescência dos AGEs, modificações na estrutura de proteínas, aumento progressivo nos níveis de PCO no decorrer do tempo de incubação de soro na presença de glicose, as quais foram atenuadas na presença de aminoguanidina (agente protótipo anti-AGE). Em (II) o sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* contendo soro + MGO apresentou perfil de resposta de concentração dependente na geração de AGEs fluorescentes e modificações na estrutura de proteínas. Em (III e IV) SbExt, NAR e SbAcE foram capazes de diminuir a formação de AGEs nas incubações contendo soro + MGO, bem como também diminuíram a formação dos produtos de oxidação dos resíduos de triptofano e tirosina, enquanto SbCHCl<sub>3</sub> não foi eficiente. Na análise de modificações do padrão de separação eletroforetica de proteínas em soro + MGO, SbExt, SbCHCl<sub>3</sub>, NAR e SbAcE não se mostraram eficazes, bem como nas atividades arilesterase e lactonase de PON 1. Neste estudo foi possível observar que, o sistema-modelo de glicação *in vitro* de soro sanguíneo na presença de metilglioxal é mais severo em comparação ao sistema-modelo na presença de glicose. O extrato hidroetanólico de caule de *Siolmatra brasiliensis* e narigenina, uma das substâncias isoladas a partir dessa espécie, bem como o a fração acetato de etila, parecem atenuar eventos glico-oxidativos que ocorrem em fases mais avançadas.

**Palavras chave:** diabetes mellitus, sistemas-modelo *in vitro*, produtos avançados da glicação, paraoxonase 1

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic syndrome characterized by deficiency in the production and/or action of insulin, culminating in chronic hyperglycemia, which is associated with the onset of the diabetic complications. Hyperglycemia contributes to protein glycation processes and formation of advanced glycation end products (AGEs). Among the compounds that contribute to the formation of AGEs, it can be cited the dicarbonyl compounds, including methylglyoxal. Methylglyoxal (MGO) is able to react with amino acid residues in proteins found into functional domains, leading to loss of function. *In vitro* model systems of glycoxidative changes mimic the negative impacts of hyperglycemia on biomolecules. Most studies using *in vitro* model systems of glycation use isolated proteins, few studies use complex matrices, such as human blood serum. Studies are necessary for standardization of *in vitro* model systems of glycoxidative changes with human blood serum, attempting to use them for the screening of bioactive compounds or preparations having antiglycation and/or anti-AGE potential. Studies have demonstrated the antidiabetic activity of preparations of stem from *Siolmatra brasiliensis* (Cogn.) Bail, a native species of the Brazilian Cerrado and Pantanal. Recently, it has been demonstrated that preparations of this plant also possess antiglycation activity, since they decreased markers of glycoxidative stress in an *in vitro* model system of protein glycation (bovine serum albumin incubated with glucose). The aim of this study was to evaluate changes in glycoxidative stress biomarkers in an *in vitro* model system of glycoxidative changes in human blood serum, incubated in the presence of methylglyoxal, and in absence or presence of the hydroethanolic extract or chloroform fraction or ethyl acetate fraction of the stem of *Siolmatra brasiliensis*, or in the presence of na isolated substance, naringenin. Four experiments were performed using human serum samples: (I) ***in vitro model system of glycation in the presence of glucose***, in which human blood serum was incubated at 37°C for 40 days, and it was evaluated the activities of the antioxidant enzymes (catalase and paraoxonase), biomarkers of lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances), levels of carbonyl content in proteins, estimation of fluorescent AGEs and analysis of structural changes in proteins; (II) ***in vitro model system of glycoxidative changes in the presence of MGO***, to standardize the best concentration of MGO to be used, in which human blood serum was incubated at 37°C for 48 hours in the presence of MGO at concentrations of 5, 10 and 20 mM, for monitoring fluorescent AGEs structural changes in proteins; (III) ***in vitro model system of glycoxidative changes in the presence of MGO and evaluation of the effects of the extract, fraction and isolated substance from Siolmatra brasiliensis stem***, in which human blood serum was incubated at 37°C for 48 hours in presence of 10 mM MGO, and in absence or presence of different concentrations of the hydroethanolic extract (SbExt), chloroform fraction (SbCHCl<sub>3</sub>) of the stem of *Siolmatra brasiliensis*, or isolated substance, naringenin (NAR); at different times, the following analysis were performed: levels of several biochemical markers, formation of fluorescent AGEs, formation of oxidation products of tryptophan and tyrosine residues, levels of carbonyl content in proteins (PCO), analysis of the structural changes in proteins, and arilesterase and lactonase activities of paraoxonase 1. (IV) ***in vitro model system of glycoxidative changes in the presence of MGO and evaluation of the effects of the ethyl acetate fraction from Siolmatra brasiliensis stem***, human blood serum was incubated at 37°C for 48 hours in presence of 10 mM MGO, and in absence or presence of different concentrations of the ethyl acetate fraction (SbAcE) of the stem of *Siolmatra brasiliensis*; at different times, the following

analysis were performed: the levels of several biochemical markers, formation of fluorescent AGEs, formation of oxidation products of tryptophan and tyrosine residues, levels of carbonyl content in proteins (PCO), analysis of the structural changes in proteins, and arylesterase and lactonase activities of paraoxonase 1. In (I) it was possible to observe a gradual increase in the fluorescence intensity of AGEs, changes in the protein structures, progressive increase in PCO levels during the incubation time of serum in the presence of glucose, which were attenuated in the presence of aminoguanidine (anti-AGE prototype agent). In (II) the *in vitro* model system of glycoxidative changes showed a concentration dependent profile related to the formation of fluorescent AGEs and promotion of changes in protein structures. In (III and IV) SbExt, NAR and SbAcE were able to decrease the AGEs formation in incubations having serum + MGO, as well as decreased the formation of oxidation products of tryptophan and tyrosine residues, while SbCHCl<sub>3</sub> was not efficient. In the analysis of the changes in the electrophoretic separation pattern of proteins from serum + MGO, SbExt, SbCHCl<sub>3</sub>, NAR and SbAcE were not effective, either with enzymatic activities of PON 1 (arylesterase and lactonase). Conclusion: In this study, it was possible to observe that, compared to the *in vitro* model system of glycation with blood serum + MGO is more aggressive than model system with blood serum + glucose. The hydroethanolic extract of *Siolmatra brasiliensis* and narigenin, one of the substances isolated from this species, either ethyl acetate fraction seem to attenuate glycoxidative events that occur in more advanced phases.

**Keywords: diabetes mellitus, *in vitro* model systems, advanced glycation products, paraoxonase 1**

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA	Transportador de cassete ligado a ATP A1
ADMA	l-arginina assimétrica
AG	Aminoguanidina
AGE	Produto final de glicação avançada
ALT	Alanina aminotransferase
Apo-A1	Apolipoproteína A1
Arg	Arginina
BCL-2	Proteína de linfoma de células B 2
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
CEL	Carboxietil lisina
CETP	Proteína transferência de ésteres de colesterol
CML	Carboximetil lisina
DHBS	3,5-dicloro-2-hidroxibenenosulfonato de sódio
DHC	Dihidrocoumarina
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2-4, dinitrofenilhidrazina
DSBmT	Disulfobutilmetatoluidina sódica
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HSA	Albumina sérica humana
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IDF	Federação Internacional de Diabetes
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
MGO	Metilglioxal
MODIC	Imidazólio cross-link devirado de metilglioxal
MODY	Maturity-onset diabetes of the young
MOLD	Dímero metilglioxal-lisina

NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, reduzida
NAR	Naringenina
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salina
PCO	Proteína carbonilada
PON 1	Paraoxonase 1
PLTP	Proteína de transferência de fosfolípidos
SbAcE	Fração acetato de etila do extrato hidroetanólico do caule da <i>Siolmatra brasiliensis</i>
SbCHCl <sub>3</sub>	Fração clorofórmica do extrato hidroetanólico do caule da <i>Siolmatra brasiliensis</i>
SbExt	Extrato hidroetanólico do caule da <i>Siolmatra brasiliensis</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com docecil sulfato de sódio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UI	Unidades internacionais
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Níveis de glicose em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> e naringenina. ....	62
<b>Tabela 2.</b> Níveis de proteínas totais em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> e naringenina. ....	65
<b>Tabela 3.</b> Níveis de albumina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> e naringenina. ....	67
<b>Tabela 4.</b> Níveis de ALT em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> e naringenina. ....	70
<b>Tabela 5.</b> Níveis de triglicerídeos em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> e naringenina. ....	73
<b>Tabela 6.</b> Níveis de colesterol total em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> e naringenina. ....	76
<b>Tabela 7.</b> Níveis de HDL-colesterol em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> e naringenina. ....	79
<b>Tabela 8.</b> Níveis de glicose em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE. ....	106
<b>Tabela 9.</b> Níveis de proteínas totais e albumina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE. ....	106
<b>Tabela 10.</b> Níveis de ALT em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE. ....	108
<b>Tabela 11.</b> Níveis de triglicerídeos, colesterol total e HDL-colesterol em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE. ....	111

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Outros tipos de DM.....	20
<b>Figura 2.</b> Glicação proteica e formação de produtos de Amadori.....	22
<b>Figura 3.</b> Formação de AGEs pelas vias de Wolff, Hodge e Namiki.....	23
<b>Figura 4.</b> Estruturas dos compostos dicarbonílicos 3-deoxiglicosona, glioxal e metilglioxal.....	24
<b>Figura 5.</b> AGEs formados a partir de modificações proteicas promovidas pelo metilglioxal.....	26
<b>Figura 6.</b> Estrutura da PON 1.....	33
<b>Figura 7.</b> Substâncias não inéditas isoladas da fração de clorofórmica do extrato hidroetanólico do caule de <i>Siolmatra brasiliensis</i> .....	36
<b>Figura 8.</b> Substâncias inéditas isoladas da fração de acetato de etila do caule de <i>Siolmatra brasiliensis</i> .....	36
<b>Figura 9.</b> Intensidade de fluorescência relativa aos AGEs gerados em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com glicose.....	49
<b>Figura 10.</b> Perfil de separação eletroforética de proteínas séricas em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com glicose.....	51
<b>Figura 11.</b> Níveis de PCO em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com glicose.....	52
<b>Figura 12.</b> Níveis de TBARS em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com glicose.....	53
<b>Figura 13.</b> Atividade da CAT em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com glicose.....	54
<b>Figura 14.</b> Atividade da PON 1 em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com glicose.....	55
<b>Figura 15.</b> Intensidade de fluorescência relativa aos AGEs em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal.....	57
<b>Figura 16.</b> Perfil de separação eletroforética de proteínas séricas em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal.....	59
<b>Figura 17.</b> Intensidade de fluorescência relativa aos AGEs em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> ou naringenina.....	82
<b>Figura 18.</b> Intensidade de fluorescência relativa a N'-formilquinurenina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> ou naringenina.....	84
<b>Figura 19.</b> Intensidade de fluorescência relativa a quinurenina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> ou naringenina.....	86
<b>Figura 20.</b> Intensidade de fluorescência relativa a ditirosina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> ou naringenina.....	89

<b>Figura 21.</b> Níveis de PCO em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> ou naringenina. ....	92
<b>Figura 22.</b> Perfil de separação eletroforética de proteínas séricas em sistema-modelo de glicação <i>in vitro</i> de soro sanguíneo incubado com metilglioxal tratados com SbExt (experimento 2). ....	94
<b>Figura 23.</b> Perfil de separação eletroforética de proteínas séricas em sistema-modelo de glicação <i>in vitro</i> de soro sanguíneo incubado com metilglioxal tratados com SbCHCl <sub>3</sub> (experimento 2). ....	95
<b>Figura 24.</b> Perfil de separação eletroforética de proteínas séricas em sistema-modelo de glicação <i>in vitro</i> de soro sanguíneo incubado com metilglioxal tratados com NAR (experimento 2). ....	96
<b>Figura 25.</b> Atividade de arilesterase da PON 1 em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> ou naringenina. ....	100
<b>Figura 26.</b> Atividade de lactonase da PON 1 em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> ou naringenina. ....	103
<b>Figura 27.</b> Intensidade de fluorescência relativa aos AGEs em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE. ....	113
<b>Figura 28.</b> Intensidade de fluorescência relativa a N'-formilquinurenina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE. ....	114
<b>Figura 29.</b> Intensidade de fluorescência relativa a quinurenina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE. ....	115
<b>Figura 30.</b> Intensidade de fluorescência relativa a ditirosina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE. ....	117
<b>Figura 31.</b> Níveis de PCO em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE. ....	118
<b>Figura 32.</b> Perfil de separação eletroforética de proteínas séricas em sistema-modelo de glicação <i>in vitro</i> de soro sanguíneo incubado com metilglioxal tratados com SbAcE. ....	120
<b>Figura 33.</b> Atividade de arilesterase da PON 1 em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE. ....	122
<b>Figura 34.</b> Atividade de lactonase da PON 1 em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE. ....	124

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	18
2. OBJETIVOS .....	37
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Soro sanguíneo humano .....	38
3.2 Preparação do extrato, frações e isolamento/identificação de metabólitos do caule de <i>Siolmatra brasiliensis</i> .....	39
3.3 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com glicose.....	39
3.4 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilgloxal .....	40
3.5 Determinação dos níveis de marcadores bioquímicos .....	43
3.6 Estimativa de AGEs fluorescentes e análise de modificações estruturais em proteínas .....	45
3.7 Estimativa dos produtos de oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano .....	45
3.8 Avaliação dos níveis de grupos carbonilas em proteínas (PCO) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	46
3.9 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT).....	47
3.10 Determinação da atividade da enzima paraoxonase 1 (PON 1).....	47
3.11 Análise estatística.....	48
4. RESULTADOS .....	49
4.1 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com glicose.....	49
4.2 Estimativa dos AGEs fluorescentes e análise de modificações estruturais em proteínas em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilgloxal .....	55
4.3 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilgloxal e avaliação do potencial anti-AGE de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> e naringenina .....	60
4.4 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilgloxal e avaliação do potencial anti-AGE de SbAcE .....	104
5. DISCUSSÃO .....	125
5.1 Avaliação das alterações glico-oxidativas em sistema-modelo de glicação <i>in vitro</i> com glicose .....	125
5.2 Avaliação das alterações glico-oxidativas em sistema-modelo de glicação <i>in vitro</i> com metilgloxal (experimento 1).....	127
5.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos das alterações glico-oxidativas em sistema-modelo de glicação <i>in vitro</i> com metilgloxal na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> , naringenina (experimento 2), e SbAcE (experimento 3). .....	128

5.4 Estimativa dos AGEs fluorescentes e análise de modificações estruturais em proteínas em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> com metilglioxal na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> , naringenina (experimento 2), e SbAcE (experimento 3).....	130
5.5 Estimativa dos produtos de oxidação de resíduos de triptofano e tirosina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> com metilglioxal na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> , naringenina (experimento 2), e SbAcE (experimento 3).....	132
5.6 Determinação dos níveis de PCO em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> com metilglioxal na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> , naringenina (experimento 2), e SbAcE (experimento 3).....	134
5.7 Determinação de modificações estruturais em proteínas em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> com metilglioxal na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> , naringenina (experimento 2), e SbAcE (experimento 3).....	135
5.8 Determinação atividade enzimática de PON 1 (arilesterase e lactonase) em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> com metilglioxal na presença de SbExt, SbCHCl <sub>3</sub> , naringenina (experimento 2), e SbAcE (experimento 3).....	136
6. CONCLUSÃO .....	137
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	139

## INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada pela deficiência na produção pancreática de insulina ou prejuízos na ação do hormônio em tecidos-alvo, ou ambos os mecanismos, culminando em um conjunto de distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Uma das principais manifestações do DM é a hiperglicemia (TAO, 2015; AMERICAN DIABETES FEDERATION, 2020a). O DM que é considerado a quinta maior causa de morte em países desenvolvidos, o que o torna um sério problema de saúde pública (BANDEIRA et al., 2013). A Federação Internacional de Diabetes (IDF, do inglês *International Diabetes Federation*), em 2019, indicou que 463 milhões de indivíduos possuem DM ao redor do mundo, e estima que haverá aumento de 51% neste número em 2045, alcançando o patamar de 700 milhões de indivíduos acometidos por esta patologia (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

Segundo a sua etiologia, o DM pode ser classificado em: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos de DM.

O DM tipo 1 ocorre por um processo autoimune, o qual promove a destruição de células  $\beta$  pancreáticas, levando a uma deficiência absoluta na produção de insulina. Este tipo de DM é mais comum em crianças e adolescentes, porém pode acometer adultos. Tem sido proposta uma classificação de estagiamento para o DM tipo 1: o estágio 1, que abrange a presença da autoimunidade contra as células  $\beta$  pancreáticas (presença de 2 ou mais auto-anticorpos) em indivíduos que apresentam glicemia normal; estágio 2, onde a glicemia está discretamente aumentada, não caracterizando ainda o DM, com presença da autoimunidade contra as células  $\beta$  pancreáticas; estágio 3, definido como o DM tipo 1 (EIZIRIK et al. 2020; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019; AMERICAN DIABETES FEDERATION, 2020a).

O DM tipo 2 é o tipo mais comum, o qual acomete cerca de 90 a 95% da população diabética. Neste tipo de diabetes, ocorre uma combinação entre resistência à insulina nos tecidos alvo e disfunção das células  $\beta$  pancreáticas, esta última ocorre por mecanismos dependentes de indução de estresse de retículo endoplasmático e de apoptose devido aos aumentos nos níveis de glicose e ácidos graxos livres. Obesidade, sedentarismo, e consumo de alimentos com altos teores calóricos são considerados fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de diabetes. Sem a realização de exames de rotina, esse

o DM tipo 2 pode não ser diagnosticado em sua fase inicial, pois o aumento na glicemia ocorre gradualmente, sem a manifestação de sintomas clássicos da doença (EIZIRIK et al. 2020; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019; AMERICAN DIABETES FEDERATION, 2020a).

O DM gestacional é o tipo de DM diagnosticado a qualquer momento durante a gestação, ocorre mais frequentemente após 24<sup>a</sup> semana. O DM gestacional é uma condição que favorece o aborto espontâneo, pré-eclâmpsia, má formação fetal, hipoglicemia neonatal, e ainda aumenta o risco de a criança desenvolver obesidade, hipertensão e DM tipo 2 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019; AMERICAN DIABETES FEDERATION, 2020b).

Outros tipos de diabetes constituem uma vasta lista que inclui o diabetes monogênico, caracterizado por herança autossômica dominante a qual promove disfunção das células  $\beta$  pancreáticas por alterações genéticas, incluindo o MODY (do inglês: maturity-onset diabetes of the young), bem como outros tipos de DM (Figura 1) (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

**Figura 1.** Outros tipos de DM.

<b>Defeitos genéticos na função da célula <math>\beta</math></b>	MODY 1 (defeitos no gene HNF4A) MODY 2 (defeitos no gene GCK) MODY 3 (defeitos no gene HNF1A) MODY 4 (defeitos no gene IPF1) MODY 5 (defeitos no gene HNF1B) MODY 6 (defeitos no gene NEUROD1) Diabetes neonatal transitório Diabetes neonatal permanente DM mitocondrial Outras
<b>Defeitos genéticos na ação da insulina</b>	Resistência à insulina do tipo A Leprechaunismo Síndrome de Rabson-Mendenhall DM lipotrófico Outras
<b>Doenças do pâncreas exócrino</b>	Pancreatite Pancreatectomia ou trauma Neoplasia Fibrose cística Pancreatopatia fibrocalculosa Outras
<b>Endocrinopatias</b>	Acromegalia Síndrome de Cushing Glucagonoma Feocromocitoma Somatostatina Aldosteronoma Outras
<b>Diabetes induzido por medicamentos ou agentes químicos</b>	Determinadas toxinas Pentamidina Ácido nicotínico Glicocorticoides Hormônio tireoidiano Diazóxido Agonistas $\beta$ adrenérgicos Tiazídicos Interferon $\alpha$ Outras
<b>Infecções</b>	Rubéola congênita Citomegalovírus Outras
<b>Formas incomuns de DM autoimune</b>	Síndrome de Stiff-Man Anticorpos antirreceptores de insulina Outras
<b>Outras síndromes genéticas por vezes associadas ao DM</b>	Síndrome de Down Síndrome de Klinefelter Síndrome de Turner Síndrome de Wolfram Ataxia de Friedreich Coreia de Huntington Síndrome de Laurence-Moon-Biedl Distrofia miotônica Síndrome de Prader-Willi Outras

Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019.

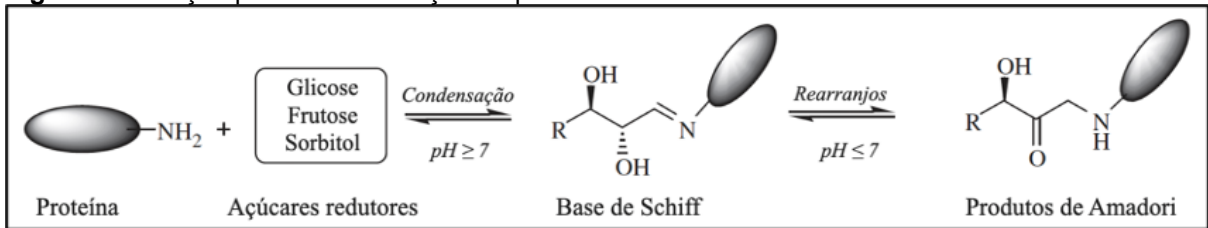
A hiperglicemia crônica é a principal característica observada no DM, a qual contribui para o desenvolvimento e manutenção das complicações micro e macrovasculares da doença. As complicações microvasculares afetam vasos de pequeno calibre de nervos, rins e retina, favorecendo o surgimento de nefropatia, neuropatia e retinopatia diabéticas, respectivamente. As complicações macrovasculares são promovidas principalmente pelo desenvolvimento de doenças oclusivas, incluindo a aterosclerose, favorecendo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (doença arterial periférica, doença coronariana e cerebrovascular). De forma direta ou indireta, a hiperglicemia pode favorecer o agravamento de outras patologias, as quais estão associadas ao sistema musculoesquelético, digestório, bem como a saúde mental, o que torna extremamente importante a realização do controle glicêmico (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020; AMERICAN DIABETES FEDERATION, 2020a; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

As complicações diabéticas microvasculares estão associadas à modificação da estrutura de diversas biomoléculas, principalmente proteínas, através do processo conhecido como glicação ou glico-oxidação (MONNIER; SELL; GENUTH, 2005; RONDEAU et al., 2010). O processo de glicação é uma reação tempo e concentração dependente; desta forma, em indivíduos diabéticos, conforme há o aumento dos níveis glicêmicos e o prolongamento do tempo de exposição aos elevados níveis de glicemia, maior será a produção de produtos advindos da glicação, e conseqüentemente o desenvolvimento das complicações diabéticas (ABBAS et al., 2015).

O processo de glicação proteica é uma reação não enzimática, onde na fase inicial (Figura 2) os grupos amino primários de proteínas condensam-se com grupos carbonila de açúcares redutores (por exemplo glicose, frutose, sorbitol), formando um produto intermediário instável chamado de bases de Schiff, esta reação pode ocorrer em horas até dias. As bases de Schiff são produtos reversíveis e sua formação é dependente da concentração de açúcares redutores, grupos amino e também de pH alcalino. Em seguida, as bases de Schiff sofrem rearranjos e são transformadas em produtos de Amadori; estes rearranjos são dependentes de pH ácido e pode ocorrer no período de dias até semanas. Os produtos de Amadori são compostos relativamente mais estáveis do que as bases de Schiff. Um dos produtos de Amadori mais conhecidos é a

hemoglobina glicada, a qual é utilizada como biomarcador para avaliação clínica que reflete os níveis médios de glicemia nas 8-12 semanas precedentes (TAGHAVI et al., 2017; ABBAS et al., 2015; OTT et al., 2014; LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010).

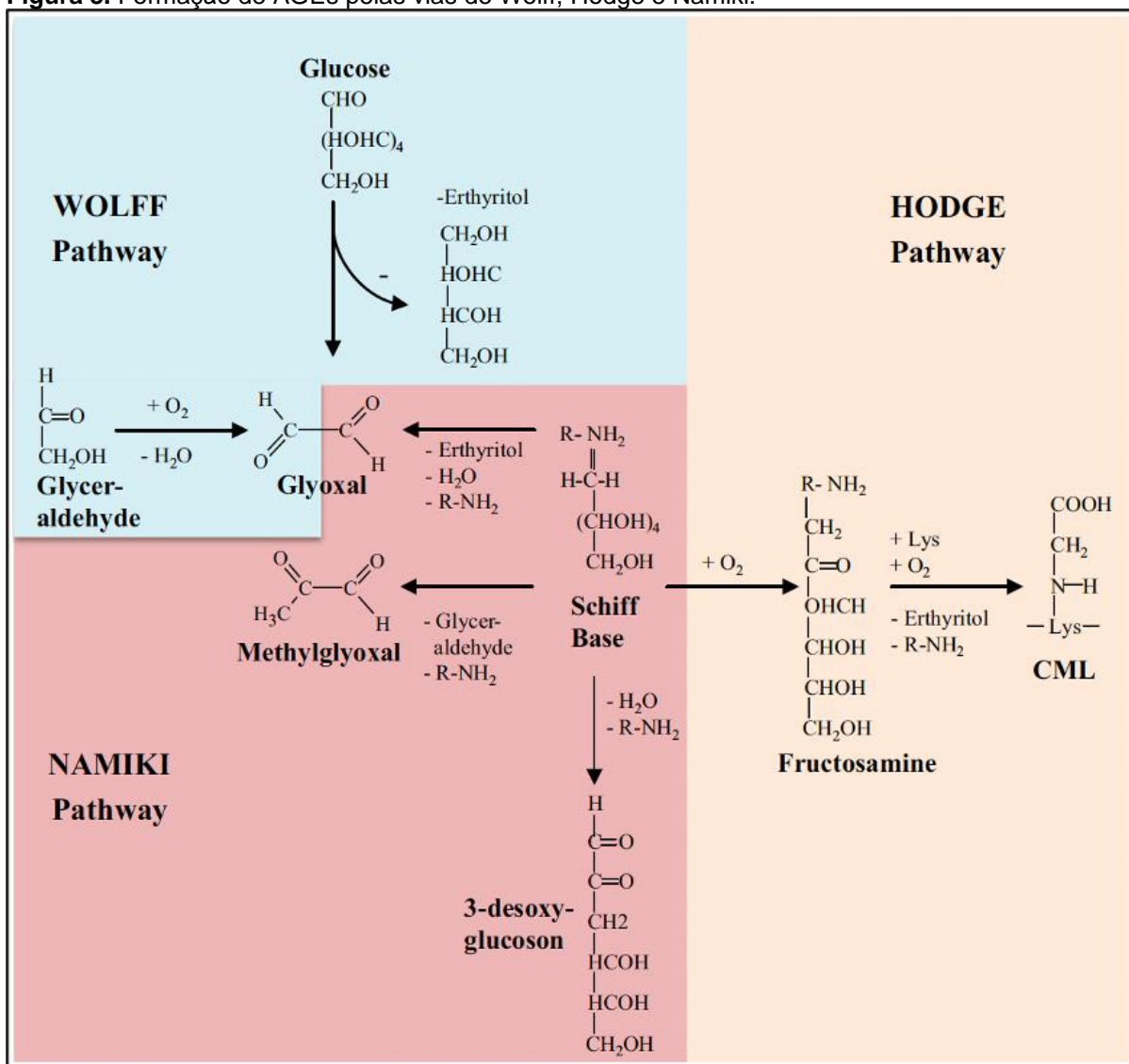
**Figura 2.** Glicação proteica e formação de produtos de Amadori.



Adaptado de: ABBAS et al., 2015; OTT et al., 2014.

No estágio final da glicação são formados os produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês: advanced glycation end products), os quais são produtos irreversíveis que podem ser gerados através de reações oxidativas e não-oxidativas, a partir de intermediários da auto-oxidação da glicose e da peroxidação lipídica, além dos produtos de Amadori (OTT et al., 2014; LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010). A auto-oxidação dos produtos de Amadori pode gerar os AGEs através da via de Hodge (Figura 3), onde processos oxidativos e não-oxidativos favorecem a formação dos AGEs. O surgimento de compostos dicarbonílicos a partir da quebra das bases de Schiff através da via de Namiki (Figura 3), ou da degradação de lipídeos e aminoácidos também contribui para a formação de AGEs, como também a geração de compostos dicarbonílicos a partir da auto-oxidação de monossacarídeos (glicose, frutose, gliceraldeído) através da via de Wolff (Figura 3) (OTT et al., 2014; LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010).

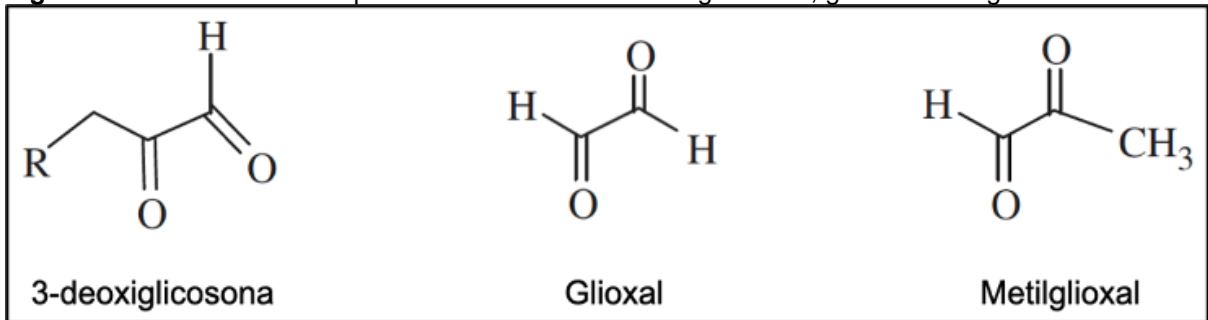
**Figura 3.** Formação de AGEs pelas vias de Wolff, Hodge e Namiki.



Fonte: OTT et al., 2014.

Os compostos dicarbonílicos são substâncias altamente reativas e de baixo peso molecular, dentre eles estão o glicoxal, metilglicoxal, 3-deoxiglicosona (Figura 4), sendo o metilglicoxal (MGO) o principal composto dicarbonílico, sendo altamente reativo (TAGHAVI et al., 2017; OTT et al., 2014; LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010).

**Figura 4.** Estruturas dos compostos dicarbonílicos 3-deoxiglicosona, glioal e metilglioal.



Adaptado de: ABBAS et al., 2015.

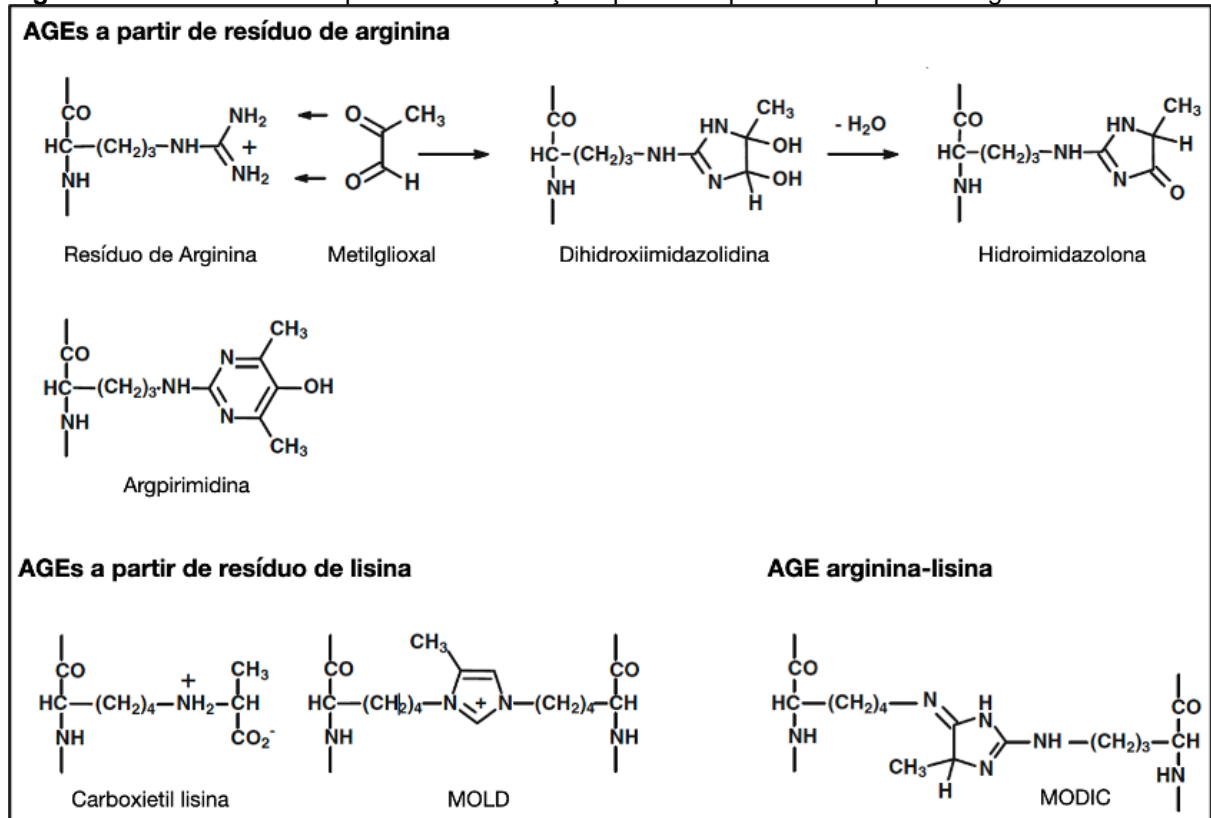
A glicação proteica não é a única via capaz de gerar MGO, ele também poder ser produzido endogenamente e principalmente através da degradação das trioses fosfato, gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato. O MGO também pode ser formado em menor proporção via catabolismo dos corpos cetônicos (oxidação da acetona), e também no catabolismo do aminoácido treonina (oxidação da aminoacetona). Assim, a produção endógena de MGO ocorre dentro da célula, mas uma pequena fração passa para o meio extracelular; desta forma, o MGO contribui para a glicação proteica nos meios intra e extracelular. A concentração de MGO em células e tecidos pode variar de 2 a 4  $\mu\text{M}$ , enquanto no plasma humano está em torno de 100 nM (RABBANI; THORNALLEY, 2014; RABBANI; THORNALLEY, 2012).

O MGO também pode ser encontrado em diversos alimentos e bebidas, dentre eles pães, biscoitos e bolachas, carnes assadas, café, chocolate, mel, cerveja e leite. As alterações promovidas pelo MGO nas estruturas das proteínas destes alimentos e bebidas promovem alterações organolépticas. Na reação de Strecker, ocorre a produção de aldeídos aromáticos, tais como 3-metilbutanal (malte) e fenilacetaldéido (sabor semelhante ao mel) (ZHU et al., 2019; HOFFMANN; SCHIEBERLE, 2000).

Quando em sua forma livre, o MGO é altamente instável e reativo, apresenta curto tempo de vida biológica (RABBANI; THORNALLEY, 2014). Ele é capaz de reagir com resíduos de aminoácidos, bem como com bases nitrogenadas do tipo guanina em nucleotídeos e nucleosídeos (RABBANI; THORNALLEY, 2015; THORNALLEY et al., 2010). O aumento na concentração de MGO favorece modificações na estrutura de diversas macromoléculas, com subsequente inibição da replicação e dano do DNA, o que irá contribuir no estabelecimento de toxicidade celular com consequente apoptose (ZHU et al., 2019; SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2014).

O MGO pode promover modificações na estrutura proteica ao reagir com resíduos de arginina, cisteína e lisina. O MGO reage de forma irreversível com resíduos de arginina presentes nas proteínas, formando a arg-pirimidina e hidroimidazolona (Figura 5), este último tem maior importância por representar cerca de 90% dos AGEs formados na reação de MGO com resíduos de aminoácidos (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020; RABBANI; THORNALLEY, 2012; RABBANI; THORNALLEY, 2015). Resíduos de arginina geralmente estão em domínios funcionais das proteínas, bem como também resíduos de lisina. Desta forma, processos de modificação pós-traducional envolvendo carboidratos e compostos dicarbonílicos sobre estes resíduos de aminoácidos podem promover perda da funcionalidade da proteína, e conseqüentemente, culminar em danos funcionais em diversos tipos de tecidos (RABBANI; THORNALLEY, 2014). O MGO também pode reagir irreversivelmente com resíduos de lisina e gerar os AGEs carboxietil-lisina, carboximetil-lisina e dímero metilglioxal-lisina (MOLD, do inglês *methylglyoxal-lisine dimer*), e também promover *cross-linking* entre resíduos de lisina e arginina e formar o AGE denominado imidazólio *cross-link* derivado de metilglioxal (MODIC, do inglês *methylglyoxal-derived imidazolium cross-link*) (Figura 5) (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020; RABBANI; THORNALLEY, 2012; RABBANI; THORNALLEY, 2015). Diferente do que acontece com os resíduos de arginina e lisina, a reação do MGO com resíduos de cisteína é reversível, a qual produz um hemitioacetal (RABBANI; THORNALLEY, 2012; RABBANI; THORNALLEY, 2015).

**Figura 5.** AGEs formados a partir de modificações proteicas promovidas pelo metilglicoxal.



Adaptado de: RABBANI; THORNALLEY, 2012.

O MGO pode modificar a estrutura da proteína albumina; a albumina humana sérica sofre alteração em sua estrutura principalmente em resíduos de arginina, sendo o resíduo Arg-410 o principal sítio de alteração, enquanto resíduos Arg-114, Arg-186, Arg-218 e Arg-428 podem sofrer alterações pelo MGO com menor frequência. Esta modificação na albumina é capaz de inibir suas atividades antioxidante e de esterase, diminuir sua capacidade de interação com fármacos e induzir a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos, tais como TNF $\alpha$  e interleucina-1 $\beta$  (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020). O colágeno é uma proteína extracelular capaz de ser modificada pelo MGO; resíduos de arginina presentes no colágeno tipo IV da membrana basal vascular, quando modificados por MGO, contribuem para a diminuição na capacidade de ligação do colágeno à integrina, promovendo o destacamento de células endoteliais da parede vascular e inibição da angiogênese (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020). Proteínas intracelulares também podem sofrer alterações estruturais promovidas pelo MGO, incluindo proteínas mitocondriais, mais

frequentemente componentes do complexo III da cadeia transportadora de elétrons, o que contribui para o estresse oxidativo (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020).

A relação entre o MGO e o desenvolvimento de complicações macrovasculares em indivíduos diabéticos envolve o processo de disfunção endotelial. O MGO inibe a vasodilatação, bem como promove perda de células endoteliais e assim danos às paredes vasculares, além de favorecer a instalação de estresse oxidativo. Modificações de resíduos de arginina por MGO formam os adutos MGO-arginina, os quais possuem estrutura semelhante à dimetil-arginina assimétrica (ADMA, do inglês: asymmetric dimethylarginine), a qual atua como inibidora de enzima óxido nítrico sintase, forma endotelial (eNOS). Assim, os adutos MGO-arginina ao inibirem eNOS, contribuem para a diminuição na produção de óxido nítrico, além de contribuir para o aumento na produção de ânion superóxido, favorecendo a vasoconstrição e a instalação do estresse oxidativo. O MGO também contribui para o desenvolvimento de aterosclerose ao promover aumento na expressão de moléculas de adesão endoteliais (VCAM-1 e ICAM-1) (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020).

O MGO também se encontra envolvido no estabelecimento das complicações microvasculares no DM. O MGO pode contribuir no desenvolvimento da nefropatia diabética, pois o MGO, bem como os AGEs formados a partir da interação do MGO com grupos amino em proteínas, favorecem o aumento da permeabilidade dos capilares do glomérulo, através da perda da interação de células endoteliais com os podócitos (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020). Quanto ao desenvolvimento de retinopatia diabética, o MGO prejudica os mecanismos de regulação do fluxo sanguíneo na retina e favorece a ocorrência de apoptose em pericitos (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020). Em relação à neuropatia diabética, o MGO altera a viabilidade de células neuronais por promover *downregulation* da proteína anti-apoptótica (BCL-2). O MGO também é capaz de promover a despolarização de neurônios sensoriais, e induzir modificações em resíduos de arginina de proteínas que constituem os canais de sódio voltagem-dependente, o que pode provocar hiperalgesia mecânica (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020).

Uma vez que possuem diversos precursores, incluindo o MGO, os AGEs constituem um grupo heterogêneo de compostos com uma grande complexidade

estrutural (OTT et al., 2014). Os AGEs identificados até o momento encontram-se classificados em 4 grupos, de acordo com sua estrutura química e a habilidade de emitir fluorescência.: 1) AGEs fluorescentes e *cross-linked* (exemplo: pentosidina, vesperlisina, vesperlisina A e vesperlisina C, entre outros); 2) AGEs não fluorescentes e não *cross-linked* (exemplo: carboxietil-lisina, carboximetil-lisina, pirralina e imidazolonas); 3) AGEs não fluorescentes e *cross-linked* (exemplo: MOLD, MODIC, entre outros); 4) AGEs fluorescentes e não *cross-linked* (exemplo: arg-pirimidina) (PERRONE et al., 2020, TAGHAVI et al., 2017).

Diversos estudos têm mimetizado os efeitos da hiperglicemia especialmente na promoção de glicação proteica, via utilização de sistemas-modelo *in vitro* de glicação proteica. Nestes sistemas-modelo, é realizada a incubação de uma determinada proteína com açúcares ou metabólitos precursores de AGEs. Frequentemente é utilizada como matriz proteica a albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) ou albumina sérica humana (HSA, do inglês *human serum albumin*). Dentre os carboidratos mais utilizados estão a glicose e a frutose, já dentre os compostos dicarbonílicos estão o MGO (ARASTEH et al. 2014). Outras matrizes proteicas podem ser utilizadas, tais como imunoglobulina G (VRDOLJAK et al., 2014), mioglobina (ROY et al., 2010). O colágeno tem sido usado nos sistema-modelo de glicação proteica com o objetivo de avaliar alterações estruturais e funcionais advindas da formação de *cross-linking* entre as proteínas (CHITHRA et al., 1998).

Normalmente as incubações de biomoléculas nos sistemas-modelo *in vitro* de glicação proteica são conduzidas em meio tamponado, no qual é adicionado um conservante (azida sódica), estabelece-se temperatura constante de 37°C e tempo de incubação que pode variar de minutos a meses (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2014; PAMPATI et al., 2011). Após as incubações, as amostras são avaliadas quanto aos marcadores do estresse glico-oxidativo e alterações na estrutura e/ou função destas proteínas, através diversos ensaios analíticos (MEEPROM et al., 2013; RONDEAU et al., 2010).

Dentre os biomarcadores mais frequentemente avaliados nos sistemas-modelo de glicação proteica, encontram-se os AGEs fluorescentes, geralmente utilizando-se comprimentos de onda de excitação e de emissão de 350 e 440 nm, respectivamente, os

quais contemplam principalmente os AGEs fluorescentes vesperlisinas A, B e C. Estudos que utilizam preparações de origem natural ou compostos bioativos isolados em sistemas-modelo de glicação proteica realizam a estimativa de AGEs fluorescentes e determinam a porcentagem de inibição na formação de AGEs, comparando os níveis de AGEs de incubações na ausência ou na presença de substâncias ou preparações com potencial efeito antiglicação (MEEPROM et al., 2013; SERÓ et al., 2013).

Nos sistemas-modelo de glicação proteica, também é possível avaliar os níveis de grupos carbonil em proteínas (PCO), o qual é um marcador de dano oxidativo em proteínas (LEVINE et al., 1994). Com a finalidade de realizar investigações na alteração da estrutura de proteínas ou verificação do *cross-linking* proteico devido à presença de monossacarídeos ou compostos dicarbonílicos, uma das estratégias utilizadas é a realização de separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE, do inglês: *polyacrilamide gel electrophoresis*) ou separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida com docecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês: *sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*) e utilização de um corante de proteína para visualizar os fragmentos proteicos e/ou perda da integridade de bandas (HSIA et al., 2016). Por fim, durante a incubação de proteínas com monossacarídeos ou compostos dicarbonílicos, ocorrem modificações em resíduos de aminoácidos das proteínas, gerando produtos de oxidação de resíduos de tirosina (ditirosina) e triptofano (N'-formilquinureina e quinurenina), sendo possível realizar a quantificação destes produtos via espectrofluorimetria (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2014)

Muitos estudos realizam investigações dos efeitos da glicação proteica, conduzindo incubações com proteínas séricas de forma isolada. Porém poucos são os estudos que utilizam o soro sanguíneo humano em sistemas-modelo *in vitro* de glicação, para avaliar as modificações estruturais de componentes séricos (MORAIS et al., 2013; SATTARAGMANDY et al., 2011; JURETIĆ et al., 1990).

O soro sanguíneo humano é uma matriz complexa constituída por diversas macromoléculas, as quais são susceptíveis a alterações providas pela glicação ou modificações por precursores de AGEs, e tem sido muito pouco estudado em sistemas-modelo *in vitro* de estresse glico-oxidativo. Em estudo de Moraes e colaboradores (2013), foi utilizado soro humano como matriz para avaliar os impactos da glicação *in vitro*, sendo

realizadas incubações contendo diferentes açúcares (frutose, manose, maltose, galactose ou sacarose) por período de 7 ou 10 dias, com o intuito de descrever um método de detecção e identificação de proteínas glicadas via eletroforese com a utilização de ácido burônico e fluoróforo. Os autores conseguiram observar a glicação de proteínas nas diferentes condições de incubação, tornando interessante a utilização deste sistema-modelo na identificação de potenciais biomarcadores de complicações relacionadas à hiperglicemia (MORAIS et al., 2013). Outro estudo utilizando soro humano incubado com glicose, utilizou ácido acetilsalicílico (puro ou microencapsulado) para avaliar o seu potencial efeito inibitório sobre a glicação; os autores conseguiram observar a inibição da glicação das proteínas séricas principalmente nas amostras onde foram adicionadas ácido acetilsalicílico microencapsulado (JURETIĆ et al., 1990).

A proteína mais abundante presente no soro humano é a albumina, a qual representa 60% do conteúdo proteico presente no soro sanguíneo em indivíduos saudáveis (ANGUIZOLA et al., 2013; RONDEAU; BOURDON, 2011). Ela é uma proteína de baixo peso molecular (66,7 kDa), constituída por uma cadeia polipeptídica contendo 585 resíduos de aminoácidos e 17 pontes dissulfeto. A albumina pode sofrer processos de glicação, portanto contribuir para a formação de AGEs; as localizações da proteína que têm potencial para sofrer processos de glicação são: 59 resíduos de lisina, 24 resíduos de arginina e a região N-terminal (ANGUIZOLA et al., 2013).

Diversas funções biológicas importantes são atribuídas à albumina, destacando-se atividade antioxidante, controle da pressão oncótica, capacidade de transportar inúmeros compostos endógenos e exógenos, incluindo fármacos. A albumina é capaz de se ligar temporariamente a diversos fármacos, contribuindo para o armazenamento e controle da disposição dessas moléculas, prevenindo sua rápida metabolização e/ou toxicidade; portanto, a albumina é importante na disposição cinética de diversos fármacos (BARAKA-VIDOT et al., 2015; ANGUIZOLA et al., 2013). Alterações promovidas por glicação podem fazer com que a albumina perca sua funcionalidade, culminando em diversos prejuízos ao organismo.

Crescem as evidências dos impactos do estresse glico-oxidativo sobre lipoproteínas séricas, contribuindo para estabelecimento e progressão de doenças cardiovasculares. O MGO pode modificar a lipoproteína de baixa densidade (LDL, do

inglês: *low density lipoprotein*), promovendo modificações em sua estrutura, tornando-a aterogênica. Ainda não há evidências dos impactos do MGO sobre lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL, do inglês: *very low density lipoprotein*) (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020). Porém, sabe-se que o MGO é capaz de promover modificações na estrutura da lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês: *high density lipoprotein*), tais como aumento de sua densidade, redução da estabilidade e da meia-vida (RABBANI; THORNALLEY, 2015)

Dentre as lipoproteínas séricas, a HDL é a que apresenta menor tamanho, em torno de 6 a 12,5 nanômetros. Aproximadamente 55% da sua estrutura é constituída por proteínas, as quais podem ser divididas em 4 grupos, sendo apolipoproteínas, enzimas, proteínas de transferência de lipídeos, e proteínas com outras funções (EREN et al., 2012). A síntese da HDL se inicia pela síntese da apolipoproteína A-I (Apo-AI), no fígado e intestino. Ao ser lançada na circulação, a HDL tem como principal função a retirada do colesterol em excesso dos tecidos extra-hepáticos. Assim, ao alcançar os tecidos extra-hepáticos, a HDL conta com a participação da proteína transportadora ABCA1 (do inglês: *ATP-binding cassette transporter A1*) para o processo de transferência do colesterol e fosfolipídeos dos tecidos para a Apo-AI, formando a HDL pré-beta. Para que esse processo ocorra de forma eficiente, a enzima lecitina-colesterol aciltransferase presente na HDL (LCAT, do inglês: *lecithin-cholesterol acyltransferase*) promove a conversão de colesterol livre em ésteres de colesterol, os quais são conduzidos para o centro hidrofóbico da HDL (GUGLIUCCI; MENINI, 2015). A HDL, agora carregada de ésteres de colesterol, retorna ao fígado, onde via o receptor SR-BI (receptor sequestrador classe B tipo 1) ocorrerá a entrega dos ésteres de colesterol para o fígado, e a HDL “descarregada” volta à circulação para recolher outras moléculas de colesterol. Esse processo é conhecido como transporte reverso do colesterol.

Ainda na estrutura da HDL existem outras proteínas importantes no metabolismo dessa lipoproteína, incluindo a proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP, do inglês: *cholesteryl ester transfer protein*), a qual é responsável por promover a transferência de ésteres de colesterol e triglicerídeos entre HDL, VLDL e LDL, e a proteína de transferência de fosfolipídeos (PLTP, do inglês: *phospholipid transfer protein*), capaz de promover a transferência de fosfolipídeos entre VLDL e HDL. Por fim, o

metabolismo da HDL conta com a participação de duas lipases, uma endotelial e outra hepática, sendo a lipase endotelial responsável por promover o remodelamento da HDL em pequenas partículas, enquanto a lipase hepática é mais eficiente na hidrólise de triglicerídeos (GUGLIUCCI; MENINI, 2015).

A HDL encontra-se associada à redução tanto do risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares quanto da mortalidade por estas doenças, por apresentar propriedade antiaterogênica. Esta propriedade pode estar relacionada ao 1) transporte reverso de colesterol; 2) efeitos antioxidantes, ao inibir diretamente a oxidação de LDL ou outros alvos contendo fosfolípidos; 3) efeito antitrombótico, via inibição da agregação plaquetária, reduzindo os níveis do fator von Willebrand e melhorando as atividades das proteínas C e S ativadas (EREN et al., 2012).

Evidências indicam que o MGO e outros compostos dicarbonílicos promovem modificações na estrutura da HDL em aproximadamente 4,5% de todo conteúdo de HDL presente no organismo de indivíduos com DM tipo 2; assim, funções importantes executadas pela HDL podem estar sendo prejudicadas, o que poderá contribuir para aumentar o risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em diabéticos (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020).

Outras proteínas também podem sofrer glicação, incluindo a insulina e determinadas enzimas. Em relação aos impactos da glicação de enzimas, estas podem sofrer alterações em suas estruturas conformacionais e/ou sítio de ligação, diminuindo a ação da enzima, ou até mesmo inativando-as (GONZÁLES et al., 2019; TAGHAVI et al., 2017; ABBAS et al., 2015). Dentre as enzimas que podem ter suas ações prejudicadas pela glicação, a paraoxonase merece destaque, por apresentar relação com o desenvolvimento da aterosclerose e conseqüentemente das doenças cardiovasculares; estas condições encontram-se entre as principais complicações observadas no DM (MURILLO-GONZÁLEZ et al. 2020; AMERICAN DIABETES FEDERATION, 2020a).

A paraoxonase (PON) é uma enzima capaz de promover a hidrólise de compostos organofosfatos e pesticidas, incluindo o paraoxon, substância essa que inspirou o nome da enzima. A PON é uma família de enzimas, a qual é constituída por 3 diferentes tipos, paraoxonase 1 (PON 1), paraoxonase 2 (PON 2) e paraoxonase 3 (PON 3) (PRÉCOURT et al., 2011). PON 1 e PON 3 são glicoproteínas que possuem peso molecular de 43 a

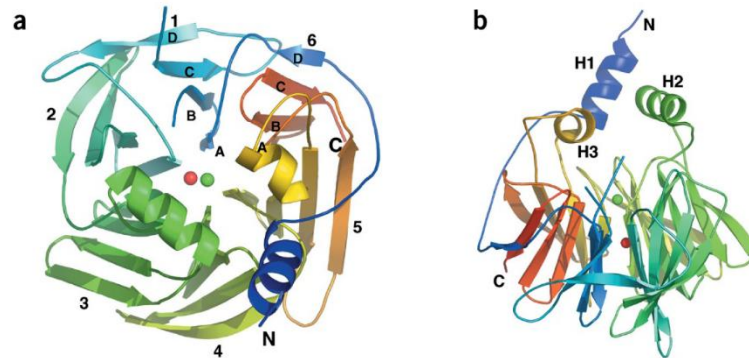
45 kDa, respectivamente, e são expressas em diversos tecidos, sendo sintetizadas principalmente no fígado. Na circulação, encontram-se associadas à lipoproteína HDL, porém está também em menor quantidade associada à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *very low density lipoprotein*) e aos quilomicrons, mas não com lipoproteínas baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*). O principal componente proteico da estrutura da HDL, a apolipoproteína A-1, não é necessária para que ocorra a associação da PON 1 a HDL, porém ela contribui para a estabilidade da atividade enzimática da PON 1 quando associada à HDL (CHISTIAKOV et al., 2017; GUGLIUCCI et al., 2014). Em relação à PON 2, pouco se sabe a respeito de suas funções, e diferente dos outros tipos de paraoxonase, esta não está associada à HDL na corrente sanguínea, tem peso molecular entre 40 a 43 kDa, e é expressa em diversos tecidos, incluindo pulmão, fígado, coração, intestino e também em células do endotélio vascular (PRÉCOURT et al., 2011).

A PON 1 é o tipo mais estudado; possui 354 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 43 kDa. A extremidade N-terminal, a qual é altamente hidrofóbica, é responsável por ancorar a proteína à HDL, sendo 3 resíduos de aminoácidos principalmente estão envolvidos nesta ancoragem (Leu-9, Tyr-185 e Tyr-293). A PON 1 é constituída principalmente por um domínio estrutural do tipo todo  $\beta$ , com seis sequências peptídicas contendo cada uma 4 folhas  $\beta$  antiparalelas (Figura 6). Existem 3 resíduos de cisteína presentes em sua estrutura (Cys-42, Cys-284 e Cys-353); na folha  $\beta$  6D está o resíduo Cys-42, e na folha  $\beta$  6C está o resíduo Cys-353, os quais se ligam via ponte dissulfeto, promovendo o fechamento da estrutura da enzima. Se qualquer um destes dois resíduos de cisteína (Cys-42 e Cys-353) forem substituídos por um resíduo de alanina, a enzima poderá perder sua atividade catalítica, enquanto alterações no resíduo Cys-284 por resíduos de alanina ou de serina diminuirão sua atividade enzimática (CHISTIAKOV et al., 2017; HAREL et al., 2004).

Há dois íons cálcio no centro da estrutura da PON 1; um deles está localizado próximo à extremidade superior do domínio todo  $\beta$ , e participa da atividade catalítica da enzima, enquanto outro íon, mais central, participa da estabilização da estrutura da enzima. A retirada de íons cálcio pode promover uma perda irreversível da atividade enzimática e desestabilização estrutural. A reposição de outros cátions divalentes (íons

magnésio ou zinco) em substituição ao cálcio é capaz de manter a estabilidade da enzima, mas não sua atividade (CHISTIAKOV et al., 2017; HAREL et al., 2004).

**Figura 6.** Estrutura da PON 1.



Na figura a) visão superior da enzima; b) visão lateral da enzima. Fonte: HAREL et al., 2004.

A PON 1 apresenta polimorfismo, o qual pode alterar a expressão proteica e a expressão gênica da enzima, conseqüentemente alterar a concentração da enzima, bem como a atividade enzimática. Os polimorfismos mais comuns são: Q192R e L55M. No polimorfismo Q192R, um aminoácido glutamina é substituído por um aminoácido arginina, e não há alteração na concentração da enzima, mas há um aumento na atividade enzimática. No polimorfismo L55M, há um aumento nos níveis de RNA mensageiro, conseqüentemente aumento na concentração da enzima (PRÉCOURT et al., 2011).

Em termos de atividade biológica, a PON 1 possui diferentes substratos, sendo sua atividade enzimática definida pelo substrato utilizado. A PON 1 apresenta uma atividade de paraoxonase ao promover a hidrólise de inseticidas organofosforados (paraoxon). Também possui uma atividade de arilesterase, na qual o fenilacetato é o melhor substrato, e ainda demonstra ter atividade de lactonase, por realizar a hidrólise de diversas lactonas (PRÉCOURT et al., 2011).

Indivíduos diabéticos podem apresentar uma menor atividade enzimática de PON 1, em comparação a indivíduos saudáveis. Uma menor atividade de PON 1 no soro de indivíduos diabéticos contribui para que sua atividade antioxidante fique prejudicada, fazendo com que a HDL se torne não funcional, favorecendo assim o desenvolvimento de aterosclerose. A PON 1 é uma enzima suscetível à glicação, e esta modificação pode diminuir sua atividade enzimática em aproximadamente 40%. Além disso, uma vez glicada, PON 1 torna-se incapaz de inibir a adesão de monócitos em células endoteliais,

fator este que também contribui para o desenvolvimento de aterosclerose (SHOKRI et al., 2020; YU et al., 2017).

A hiperglicemia crônica presente no DM não controlado contribui para que ocorra o processo de glicação de biomoléculas, formação de compostos dicarbonílicos e subsequente aumento na formação de AGEs, os quais promovem prejuízos na função de diversas macromoléculas, favorecendo a instalação das complicações diabéticas. Mediante isso, torna-se interessante a busca por preparações ou por compostos bioativos capazes de inibirem ou bloquearem o processo de glicação, com a finalidade de minimizar as complicações diabéticas. Fitoquímicos ou preparações de origem natural tendem a apresentar menor toxicidade e menos efeitos colaterais quando comparados aos compostos sintéticos. O interesse no uso de preparações ou substâncias de origem natural tem aumentado especialmente como terapia complementar (YOUNUS; ANWAR, 2016; BORGES et al., 2008).

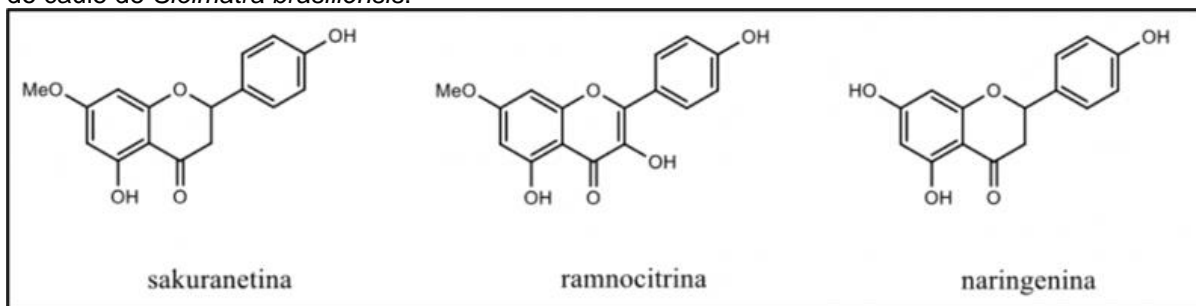
A *Siolmatra brasiliensis* (Cogn.) Bail é uma espécie vegetal do tipo trepadeira, pertencente à família Cucurbitaceae, frequentemente encontrada no Cerrado e no Pantanal Matogrossense do Brasil, popularmente conhecida por “taiuiá” ou “cipó-tauá”. A população destas regiões brasileiras tem o costume de utilizar preparações do caule de *Siolmatra brasiliensis* devido às suas propriedades antidiabética, analgésica e antiúlcera (LIMA et al., 2006).

Nosso grupo de pesquisa tem avançado nos estudos com *Siolmatra brasiliensis* em relação a sua atividade antidiabética. Utilizando sistema-modelo *in vivo* de DM tipo 1 (ratos com DM induzido pela administração do fármaco diabetogênico estreptozotocina), estudou-se o efeito do tratamento crônico com extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis*. Ratos diabéticos tratados durante 21 dias com o extrato de *Siolmatra brasiliensis* (doses de 250 e 500 mg/kg) apresentaram diminuição significativa na glicemia e glicosúria, especialmente na dose de 250 mg/kg, quando comparados aos animais diabéticos não tratados. Outros efeitos benéficos *in vivo* do tratamento com *Siolmatra brasiliensis* foram observados, incluindo menor perda de peso corporal e aumento no conteúdo de glicogênio hepático de ratos diabéticos (DOS SANTOS et al., 2016).

Avanços também foram conquistados em relação ao potencial antiglicação do extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis*, bem como das frações provenientes deste extrato (fração acetato de etila e fração clorofórmica). Utilizando sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* (incubação de BSA na presença de glicose durante 30 dias), dos Santos e colaboradores (2019) observaram que o extrato hidroetanólico e a fração acetato de etila de *Siolmatra brasiliensis* foram capazes de inibir a formação de AGEs fluorescentes, bem como promover diminuição na formação do *cross-linking* proteico e na oxidação de resíduos de triptofano e tirosina. Em relação à fração clorofórmica de *Siolmatra brasiliensis*, foi possível observar sua capacidade em diminuir a formação de AGEs fluorescentes e também o *cross-linking* proteico. Desta forma, torna-se interessante o avanço dos estudos com *Siolmatra brasiliensis*, uma vez que essa espécie, além de diminuir a hiperglicemia em sistema-modelo *in vivo* de DM, também parece apresentar substâncias com significativo potencial em diminuir a formação de AGEs e a combinação desses efeitos pode indicar essa espécie como uma opção terapêutica promissora para ser usada com o intuito de prevenir e/ou atenuar o desenvolvimento das complicações diabéticas promovidas pelo estresse glico-oxidativo.

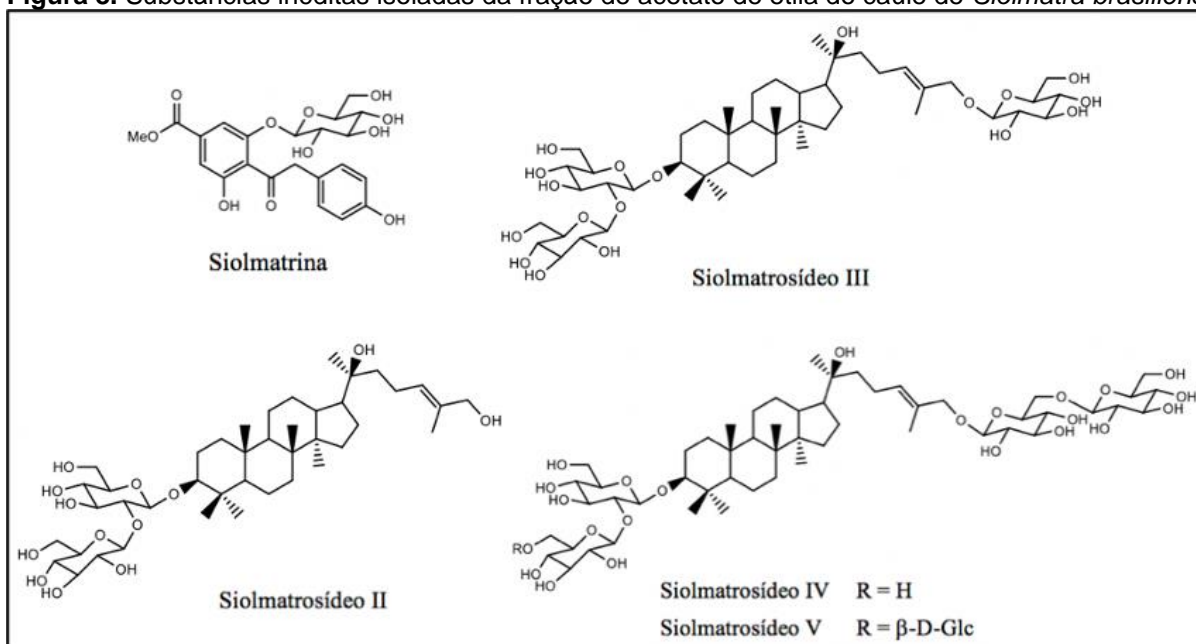
Ainda no estudo de DOS SANTOS et al. (2019), foi possível realizar a identificação de algumas substâncias (conhecidas e inéditas) isolados a partir das frações acetato de etila e clorofórmica do caule de *Siolmatra brasiliensis*. Na fração clorofórmica foram identificadas substâncias já descritas em literatura (Figura 7). Já as substâncias identificadas a partir da fração acetato de etila são inéditas (Figura 8) e pouco se sabe sobre seus potenciais em inibir processos glico-oxidativos *in vitro*.

**Figura 7.** Substâncias não inéditas isoladas da fração de clorofórmica do extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis*.



Adaptado de: DOS SANTOS et al., 2019.

**Figura 8.** Substâncias inéditas isoladas da fração de acetato de etila do caule de *Siolmatra brasiliensis*.



Adaptado de: DOS SANTOS et al., 2019.

Considerando os resultados promissores apresentados nos estudos que demonstraram o potencial antidiabético *in vivo* e anti-glicação / anti-AGE *in vitro* de *Siolmatra brasiliensis*, torna-se interessante a continuidade dos estudos relacionados aos esclarecimentos do potencial anti-AGE *in vitro* desta espécie vegetal. Conduzimos no presente estudo essa investigação em uma amostra biológica mais complexa, o soro sanguíneo, o qual mimetiza um ambiente de glicação mais próximo ao fisiológico, porém, pouco estudado. Considerando também o isolamento e a identificação de substâncias presentes no caule de *Siolmatra brasiliensis*, principalmente as substâncias inéditas, o estudo torna-se ainda mais interessante, com a possibilidade de esclarecer se alguma dessas substâncias participa dos efeitos anti-AGE *in vitro* anteriormente demonstrados para extrato e frações.

## 6. CONCLUSÃO

No sistema-modelo de glicação *in vitro* de soro sanguíneo humano com glicose, investigações para a determinação de marcadores, tais como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e atividade enzimática da catalase (através da reação com Purpald), não são possíveis de serem realizados. Para avançar nos estudos destes marcadores nesse sistema-modelo de glicação *in vitro*, faz-se necessário o aprimoramento na metodologia analítica ou a utilização de uma nova metodologia, uma vez que o emprego de MGO no soro sanguíneo pode apresentar as mesmas complicações observadas com a glicose. Ainda neste estudo foi possível verificar a diferença na severidade entre os sistemas-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* (glicose vs metilglioxal), e observar o efeito do MGO em diferentes concentrações.

Após padronização das condições ideais para o estudo do potencial anti-AGE de substâncias ou preparações em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* utilizando soro sanguíneo humano e MGO, foi possível observar os efeitos do extrato bruto hidroetanólico, fração clorofórmica, substância isolada (naringenina) e fração acetato de etila do caule de *Siolmatra brasiliensis*. SbExt demonstrou ser capaz de diminuir a formação de AGEs e de produtos de oxidação dos resíduos de triptofano e tirosina, sugerindo que esse extrato é capaz de atenuar modificações glico-oxidativas em estágios mais avançados desse processo. Já a fração SbCHCl<sub>3</sub> não foi capaz de atenuar os danos glico-oxidativos promovidos pelo MGO, talvez pelo fato de possuir substâncias que atuem preferencialmente em fases iniciais do processo de glicação, anteriores à geração de compostos dicarbonílicos. A naringenina, substância isolada presente em *Siolmatra brasiliensis*, atenuou os danos glico-oxidativos promovidos pelo MGO em soro sanguíneo humano, porém ao analisar os espectros de absorção, os resultados devem ser analisados com maior cautela. SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e NAR não foram capazes de promover. Por fim, a fração SbAcE demonstrou diminuir a formação de AGEs e atenuar de forma discreta os danos glico-oxidativos em estágio mais avançado do processo de glicação. Todas as preparações provenientes do caule da *Siolmatra brasiliensis*, não demonstraram promover alterações na atividade enzimática da PON 1 (arilesterase e lactonase).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, G.; AL-HARRASI, A. S.; HUSSAIN, H.; HUSSAIN, J.; RASHID, R.; CHOUDHARY, M.I. Antiglycation therapy: Discovery of promising antiglycation agents for the management of diabetic complications. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 2, p. 198-206, 2015.

ALAMINOS-CASTILLO, M. Á.; HO-PLAGARO, A.; GARCÍA-SERRANO, S.; SANTIAGO-FERNANDEZ, C.; RODRÍGUEZ-PACHECO, F.; GARRIDO-SANCHEZ, L.; RODRIGUEZ, C.; VALDES, S.; GONZALO, M.; MORENO-RUIZ, F. J.; RODRÍGUEZ-CAÑETE, A.; MONTIEL-CASADO, C.; GARICA-FUENTES, E. Increased PON lactonase activity in morbidly obese patients is associated with impaired lipid profile. **International Journal of Clinical Practice**, v. 73, n. 6, e13315, 2019.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes - 2020. **Diabetes Care**, v. 43, Suppl 1, p. S14-S31, 2020a.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes - 2020. **Diabetes Care**, v. 43, Suppl 1, p. S183-S192, 2020b.

ANGUIZOLA, J.; MATSUDA, R.; BARNABY, O. S.; HOY, K. S.; WA, C.; DEBOLT, E.; KOKE, M.; HAGE, D. S. Glycation of human serum albumin. **Clinica Chimica Acta**, v. 425, p. 64-76, 2013.

ANNADURAI, T.; MURALIDHARAN, A. R.; JOSEPH, T.; HSU, M. J.; THOMAS, P. A.; GERALDINE, P. Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin–nicotinamide-induced experimental diabetic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 68, n. 3, p. 307-318, 2012.

ARASTEH, A.; FARAHI, S.; HABIBI-REZAEI, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. 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. 9, 2014.

ARGIROVA, M.; BREIPOHL, W. Comparison between modifications of lens proteins resulted from glycation with methylglyoxal, glyoxal, ascorbic acid, and fructose. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 140-145, 2002.

ASSIS, R. P.; ARCARO, C. A.; GUTIERRES, V. O.; OLIVEIRA, J. O.; COSTA, P. I.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Combined effects of curcumin and lycopene or bixin in yoghurt on inhibition of LDL oxidation and increases in HDL and paraoxonase levels in streptozotocin-diabetic rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 332, 2017.

BAKALA, H.; HAMELIN, M.; MARY, J.; BOROT-LALOI, C.; FRIGUET, B. Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 10, p.1527-1534, 2012.

BANDEIRA, S.M.; FONSECA, L.J.S.; GUEDES, G.S.; RABELO, L.A.; GOULART, M.O.F.; VASCONCELOS, S.M.L. Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3265-3284, 2013.

BARAKA-VIDOT, J.; PLANESSE, C.; MEILHAC, O.; MILITELLO, V.; VAN DEN ELSEN, J.; BOURDON, E.; RONDEAU, P. Glycation alters ligand binding, enzymatic, and pharmacological properties of human albumin. **Biochemistry**, v. 54, n. 19, p. 3051-3062, 2015.

BARTHOLOMEW, R. J.; DELANEY, A. M. Sulphonphthaleins as specific reagents for albumin: determination of albumin in serum. **Proceedings of the Australasian Association of Clinical Biochemistry**, v. 1, p. 214-218, 1966.

BERÁNEK, M.; DRŠATA, J.; PALIČKA, V. Inhibitory effect of glycation on catalytic activity of alanine aminotransferase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 218, n. 1-2, p. 35-39, 2001.

BORGES, K.B.; BAUTISTA, B.H.; GUILERA, S. Diabetes–utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, 2008.

CERVELLATI, C.; TRENTINI, A.; ROMANI, A.; BELLINI, T.; BOSI, C.; ORTOLANI, B.; ZURLO, A.; PASSARO, A.; SERIPA, D.; ZULIANI, G. Serum paraoxonase and arylesterase activities of paraoxonase-1 (PON-1), mild cognitive impairment, and 2-year conversion to dementia: A pilot study. **Journal of Neurochemistry**, v. 135, n. 2, p. 395-401, 2015.

CERVELLATI, C.; VIGNA, G. B.; TRENTINI, A.; SANZ, J. M.; ZIMETTI, F.; NORA E. D.; MORIERI, M.L.; ZULIANI, G.; PASSARO, A. Paraoxonase-1 activities in individuals with different HDL circulating levels: Implication in reverse cholesterol transport and early vascular damage. **Atherosclerosis**, v. 285, p. 64-70, 2019.

CHETYRKIN S, MATHIS M, PEDCHENKO V, SANCHEZ OA, MCDONALD WH, HACHEY DL, MADU H, STEC D, HUDSON B, VOZIYAN P. Glucose autoxidation induces functional damage to proteins via modification of critical arginine residues. **Biochemistry**, v. 50, n. 27, p. 6102-6112, 2011.

CHINCHANSURE, A. A.; KORWAR, A. M.; KULKARNI, M. J.; JOSHI, S. P. Recent development of plant products with anti-glycation activity: a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 39, p. 31113-31138, 2015.

CHISTIYAKOV, D. A.; MELNICHENKO, A. A.; OREKHOV, A. N.; BOBRYSEV, Y. V. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. **Biochimie**, v. 132, p. 19-27, 2017.

CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G. B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of Aloe vera on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 181, n. 1-2, p. 71-76, 1998.

COSTA, L. G.; MCDONALD, B. E.; MURPHY, S. D.; OMENN, G. S.; RICHTER, R. J.; MOTULSKY, A. G.; FURLONG, C. E. Serum Paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxontocixity in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 103, n. 1, p. 66-76, 1990

DOS SANTOS, C. H. C.; BORGES, I. P.; DA SILVA, V. C.; DE SOUSA JR, P. T.; KAWASHITA, N. H.; BAVIERA, A. M.; CARVALHO, M. G. D. A new dammarane saponin and other triterpenoids from *Siolmatra brasiliensis* and evaluation of the antidiabetic activity of its extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 9, p. 1539-1547, 2016.

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

EREN, E.; YILMAZ, N.; AYDIN, O. High density lipoprotein and it's dysfunction. **The Open Biochemistry Journal**, v. 6, p. 78-93, 2012.

FRANCO, P. A. **Avaliação temporal da formação de produtos de glico-oxidação em sistema modelo *in vitro* de glicação proteica e prevenção por compostos fenólicos.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo.

GONZÁLEZ, I.; MORALES, M. A.; ROJAS, A. Polyphenols and AGEs/RAGE axis. Trends and challenges. **Food Research International**, v. 129, 108843, p. 12, 2019.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, n. 2, p. 751-766, 1949.

GUGLIUCCI, A. Activation of paraoxonase 1 is associated with HDL remodeling ex vivo. **Clinica Chimica Acta**, v. 429, p. 38-45, 2014.

GUGLIUCCI, A.; CACCAVELLO, R.; KOTANI, K.; KIMURA, S. EVIDENCE for the presence of active paraoxonase 1 in small-dense low-density lipoprotein. **Redox Report**, v. 19, n. 4, p. 154-160, 2014.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 5-13, 2015.

HAREL, M.; AHARONI, A.; GAIDUKOV, L.; BRUMSHTEIN, B.; KHERSONSKY, O.; MEGED, R.; DVIR, H.; RAVELLI, R. B. G.; MCCARTHY, A.; TOKER, L.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L.; TAWFIK, D.S. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 11, n. 5, p. 412-419, 2004.

HEINS, M.; HEIL, W.; WITHOLD, W. Storage of serum or whole blood samples? Effects of time and temperature on 22 serum analytes. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.33, p.231-238, 1995.

HOFMANN, T.; SCHIEBERLE, P. Formation of aroma-active Strecker-aldehydes by a direct oxidative degradation of Amadori compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4301-4305, 2000.

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

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 9<sup>a</sup> edição, 2019. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org>>. Acesso em 11 de abril de 2020.

JOHANSSON, L. H.; BORG, L. A. H. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. **Analytical Biochemistry**, v. 174, p. 331-336, 1988.

JURETIĆ, D.; ČEPELAK, I.; JALŠENJAK, V.; ŽANIĆ-GRUBIŠIĆ, T.; LIPOVAC, K.; JALŠENJAK, I. Effect of microencapsulated acetylsalicylic acid on glycosylation of human serum proteins *in vitro*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 61, n. 3, p. 219-223, 1990.

KHAN, M. S.; QAIS, F. A.; REHMAN, M. T.; ISMAIL, M. H.; ALOKAIL, M. S.; ALTWAJRY, N.; ALAFALEQ, N. O.; ALAJMI, M.F.; SALEM, N.; ALQHATANI, R. Mechanistic inhibition of non-enzymatic glycation and aldose reductase activity by naringenin: Binding, enzyme kinetics and molecular docking analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 87-97, 2020.

KHAN, M.; LIU, H.; WANG, J.; SUN, B. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advanced glycation end products: A comprehensive review. **Food Research International**, v. 130, 108933, 2020.

KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.82, n. 3, p.292-300, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

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

LIU, J.; YANG, Z.; CHENG, Y.; WU, Q.; HE, Y.; LI, Q.; CAO, X. Eriodictyol and naringenin inhibit the formation of AGEs: An *in vitro* and molecular interaction study. **Journal of Molecular Recognition**, v. 33, n.1, e2814, 2020.

LUEVANO-CONTRERAS, C.; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, K. Dietary advanced glycation end products and aging. **Nutrients**, v. 2, n.12, p. 1247-1265, 2010.

- LUNA, C.; ESTEVEZ, M. Oxidative damage to food and human serum proteins: Radical-mediated oxidation vs. glyco-oxidation. **Food Chemistry**, v. 267, p. 111-118, 2018.
- LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419-427, 2005.
- MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. **Gene**, v. 567, n. 1, p. 12-21, 2015.
- MADHUVANTHI, M.; LATHADEVI, G. V. Serum proteins alteration in association with body mass index in human volunteers. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 10, n. 6, CC05, 2016.
- MEEPROM, A.; SOMPONG, W.; CHAN, C. B.; ADISAKWATTANA, S. Isoferulic Acid, a New Anti-Glycation Agent, Inhibits Fructose and Glucose-Mediated Protein Glycation *in Vitro*. **Molecules**, v. 18, n.6, p. 6439-6454, 2013.
- MEEPROM, A.; SOMPONG, W.; SUANTAWEE, T.; THILAVECH, T.; CHAN, C. B.; ADISAKWATTANA, S. Isoferulic acid prevents methylglyoxal-induced protein glycation and DNA damage by free radical scavenging activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 346, 2015.
- MONNIER, V.M.; SELL, D.R.; GENUTH, S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 567-581, 2005.
- MONTES-CORTES, D.H.; HICKS, J.J.; CEBALLOS-REYES, G.M.; GARCIA-SANCHEZ, J.R.; MEDINA-NAVARRO, R.; OLIVARES-CORICHI, I.M. Chemical and functional changes of human insulin by *in vitro* incubation with blood from diabetic patients in oxidative stress. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 59, p. 935-942, 2010.
- MORAIS, M. P.; MARSHALL, D.; FLOWER, S. E.; CAUNT, C.J.; JAMES, T. D.; WILLIAMS, R. J.; WATERFIELD, N. R., VAN DEN ELSEN, J. M. Analysis of protein glycation using fluorescent phenylboronate gel electrophoresis. **Scientific Reports (Nature)**, v.3, p. 1437, 2013.
- MOTTA, B. P.; KAGA, A. K.; OLIVEIRA, J. O.; INACIO, M. D.; DA SILVA, C. F.; DE SOUSA JUNIOR, P. T.; BRUNETTI, I. L.; BAVIERA, A. M. *In vitro* inhibition of protein

glycation and advanced glycation end products formation by hydroethanolic extract and two fractions of *Simaba trichilioides* roots. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2018.

MROZ JR. Clinical Enzimology. In: ANDERSON SC, COCKAYNE S (eds). **Clinical Chemistry Concepts & Applications**, capítulo 11, Mc Graw-Hill. p. 179-202, 2003.

MURILLO-GONZÁLEZ, F. E.; PONCE-RUIZ, N.; ROJAS-GARCÍA, A. E.; ROTHENBERG, S. J.; BERNAL-HERNÁNDEZ, Y. Y.; CERDA-FLORES, R. M.; MACKNESS, M; BARRÓN-VIVANCO, B. S.; GONZÁLEZ-ARIAS, C. A.; PONCE-GALLEGOS, J.; MEDINA-DÍAZ, I. M. PON1 lactonase activity and its association with cardiovascular disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 500, p. 47-53, 2020.

NADER, R.; WARNICK, G. R. Lipids, lipoproteins, apolipoproteins and other cardiovascular risk factors. In: **Tietz text book of clinical chemistry and molecular diagnostics**. Elsevier. p. 916-952, 2006.

OTT, C.; JACOBS, K.; HAUCKE, E.; SANTOS, A. N.; GRUNE, T.; SIMM, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, p. 411-429, 2014.

PALERMO, K. R. **Prospecção do potencial anti-glicação de fitoquímicos via ensaios *in vitro***. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo.

PAMPATI, P. K.; SURAVAJJALA, S.; DAIN, J.A. Monitoring nonenzymatic Glycation of Human Immunoglobulin G by methylglyoxal and glyoxal: A spectroscopic study. **Analytical Biochemistry**, v. 408, n. 1, p. 59-63, 2011.

PERRONE, A.; GIOVINO, A.; BENNY, J.; MARTINELLI, F. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 3818196, p. 18, 2020.

PRÉCOURT, L. P.; AMRE, D.; DENIS, M. C.; LAVOIE, J. C.; DELVIN, E.; SEIDMAN, E.; LEVY, E. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. **Atherosclerosis**, v.214, n. 1, p. 20-36, 2011.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 458, n. 2, p. 221-226, 2015.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. **Amino acids**, v. 42, n. 4, p. 1133-1142, 2012.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. The critical role of methylglyoxal and glyoxalase 1 in diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 63, n. 1, p. 50-52, 2014.

RAI, A. K.; SINGH, S. P.; PANDEY, A. R.; ANSARI, A.; AHMAD, S.; SASHIDHARA, K. V.; TAMRAKAR, A. K. Flavonoids from *Polyalthia longifolia* prevents advanced glycation end products formation and protein oxidation aligned with fructose-induced protein glycation. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2019.

RONDEAU, P.; BOURDON, E. The glycation of albumin: structural and functional impacts. **Biochimie**, v. 93, n. 4, p. 645-658, 2011.

RONDEAU, P.; NAVARRA, G.; MILITELLO, V.; BOURDON, E. On the aggregation of albumin: influences of the protein glycation. **Protein Aggregation**, p.139-159, 2010.

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

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; GALINIAK, S.; BARTOSZ, G. Kinetics of glycooxidation of bovine serum albumin by glucose, fructose and ribose and its prevention by food components. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18828-18849, 2014.

SATTARAHMADY, N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; HABIBI-REZAEI, M. A biophysical comparison of human serum albumin to be glycated *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Medical Biochemistry**, v.30, n.1, p. 5-10, 2011.

SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. A. Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases. **Physiological Reviews**, v. 100, n. 1, p. 407-461, 2020.

SÉRO, L.; SANGUINET, L.; BLANCHARD, P.; DANG, B. T.; MOREL, S.; RICHOMME, P.; SÉRAPHIN, D.; DERBRÉ, S. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. **Molecules**, 18, 14320-39, 2013.

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

<[https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/banners/](https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/banners/Diretrizes_SBD_2020_04FEV20.pdf)

[Diretrizes\\_SBD\\_2020\\_04FEV20.pdf](https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/banners/Diretrizes_SBD_2020_04FEV20.pdf)>. Acesso em 11 de abril de 2020.

TAGHAVI, F.; HABIBI-REZAEI, M.; AMANI, M.; SABOURY, A. A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. The status of glycation in protein aggregation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 100, p. 67-74, 2017.

TAO, Z.; SHI, A.; ZHAO, J. Epidemiological perspectives of diabetes. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 73, n. 1, p. 181-185, 2015.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, n. 2, p. 158-161, 1969.

VETRI, V.; LIBRIZZI, F.; LEONE, M.; MILITELLO, V. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH: comparison with human serum albumin. **European Biophysics Journal**, v. 36, n. 7, p. 717-725, 2007.

VISTOLI, G.; DE MADDIS, D.; CIPAK, A.; ZARKOVIC, N.; CARINI, M.; ALDINI, G. Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47, supp. 1, p. 3-27, 2013.

VRDOLJAK, A.; TRESCEC, A.; BENKO, B.; HECIMOVIC, D.; SIMIC, M. *In vitro* glycation of human immunoglobulin G. **Clinica Chimica Acta**, v. 345, n. 1-2, p. 105-111, 2004.

WARNICK, G. R.; WOOD, P. D. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: executive summary. The National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 10, p. 1427-1433, 1995.

WROBLEWSKI, F.; LADUE, J. S. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 91, n. 4, p. 569-571, 1956.

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.

YOUNUS, H.; ANWAR, S. Prevention of non-enzymatic glycosylation (glycation): Implication in the treatment of diabetic complication. **International Journal of Health Sciences**, v. 10, p. 261-277, 2016.

YU, W.; LIU, X.; FENG, L.; YANG, H.; YU, W.; FENG, T.; WANG, S.; WANG, J.; LIU, N. Glycation of paraoxonase 1 by high glucose instigates endoplasmic reticulum stress to induce endothelial dysfunction in vivo. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

ZHU, H.; POOJARY, M. M.; ANDERSEN, M. L.; LUND, M. N. Effect of pH on the reaction between naringenin and methylglyoxal: A kinetic study. **Food Chemistry**, v. 298, 125086, 2019.