



**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 glico-oxidativo *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-hidroxibenzenosulfonato 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 metilglioxal .....                                                                                                                    | 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 metilglioxal .....                            | 55  |
| 4.3 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas <i>in vitro</i> em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal 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 metilglioxal 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 metilglioxal (experimento 1).....                                                                                                               | 127 |
| 5.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos das alterações glico-oxidativas em sistema-modelo de glicação <i>in vitro</i> com metilglioxal 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)<br>MODY 2 (defeitos no gene GCK)<br>MODY 3 (defeitos no gene HNF1A)<br>MODY 4 (defeitos no gene IPF1)<br>MODY 5 (defeitos no gene HNF1B)<br>MODY 6 (defeitos no gene NEUROD1)<br>Diabetes neonatal transitório<br>Diabetes neonatal permanente<br>DM mitocondrial<br>Outras |
| <b>Defeitos genéticos na ação da insulina</b>                    | Resistência à insulina do tipo A<br>Leprechaunismo<br>Síndrome de Rabson-Mendenhall<br>DM lipotrófico<br>Outras                                                                                                                                                                                             |
| <b>Doenças do pâncreas exócrino</b>                              | Pancreatite<br>Pancreatectomia ou trauma<br>Neoplasia<br>Fibrose cística<br>Pancreatopatia fibrocalculosa<br>Outras                                                                                                                                                                                         |
| <b>Endocrinopatias</b>                                           | Acromegalia<br>Síndrome de Cushing<br>Glucagonoma<br>Feocromocitoma<br>Somatostatina<br>Aldosteronoma<br>Outras                                                                                                                                                                                             |
| <b>Diabetes induzido por medicamentos ou agentes químicos</b>    | Determinadas toxinas<br>Pentamidina<br>Ácido nicotínico<br>Glicocorticoides<br>Hormônio tireoideano<br>Diazóxido<br>Agonistas $\beta$ adrenérgicos<br>Tiazídicos<br>Interferon $\alpha$<br>Outras                                                                                                           |
| <b>Infecções</b>                                                 | Rubéola congênita<br>Citomegalovírus<br>Outras                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Formas incomuns de DM autoimune</b>                           | Síndrome de Stiff-Man<br>Anticorpos antirreceptores de insulina<br>Outras                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Outras síndromes genéticas por vezes associadas ao DM</b>     | Síndrome de Down<br>Síndrome de Klinefelter<br>Síndrome de Turner<br>Síndrome de Wolfram<br>Ataxia de Friedreich<br>Coreia de Huntington<br>Síndrome de Laurence-Moon-Biedl<br>Distrofia miotônica<br>Síndrome de Prader-Willi<br>Outras                                                                    |

Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019.

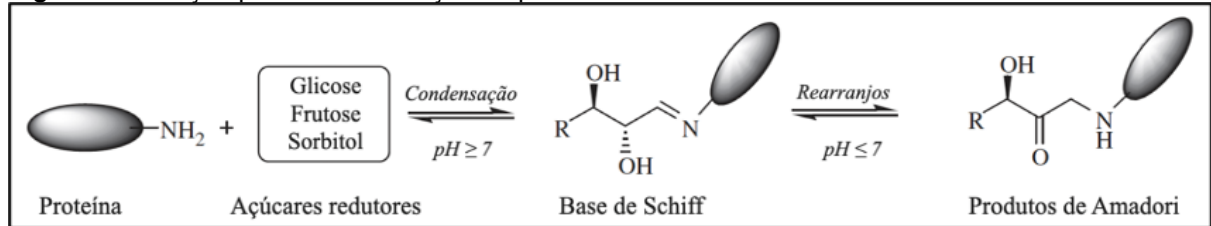
A hiperglicemia crônica é a principal característica observada no DM, a qual contribui para o desenvolvimento e manutenção das complicações micro e macrovasculares da doença. As complicações microvasculares afetam vasos de pequeno calibre de nervos, rins e retina, favorecendo o surgimento de nefropatia, 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).

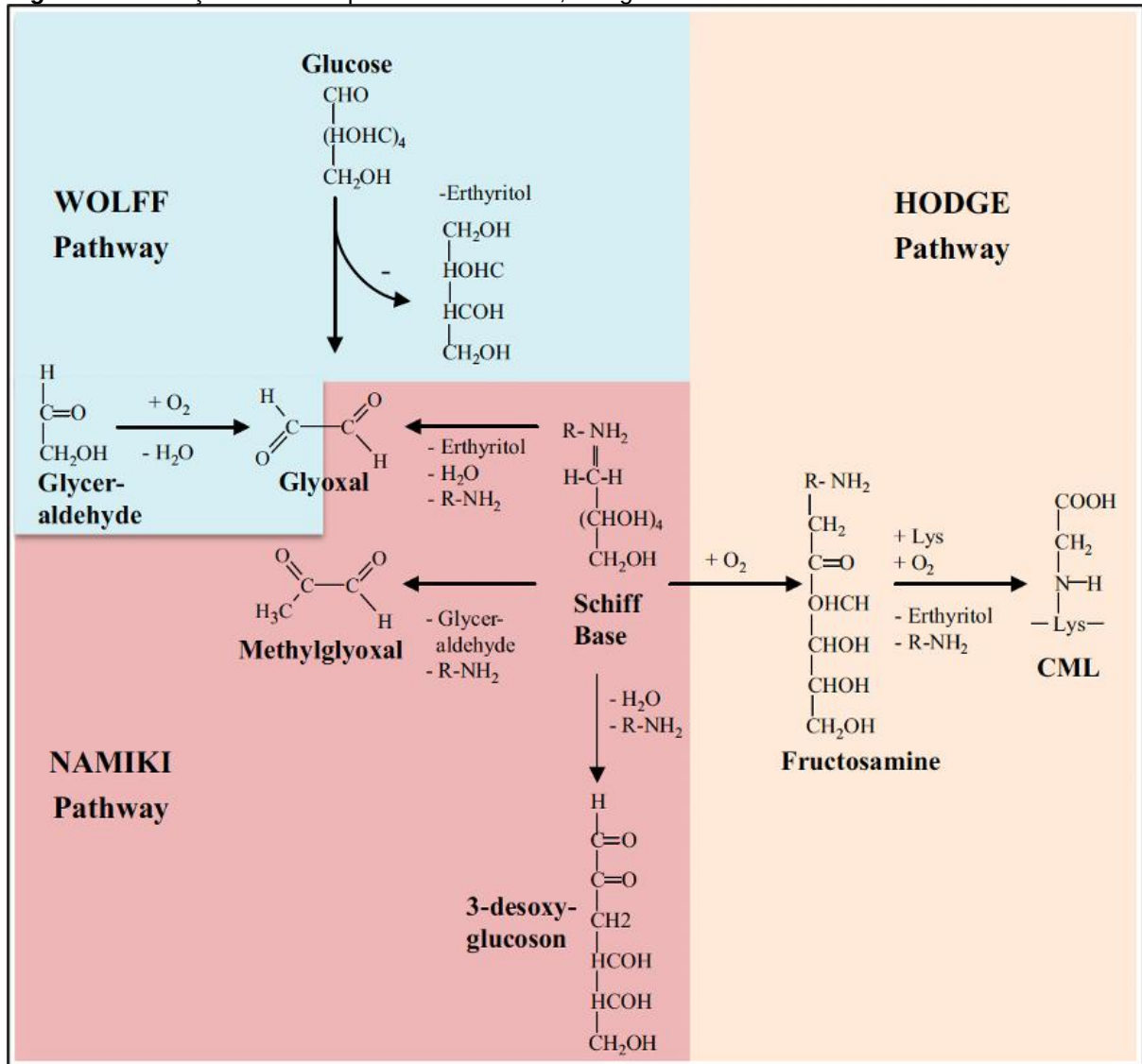
**Figura 2.** Glicação proteica e formação de produtos de Amadori.



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).

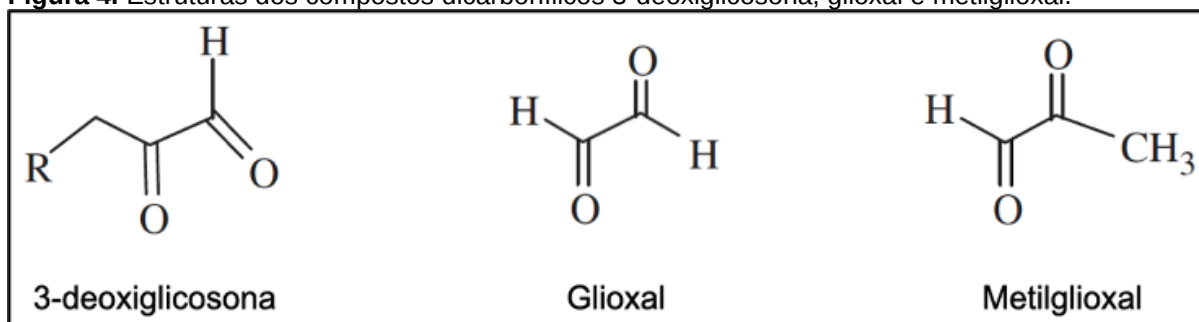
**Figura 3.** Formação de AGEs pelas vias de Wolff, Hodge e Namiki.



Fonte: OTT et al., 2014.

Os compostos dicarbonílicos são substâncias altamente reativas e de baixo peso molecular, dentre eles estão o glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglicosona (Figura 4), sendo o metilglioxal (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, glioxal e metilglioxal.



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).

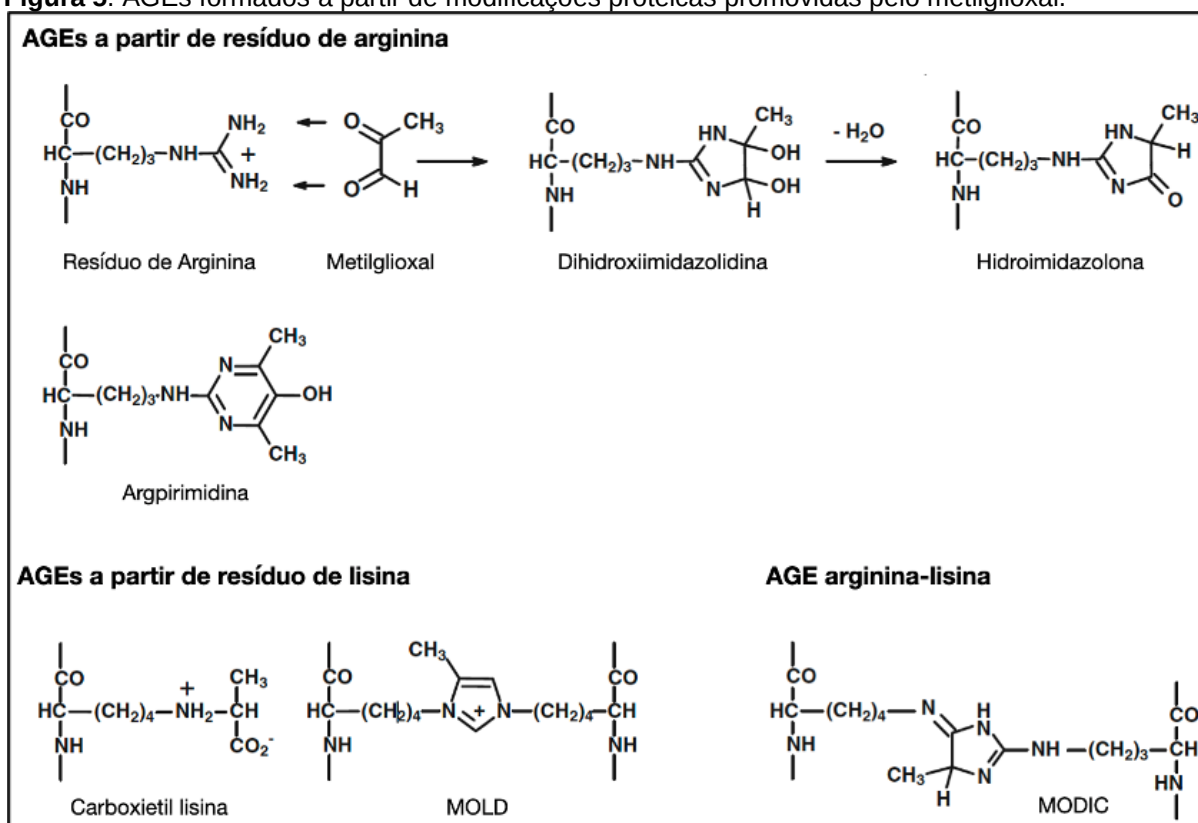
O MGO também pode ser encontrado em diversos alimentos e bebidas, dentre eles pães, biscoitos e bolachas, carnes assadas, café, chocolate, mel, cerveja e leite. As alterações promovidas pelo MGO nas estruturas das proteínas destes alimentos e bebidas promovem alterações organolépticas. Na reação de Strecker, ocorre a produção de aldeídos aromáticos, tais como 3-metilbutanal (malte) e fenilacetaldeído (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 consequentemente, 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 metilglioxal.



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'-formilquinureína 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 fosfolipídeos; 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).

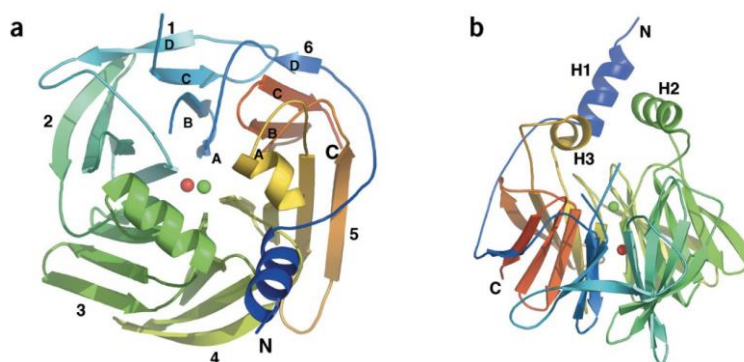
Outras proteínas também podem sofrer glicação, incluindo a insulina e determinadas enzimas. Em relação aos impactos da glicação de enzimas, estas podem sofrer alterações em suas estruturas conformacionais e/ou sítio de ligação, diminuindo a ação da enzima, ou até mesmo inativando-as (GONZÁLES et al., 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 consequentemente 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).



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, consequentemente 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, consequentemente 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).

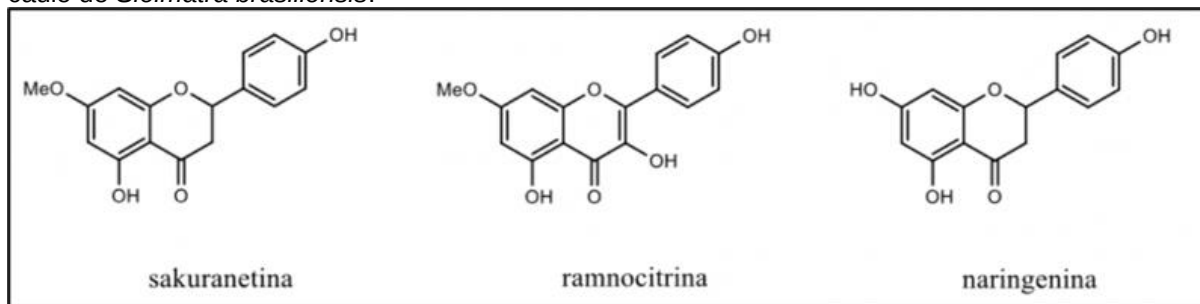
Nosso grupo de pesquisa tem avançado nos estudos com *Siolmatra brasiliensis* em relação a sua atividade antidiabética. Utilizando sistema-modelo *in vivo* de DM tipo 1 (ratos com DM induzido pela administração do fármaco diabetogênico estreptozotocina), estudou-se o efeito do tratamento crônico com 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.

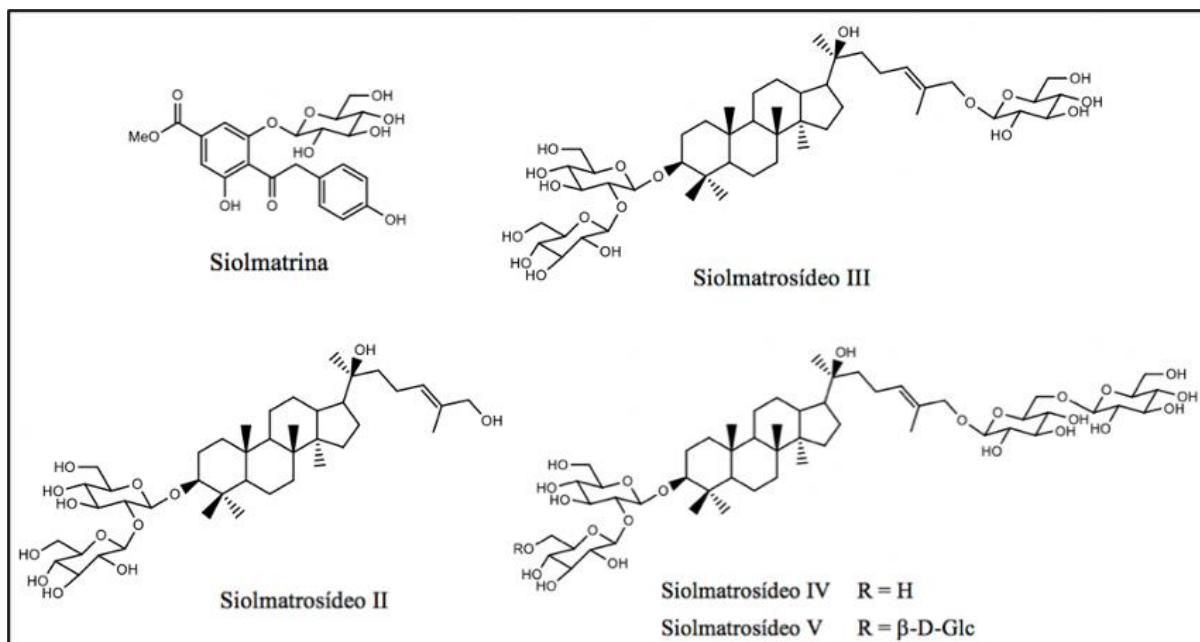
Ainda no estudo de DOS SANTOS et al. (2019), foi possível realizar a identificação de algumas substâncias (conhecidas e inéditas) isolados a partir das frações acetato de etila e clorofórmica do caule de *Siolmatra brasiliensis*. Na fração clorofórmica foram identificadas substâncias já descritas em literatura (Figura 7). Já as substâncias identificadas a partir da fração acetato de etila são inéditos (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.

## 2. OBJETIVOS

Avaliar as alterações em biomarcadores do estresse glico-oxidativo em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano, conduzindo incubações na presença de glicose ou de metilglioxal, na ausência ou na presença de extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis*, fração acetato de etila, fração clorofórmica e naringenina.

## 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Avaliar em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose, nos tempos de 0, 7, 11, 14, 18, 21, 29, 35 e 40 dias, os seguintes parâmetros:

- Formação de AGEs fluorescentes;
- Análise de modificações estruturais de proteínas séricas;
- Níveis de grupos carbonilas em proteínas;
- Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
- Atividade de catalase;
- Atividade de paraoxonase 1.

2) Avaliar em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose, nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas, os efeitos do extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis*, fração clorofórmica, fração acetato de etila e naringenina sobre os seguintes parâmetros:

- Formação de AGE fluorescentes;
- Análise de modificações estruturais de proteínas séricas;
- Formação de produtos de oxidação de resíduos dos aminoácidos triptofano (N'-formilquinurenina e quinurenina) e tirosina (ditirosina);
- Atividades de paraoxonase 1.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Soro sanguíneo humano

Foram utilizados soros controle de origem humana (Dolles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios LTDA, Goiânia, Goiás, Brasil), obtidos do setor de Bioquímica, Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapia, Núcleo de Atendimento à Comunidade, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Câmpus Araraquara. De acordo com as instruções do fabricante, o soro controle já é testado e com resultados não reagentes (negativos) para hepatite B (HbsAg), hepatite C (HCV) e HIV (vírus da imunodeficiência adquirida).

### **3.2 Preparação do extrato, frações e isolamento/identificação de metabólitos do caule de *Siolmatra brasiliensis***

A coleta das amostras de caule de *Siolmatra brasiliensis* (Cogn.) Bail, preparação do extrato bruto hidroetanólico, frações (clorofórmica, acetato de etila, n-butanol) e o isolamento e identificação de metabólitos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Teixeira de Souza Junior (Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT) e o Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho (Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro).

Os caules de *Siolmatra brasiliensis* (Cogn.) Bail foram coletados no mês de março de 2011, na cidade de Jangada, no estado do Mato Grosso, Brasil. Estes caules foram identificados por Dr. Vali Joana Pott da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Departamento de Biologia), e uma pequena amostra foi colocada no herbário da Universidade do Mato Grosso do Sul sobre o número de identificação CGMS: 31.643.

Para a preparação do extrato bruto hidroetanólico, foi realizada percolação com etanol 70% do material coletado, seco e moído de *Siolmatra brasiliensis*. A partir do extrato bruto foi realizada extração líquido-líquido com clorofórmio, ou acetato de etila ou n-butanol, para obtenção das frações. As substâncias isoladas presentes nas frações foram obtidas por métodos cromatográficos, conforme descrito por dos Santos e colaboradores (2019).

### **3.3 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose**

O sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose foi realizado de acordo com sistemas-modelo *in vitro* de glicação conduzidos nos estudos de Moraes e colaboradores (2013), dos Santos e colaboradores (2019) e Motta e colaboradores (2018), com modificações. Amostras de soro sanguíneo foram incubadas na ausência ou na presença de glicose (500 mM), na presença de azida sódica (0,02%), por 40 dias, a 37°C. Também foram conduzidas incubações na ausência ou na presença de aminoguanidina (AG, 1 mM, agente protótipo com atividade anti-AGE).

Anteriormente ao preparo do sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro*, considerando o fato de o soro controle já possuir glicose, foi determinada a sua concentração (kit comercial, Labtest Diagnóstica S.A.), em seguida foi adicionada ao soro a quantidade de glicose necessária para alcançar a concentração de 500 mM.

Antes do início das incubações (tempo 0), bem como nos tempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 21, 29, 35, e 40 dias de incubação, foram retiradas alíquotas das incubações para determinação das atividades das enzimas antioxidantes (catalase e paraoxonase 1), determinação de biomarcadores de peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e de oxidação de proteínas (níveis de grupos carbonilas em proteínas). Nos tempos 0, 7, 11, 14, 18, 21, 29, 35 e 40 dias de incubação, foram retiradas alíquotas para estimativa dos AGEs fluorescentes e para o estudo de modificações estruturais em proteínas.

### **3.4 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal**

Foram conduzidos 3 experimentos: o primeiro experimento foi realizado para determinar a melhor concentração de metilglioxal (MGO) para estabelecer um sistema-modelo modificações glico-oxidativas *in vitro*; o segundo experimento foi realizado conduzindo incubações com o extrato hidroetanólico de caule de *Siolmatra brasiliensis*, fração clorofórmica e naringenina (uma das substâncias majoritárias identificadas na fração clorofórmica); o terceiro experimento foi realizado conduzindo incubações com a fração acetato de etila.

#### **Experimento 1:**

O sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal foi realizado de acordo com sistemas-modelo *in vitro* de glicação conduzidos nos estudos de Moraes e colaboradores (2013) e Sadowska-Bartosz e colaboradores (2014), com modificações. Amostras de soro sanguíneo foram incubadas na ausência ou na presença de MGO nas concentrações de 5, 10 e 20 mM, na presença de azida sódica (0,02%) e dimetilsulfóxido (5%), por 48 horas, a 37°C. Também foram conduzidas incubações

na ausência ou na presença de aminoguanidina (AG, 10 mM, agente protótipo com atividade anti-AGE).

Antes do início das incubações (tempo 0), bem como nos tempos 3, 6, 12, 24 e 48 horas, foram retiradas alíquotas das incubações e armazenadas à -80°C até o momento das análises. Posteriormente foram realizadas a determinação de AGEs fluorescentes, análise de modificações estruturais em proteínas e atividade arilesterase da paraoxonase 1.

Situações conduzidas:

- |                    |                         |
|--------------------|-------------------------|
| · Soro             | · Soro + AG             |
| · Soro + MGO 5 mM  | · Soro + AG + MGO 5 mM  |
| · Soro + MGO 10 mM | · Soro + AG + MGO 10 mM |
| · Soro + MGO 20 mM | · Soro + AG + MGO 20 mM |

### Experimento 2:

O sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal foi realizado de acordo com sistemas-modelo *in vitro* de glicação conduzidos nos estudos de Moraes e colaboradores (2013) e Sadowska-Bartosz e colaboradores (2014), com modificações. Amostras de soro sanguíneo foram incubadas na ausência ou na presença de MGO na concentração de 10 mM na presença de dimetilsulfóxido (5%; utilizado para solubilizar extrato, fração e substância isolada), por 48 horas, a 37°C. Também foram conduzidas incubações na ausência ou na presença de aminoguanidina (AG, 10 mM), bem como incubações na ausência ou na presença de extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbExt; 500, 250 e 125 µg/mL), fração clorofórmica (SbCHCl<sub>3</sub>; 250, 125 e 62,5 µg/mL) e naringenina (NAR; 400, 200 e 100 µM).

Antes do início das incubações (tempo 0), bem como nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, foram retiradas alíquotas que foram armazenadas à -80°C até o momento das análises. As análises realizadas foram: determinação dos níveis de marcadores bioquímicos (glicose, proteínas totais, albumina, ALT, triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol), estimativa de AGEs fluorescentes, análise de modificações estruturais em proteínas, estimativa de formação de produtos de

oxidação dos resíduos de aminoácido triptofano (N'-formilquinurenina e quinurenina) e tirosina (ditirosina) e determinação de grupos carbonilas em proteínas.

Situações conduzidas:

- |                                         |                                               |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|
| · Soro                                  | · Soro + MGO                                  |
| · Soro + AG                             | · Soro + MGO + AG                             |
| · Soro + SbExt 500 µg/mL                | · Soro + MGO + SbExt 500 µg/mL                |
| · Soro + SbExt 250 µg/mL                | · Soro + MGO + SbExt 250 µg/mL                |
| · Soro + SbExt 125 µg/mL                | · Soro + MGO + SbExt 125 µg/mL                |
| · Soro + SbCHCl <sub>3</sub> 250 µg/mL  | · Soro + MGO + SbCHCl <sub>3</sub> 250 µg/mL  |
| · Soro + SbCHCl <sub>3</sub> 125 µg/mL  | · Soro + MGO + SbCHCl <sub>3</sub> 125 µg/mL  |
| · Soro + SbCHCl <sub>3</sub> 62,5 µg/mL | · Soro + MGO + SbCHCl <sub>3</sub> 62,5 µg/mL |
| · Soro + NAR 400 µM                     | · Soro + MGO + NAR 400 µM                     |
| · Soro + NAR 200 µM                     | · Soro + MGO + NAR 200 µM                     |
| · Soro + NAR 100 µM                     | · Soro + MGO + NAR 100 µM                     |

### Experimento 3:

O sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal foi realizado de acordo com sistemas-modelo *in vitro* de glicação conduzidos nos estudos de Moraes e colaboradores (2013) e Sadowska-Bartosz e colaboradores (2014), com modificações. Amostras de soro sanguíneo foram incubadas na ausência ou na presença de MGO na concentração de 10 mM na presença de dimetilsulfóxido (5%; utilizado para solubilizar extrato, fração e substância isolada), por 48 horas, a 37°C. Também foram conduzidas incubações na ausência ou na presença de aminoguanidina (AG, 10 mM), bem como incubações na ausência ou na presença da fração acetato de etila (SbAcE; 250, 125 e 62,5 µg/mL).

Antes do início das incubações (tempo 0), bem como nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, foram retiradas alíquotas que foram armazenadas à -80°C até o momento das análises. As análises realizadas foram: determinação dos níveis de marcadores bioquímicos (glicose, proteínas totais, albumina, ALT, triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol), estimativa de AGEs fluorescentes, análise de modificações estruturais em proteínas, estimativa de formação de produtos de oxidação dos resíduos de aminoácido triptofano (N'-formilquinurenina e quinurenina)

e tirosina (ditirosina), determinação de grupos carbonilas em proteínas e atividades arilesterase e lactonase de paraoxonase 1.

Situações conduzidas:

- |                           |                                 |
|---------------------------|---------------------------------|
| · Soro                    | · Soro + MGO + AG               |
| · Soro + AG               | · Soro + MGO + SbAcE 250 µg/mL  |
| · Soro + SbAcE 250 µg/mL  | · Soro + MGO + SbAcE 125 µg/mL  |
| · Soro + SbAcE 125 µg/mL  | · Soro + MGO + SbAcE 62,5 µg/mL |
| · Soro + SbAcE 62,5 µg/mL |                                 |
| · Soro + MGO              |                                 |

### 3.5 Determinação dos níveis de marcadores bioquímicos

Os níveis dos marcadores bioquímicos (glicose, proteínas totais, albumina, ALT, triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol) foram avaliados em slides contendo química seca no equipamento Vitros250®, um sistema automatizado que aplica um pequeno volume de amostra no slide, a amostra é incubada, e ocorrem reações para produzir um cromóforo, permitindo que seja realizada leitura por reflectância.

#### Determinação de glicose

A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose; o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminioantipirina e fenol, sob ação da enzima peroxidase, formando antipirilquinonimina, monitorada à 505 nm (TRINDER, 1969).

#### Determinação de proteínas totais

O íon cobre no reagente de biureto, em meio alcalino, reage com as ligações peptídicas das proteínas séricas, formando cromóforo de cor púrpura, monitorado à 545 nm (GORNALL et al., 1949).

#### Determinação de albumina

O método se baseia no desvio do pico de absorvidade máxima de um corante (verde de bromocresol) quando este se liga à albumina, monitorado à 640 nm (BARTHOLOMEW; DELANEY, 1966).

### Determinação de ALT

A ALT catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o alfa-cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido à lactato por ação da lactato desidrogenase, sendo a coenzima NADH oxidada à NAD<sup>+</sup>, com diminuição da absorbância em 340 nm (WROBLEWSKI; LADUE, 1956).

### Determinação de triglicerídeos

A lipase lipoproteica promove a hidrólise de triglicerídeos produzindo glicerol, o qual é convertido à glicerol-3-fosfato por ação da gliceroquinase. O glicerol-3-fosfato é oxidado à dihidroxiacetona-fosfato e peróxido de hidrogênio, por ação da glicerofosfato oxidase. Em seguida, ocorre a reação entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina monitorada à 505 nm (NADER; WARNICK, 2006)

### Determinação de colesterol total

Os ésteres de colesterol são hidrolisados à colesterol livre e ácidos graxos por ação da enzima colesterol esterase. O colesterol livre é oxidado à colest-4-emona e peróxido de hidrogênio pela ação da enzima colesterol oxidase. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina, monitorada à 505 nm (MROZ, 2003).

### Determinação de HDL-colesterol

A primeira fase da reação para determinação de HDL-colesterol baseia-se em impedir a reação de lipoproteínas não-HDL com as enzimas colesterol oxidase e colesterol esterase, através da adição de poliânion e um detergente catiônico, tornando as lipoproteínas não-HDL inacessíveis para as enzimas. Na segunda fase da reação, há adição de colesterol esterase, colesterol oxidase, estas enzimas irão utilizar o colesterol de HDL como substrato e produzir peróxido de hidrogênio, que na presença 4-aminoantipirina, a peroxidase catalisa a formação de quinoneimina, a qual pode ser monitorada à 505 nm (WARNICK; WOOD, 1995).

### **3.6 Estimativa de AGEs fluorescentes e análise de modificações estruturais em proteínas**

#### Estimativa de AGEs fluorescentes

Os AGEs fluorescentes foram estimados fluorimetricamente, de acordo com dos Santos e colaboradores (2019) e Motta e colaboradores (2018), com modificações. Foram utilizadas amostras de soro sem diluição e com diluição (25 vezes) em tampão salina fosfato (PBS) 10 mM (tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,85% pH 7,4). Volume de 300 µL de amostra foi submetido à excitação no comprimento de onda de 350 nm e a emissão foi monitorada no comprimento de onda de 440 nm, em ganho de 100%, em leitor de microplaca Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc.

#### Análise de modificações estruturais em proteínas

Para a verificação de alterações estruturais nas proteínas séricas, alíquotas das incubações foram submetidas à eletroforese, para separação de proteínas em condições não desnaturantes, permitindo assim a separação de proteínas de acordo com seu peso molecular e sua carga.

Cinco microlitros das incubações foram adicionados a sessenta microlitros de tampão da amostra (tampão Tris-HCl 62,5 mM, 10% de glicerol, 0,1% de azul de bromofenol; pH 6,8) (LAEMMLI, 1970). Volume de dois microlitros foi utilizado para aplicação no gel, para subsequente separação eletroforética. A separação eletroforética foi realizada em um gel de poliacrilamida (PAGE) 10%, por duas horas e trinta minutos a 120 V, na presença de solução tampão de eletroforese (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM; pH 8,3).

Após a separação eletroforética, o gel foi corado com Coomassie blue por 30 minutos, seguido por lavagens com solução descorante (10% metanol, 10% ácido acético e 80% água milliQ), permitindo a visualização das bandas no gel. A captura da imagem foi realizada com câmera digital de 12MP.

### **3.7 Estimativa dos produtos de oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano**

A estimativa dos produtos de oxidação dos resíduos de tirosina e triptofano foram realizadas segundo Sadowska-Bartosz e colaboradores (2014), com

modificações. Resíduos do aminoácido triptofano ao sofrerem processo de oxidação, formando os produtos N'-formilquinurenina e quinurenina, compostos que podem ser monitorados espectrofluorimetricamente (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc) nos seguintes comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente: 325/344 nm (N'-formilquinurenina) e 360/480 nm (quinurenina). Resíduos de tirosina podem sofrer oxidação, com formação de ligação covalente entre dois resíduos de tirosina, formando a ditirosina, a qual pode ser monitorada fluorimetricamente nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 330 e 415 nm respectivamente.

### **3.8 Avaliação dos níveis de grupos carbonilas em proteínas (PCO) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

#### Determinação dos níveis de PCO

Os níveis de PCO foram determinados de acordo com Levine e colaboradores (1994), com modificações. As amostras de soro foram diluídas na proporção 1:4 com tampão fosfato 50 mM (pH 6,7) contendo 1 mM de EDTA. Em seguida, adicionou-se ácido tricloroacético (TCA) 10%. As amostras foram homogeneizadas e então centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensão com 2,5 M de HCl na ausência ou presença de 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH) 0,1%. Após 30 minutos, novamente foi realizado o processo de adição de TCA 10% e centrifugação a 10.000 g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Ao pellet foi adicionado acetato de etila:etanol (1:1) para remoção do excesso de DNPH, então centrifugado a 10.000 g por 5 minutos a 4°C, foi realizado o descarte do sobrenadante, e o processo de remoção de DNPH da amostra foi novamente executado, através da adição de acetato de etila : etanol seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. Em seguida, ao pellet foi adicionado em 6 M de ureia para determinação dos níveis de PCO. O DNPH reage com os grupos carbonilas presentes nas proteínas, formando 2,4-dinitrofenilhidrazona, o qual é monitorado espectrofotometricamente a 370 nm. Os níveis de PCO nas amostras foram estimados utilizando o coeficiente de extinção molar da hidrazona ( $22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), sendo a concentração de PCO expressa em nmol/L.

### Determinação dos níveis de TBARS

As amostras de soro foram diluídas na proporção de 1:4 em solução de KCl 1,15%, em seguida desproteinizadas com adição de ácido perclórico 10%, de acordo com Pilz e colaboradores (2000). Os produtos finais de peroxidação lipídica, incluindo malondialdeído (MDA), foram determinados através da reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) (KOHN; LIVERSEDGE, 1994). Os níveis de TBARS foram monitorados em espectrofluorímetro (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc), em comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 e 553 nm, respectivamente. Uma curva analítica foi realizada utilizando 1,1',3,3'-tetrametoxipropano. Os valores de TBARS foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$ .

### **3.9 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)**

De acordo com Johansson e Borg (1988) com modificações. A atividade de CAT pode ser determinada através da formação de formaldeído na reação entre metanol e peróxido de hidrogênio (50,04 mM), catalisada pela CAT. O formaldeído gerado reage com 4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazol (Purpald; 33,4 mM), gerando um cromóforo monitorado à 540 nm. Foi feita uma curva analítica utilizando formaldeído. A atividade de CAT foi expressa em  $\mu\text{mol/min/L}$ .

### **3.10 Determinação da atividade da enzima paraoxonase 1 (PON 1)**

#### Determinação da atividade paraoxonase da PON 1

A atividade de paraoxonase da PON 1 foi determinada através da reação de hidrólise do paraoxon a p-nitrofenol, de acordo com COSTA et al. (1990) e modificações segundo Assis et al. (2017). O ensaio foi conduzido na presença de tampão Tris-HCl 1,5 mM (pH 8,5) contendo 0,15 mM de cloreto de cálcio, 0,3 M de cloreto de sódio e 1,2 mM de paraoxon. O monitoramento da absorbância foi realizado durante 5 minutos a 37°C à 405 nm. Os resultados foram calculados utilizando o coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol ( $18.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e expressos em unidades internacionais (UI).

### Determinação da atividade arilesterase da PON 1

A atividade de arilesterase da PON 1 foi determinada de acordo com ECKERSON et al. (1983) e MURILLO-GONZÁLES et al. (2020) com modificações. Amostras de soro sanguíneo foram diluídas na proporção de 1:80 em tampão PBS 10 mM (tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,85%; pH 7,4). O ensaio foi conduzido na presença de tampão Tris-HCl 75 mM (pH 8,0) contendo 2,25 mM de cloreto de cálcio e 2,96 mM de fenilacetato. A atividade arilesterase de PON 1 foi monitorada no comprimento de onda de 270 nm por 3 minutos em temperatura de 25°C. A taxa de consumo do fenilacetato foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de  $1310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , sendo que uma unidade de atividade de arilesterase é equivalente a 1  $\mu\text{mol}$  de fenilacetato consumido/min/mL de soro sanguíneo humano.

### Determinação da atividade lactonase da PON 1

A determinação da atividade de lactonase de PON 1 foi realizada de acordo com BILLECKE et al. (2000) e MURILLO-GONZÁLES et al. (2020) com modificações. Amostras de soro sanguíneo foram diluídas na proporção de 1:40 em tampão PBS 10 mM (tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,85%; pH 7,4). O ensaio foi conduzido na presença de tampão Tris-HCl 75 mM (pH 8,0) contendo 2,25 mM de cloreto de cálcio e 100 mM de dihidrocoumarina. A atividade lactonase de PON 1 foi monitorada no comprimento de onda de 270 nm por 3 minutos em temperatura de 25°C. A taxa de consumo do dihidrocoumarina foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de  $1295 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Uma unidade de atividade de lactonase é equivalente 1  $\mu\text{mol}$  de dihidrocoumarina consumido/min/mL de soro sanguíneo humano.

### **3.11 Análise estatística**

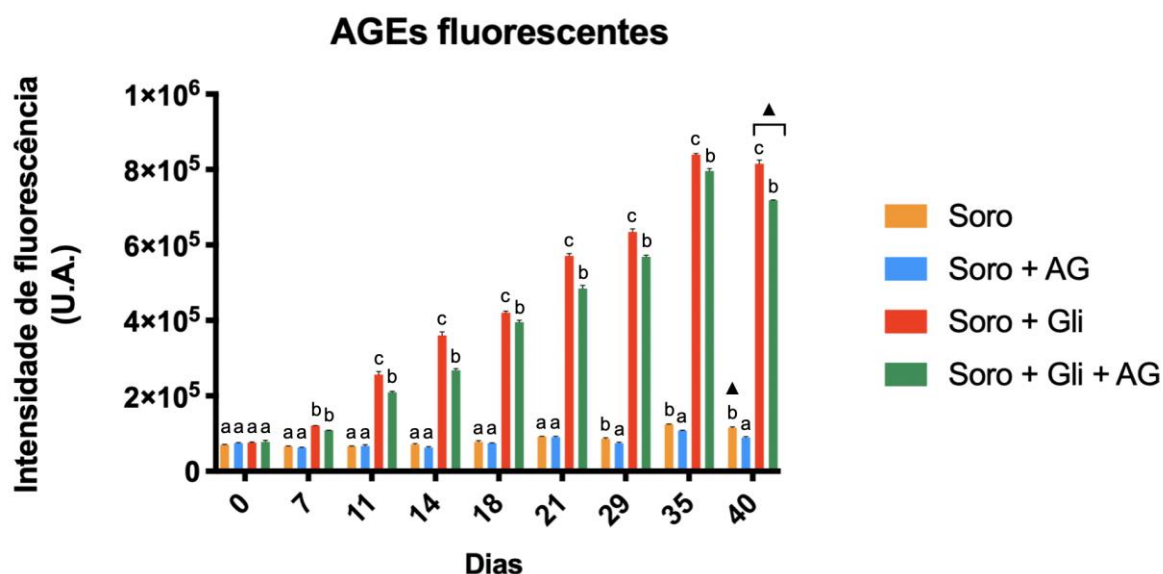
Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism 8, através de teste de variância One-way (ANOVA), seguido do teste de Newman-Keuls para comparação entre os inter-grupos. Para comparação intra-grupos (tempos 0 e 48 horas) foi utilizado o teste t Student. Diferenças estatísticas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose

A figura 9 representa os resultados relacionados à formação de AGEs fluorescentes monitorados antes do início da incubação (tempo 0) e após 7, 11, 14, 18, 21, 29, 35 e 40 dias de incubação. No decorrer dos dias de incubações de soro com glicose, a intensidade de fluorescência relativa aos AGEs aumentou progressivamente, em comparação às incubações de soro não acrescido de glicose. Após 40 dias de incubação, a intensidade de fluorescência relativa aos AGEs nas amostras soro + glicose encontram-se aumentadas em 6 vezes em relação à fluorescência obtida do soro não acrescido de glicose. Incubações de soro + glicose na presença de AG apresentaram diminuição na formação de AGEs fluorescentes, desde o dia 7 e até o dia 40, em relação às incubações soro + glicose.

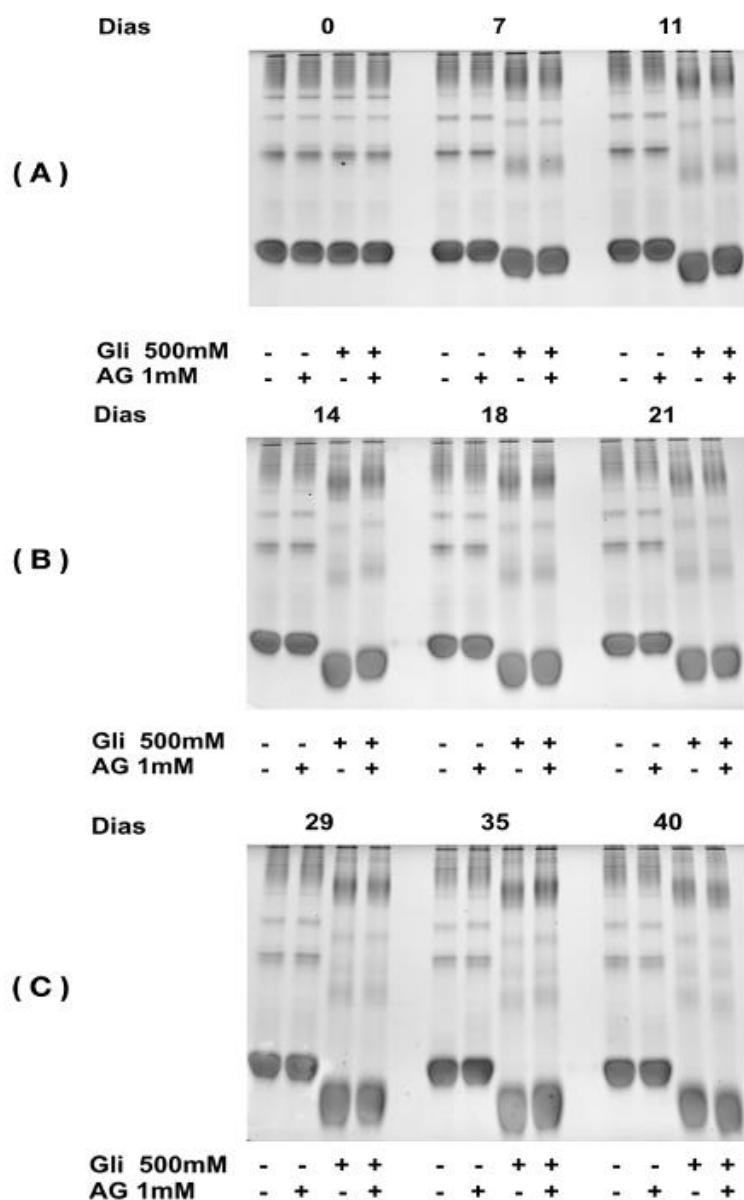
**Figura 9.** Intensidade de fluorescência relativa aos AGEs gerados em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose.



A formação de AGEs fluorescentes foi monitorado através de fluorescência em fluorímetro (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc) nos comprimentos de onda de excitação de  $\lambda 350\text{nm}$  e emissão de  $\lambda 440\text{nm}$ , em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de glicose (Gli) e/ou aminoguanidina (AG), foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 40 dias. As amostras foram diluídas na proporção 1:25 com tampão PBS. Os valores de intensidade de fluorescência (U.A.) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos no dia de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 40 dias foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo  $\blacktriangle$  indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 40 dias.

A figura 10 representa o perfil de separação eletroforética de proteínas do soro sanguíneo, antes do início da incubação (tempo 0) e após 7 e 11 dias (Figura 10A), 14, 18 e 21 dias (Figura 10B) e 29, 35 e 40 dias (Figura 10C) de incubação de amostras de soro com glicose e/ou AG. A partir de 7 dias de incubação, é possível observar o surgimento de alterações estruturais nas bandas referentes às proteínas em amostras de soro incubadas na presença de glicose, em comparação ao perfil eletroforético do soro no dia 0, incubado com ou sem glicose (Figura 10A); tais alterações podem ser visualizadas na forma de um “espalhamento” das bandas de frações proteicas. As alterações ficam mais evidentes no decorrer dos dias de incubação na presença de glicose (Figuras 10A, 10B, 10C). Um menor “espalhamento” das bandas proteicas ocorreu nas incubações de soro + glicose na presença de AG, em relação às incubações soro + glicose, reiterando o efeito protetor deste agente anti-AGE nas consequências relacionadas à glicação avançada, porém tal proteção parece ter sido observada somente até o 21º dia de incubação.

**Figura 10.** Perfil de separação eletroforética de proteínas séricas em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose.

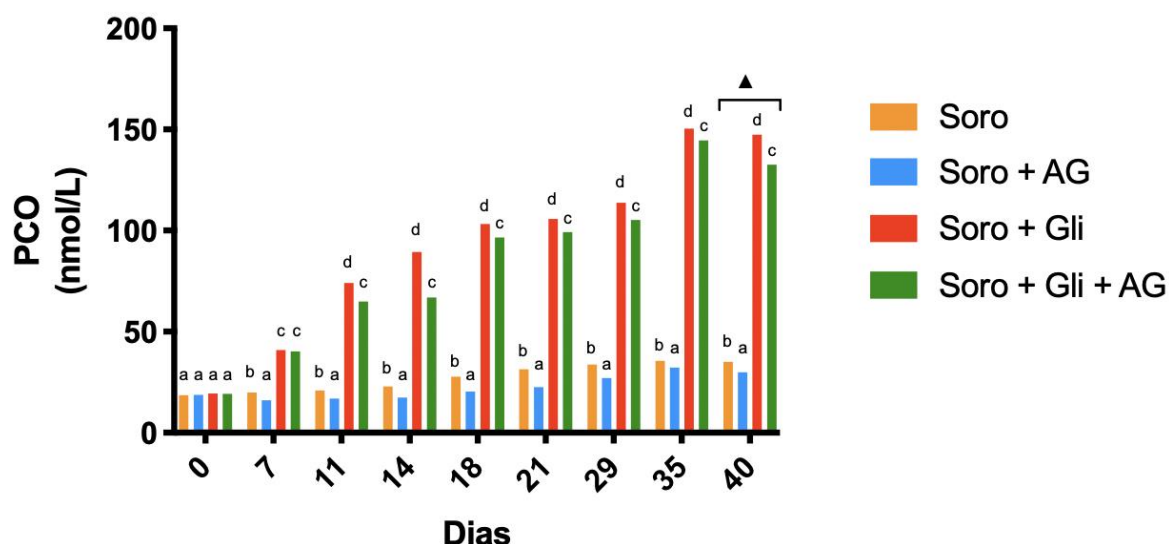


As figuras representam o perfil de separação de proteínas em eletroforese de gel de acrilamida/bisacrilamida, sob condições não-desnaturantes, de incubações de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de glicose (Gli 500mM), e/ou aminoguanidina (AG 10mM), em diferentes tempos, antes do início das incubações, após 7 e 11 dias (A), após 14, 18 e 21 dias (B), 29, 35 e 40 dias (C). Abaixo de cada figura está a legenda de ausência ( - ) ou presença ( + ) de compostos.

Na figura 11 são apresentados os resultados referentes aos níveis de PCO nas amostras de soro sanguíneo incubadas na ausência ou presença de glicose, e na ausência ou presença de AG, ao longo de 40 dias. O sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose demonstra que, com o passar do tempo, ocorre um aumento progressivo

nos níveis de PCO, em relação ao soro incubado na ausência de glicose. Uma diminuição nos níveis de PCO é observada em amostras de soro incubadas na presença de AG, na ausência ou na presença de glicose.

**Figura 11.** Níveis de PCO em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose.

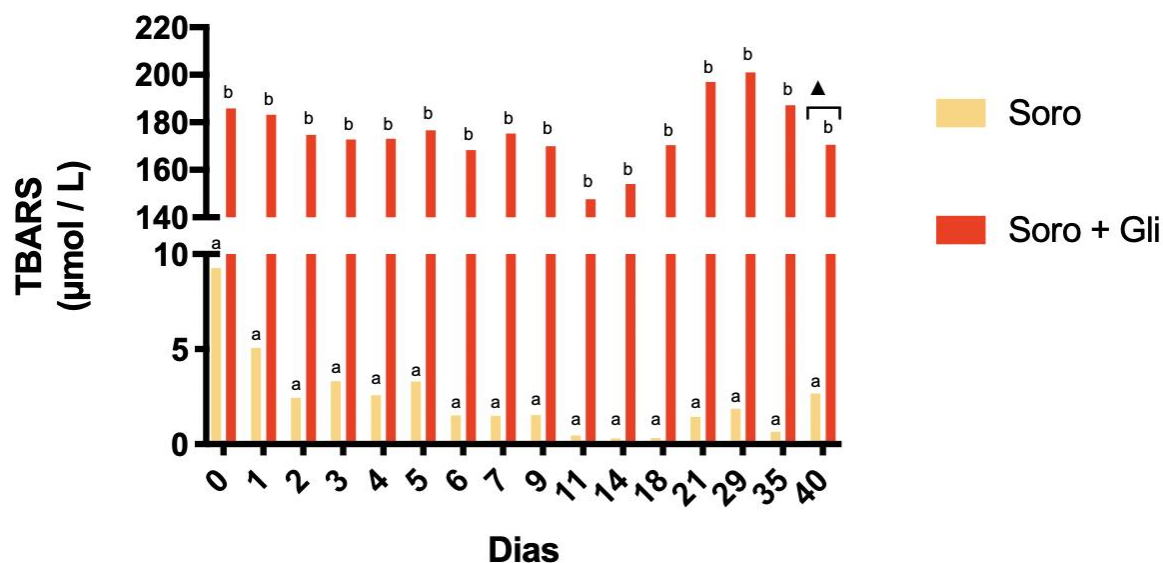


Os níveis de PCO foram monitorados espectrofotometricamente (PowerWave XS2, BioTek Instruments Inc) no comprimento de onda de  $\lambda 370\text{nm}$ , em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de glicose (Gli) e/ou aminoguanidina (AG), foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 40 dias. Os grupos carbonilas presentes nas proteínas das amostras reagem com DNPH, formando 2,4-dinitrofenilhidrazona, o qual é monitorado espectrofotometricamente. Os valores dos níveis de PCO (nmol/L) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos no dia de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 40 dias foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 40 dias.

Na figura 12 são apresentados os resultados referentes aos níveis de TBARS nas amostras de soro sanguíneo incubadas na ausência ou presença de glicose, ao longo de 40 dias. No sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose, antes do início da incubação (dia 0), já foram observados valores significativamente elevados de TBARS, em relação ao soro sem acréscimo de glicose. Tal resultado já inviabiliza, neste momento, qualquer interpretação referente às mudanças nos níveis de TBARS em relação aos diferentes tempos de incubação, considerando que, no tempo 0, não houve tempo hábil para que ocorresse peroxidação lipídica em magnitude que explique este

aumento tão significativo nos níveis de TBARS, nos fazendo sugerir, portanto, a ocorrência de alguma interferência analítica.

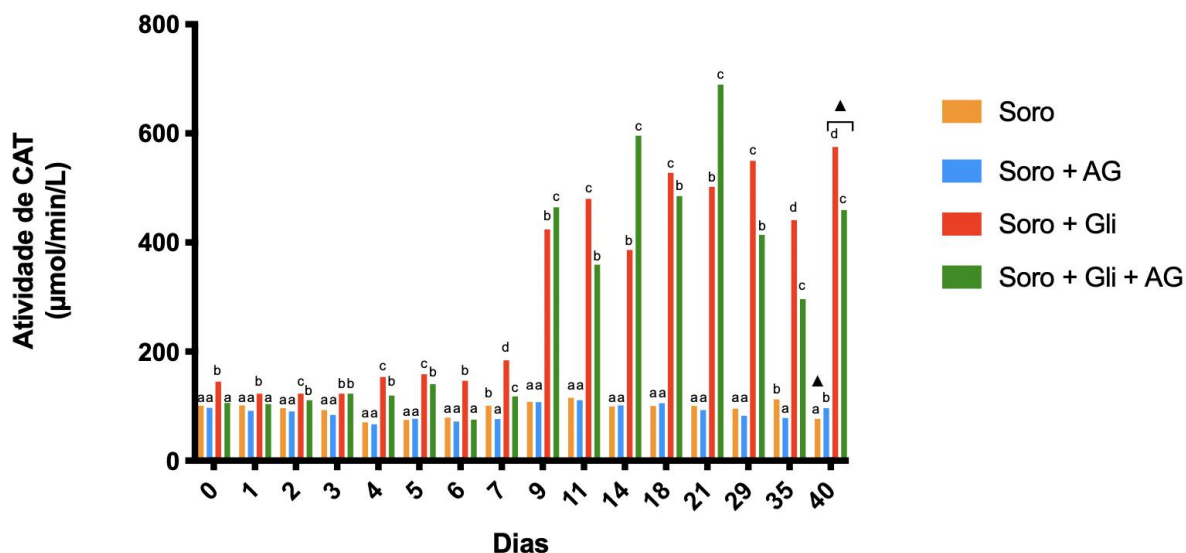
**Figura 12.** Níveis de TBARS em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose.



Os níveis de TBARS foram monitorados através de fluorescência em fluorímetro (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc) nos comprimentos de onda de excitação de  $\lambda 510\text{nm}$  e emissão de  $\lambda 553\text{nm}$ , em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de glicose (Gli), foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 40 dias. As amostras foram diluídas na proporção 1:25 com tampão PBS. Os valores dos níveis de TBARS ( $\mu\text{mol/L}$ ) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos no dia de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 40 dias foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 40 dias.

Na figura 13 são apresentados os resultados referentes à determinação da atividade da enzima antioxidante CAT em amostras de soro sanguíneo incubadas na ausência ou presença de glicose, e na ausência ou presença de AG, ao longo de 40 dias. No sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose, a atividade de CAT encontra-se elevada, em comparação à atividade nas amostras de soro incubadas sem o acréscimo de glicose, porém entre os dias 9 e 40 de incubação, a diferença entre estes grupos se tornam mais acentuadas.

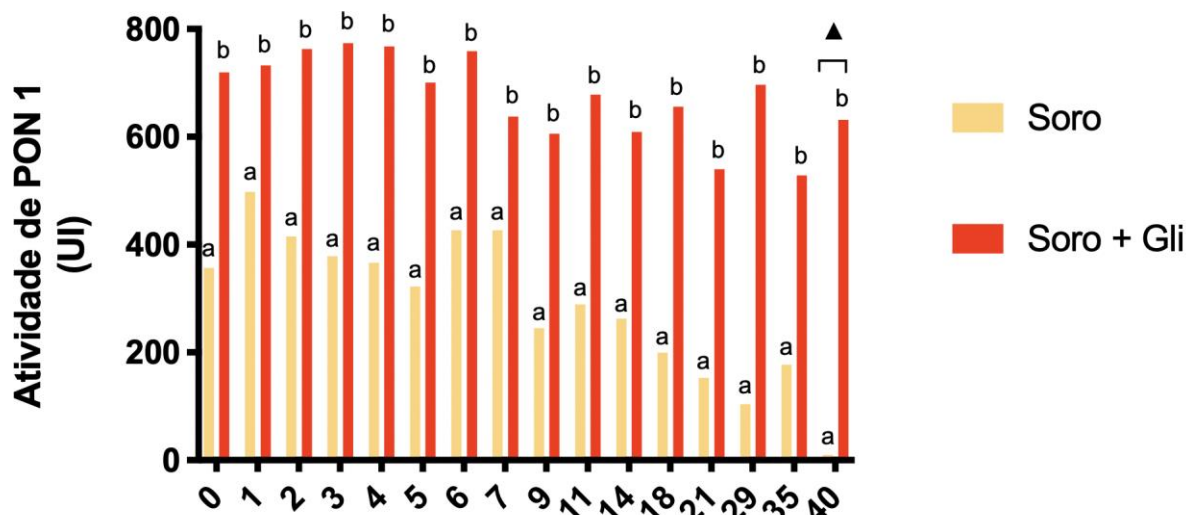
**Figura 13.** Atividade da CAT em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose.



A atividade enzimática de catalase foi determinada através da sua atividade peroxidásica, a qual foi monitorada através do equipamento PowerWave XS2, BioTek Instruments Inc no comprimento de onda de  $\lambda 540\text{nm}$ , em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de glicose (Gli) e/ou aminoguanidina (AG), foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 40 dias. A atividade de catalase pode ser monitorada através da formação de formaldeído, o qual pode reagir com o composto 4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazol (Purpald; 33,4 mM), gerando um cromóforo, o qual é monitorado espectrofotometricamente. Os valores da atividade de catalase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ ) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos no dia de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 40 dias foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 40 dias.

Na figura 14 são apresentados os resultados referentes à determinação da atividade da enzima antioxidante PON 1 em amostras de soro sanguíneo incubadas na ausência ou presença de glicose, ao longo de 40 dias. No sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose, e no dia 0, observa-se que a atividade da PON 1 apresentou-se maior (2 vezes) em comparação à atividade da enzima em amostra de soro incubado sem o acréscimo de glicose. No decorrer das incubações, amostras de soro sem acréscimo de glicose apresentaram tendência à diminuição na atividade de PON 1.

**Figura 14.** Atividade da PON 1 em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose.



A atividade de paraoxonase da PON1 foi monitorada espectrofotometricamente (PowerWave XS2, BioTek Instruments Inc) no comprimento de onda de  $\lambda 405\text{nm}$  a  $37^\circ\text{C}$ , em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de glicose (Gli), foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 40 dias. As amostras é adicionado o substrato paraoxon 1,2mM, o qual na presença de PON1 é hidrolisado, formando p-nitrofenol, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente. Os valores da atividade enzimática da paraoxonase da PON1 (UI) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos no dia de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 40 dias foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 40 dias.

#### 4.2 Estimativa dos AGEs fluorescentes e análise de modificações estruturais em proteínas em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal

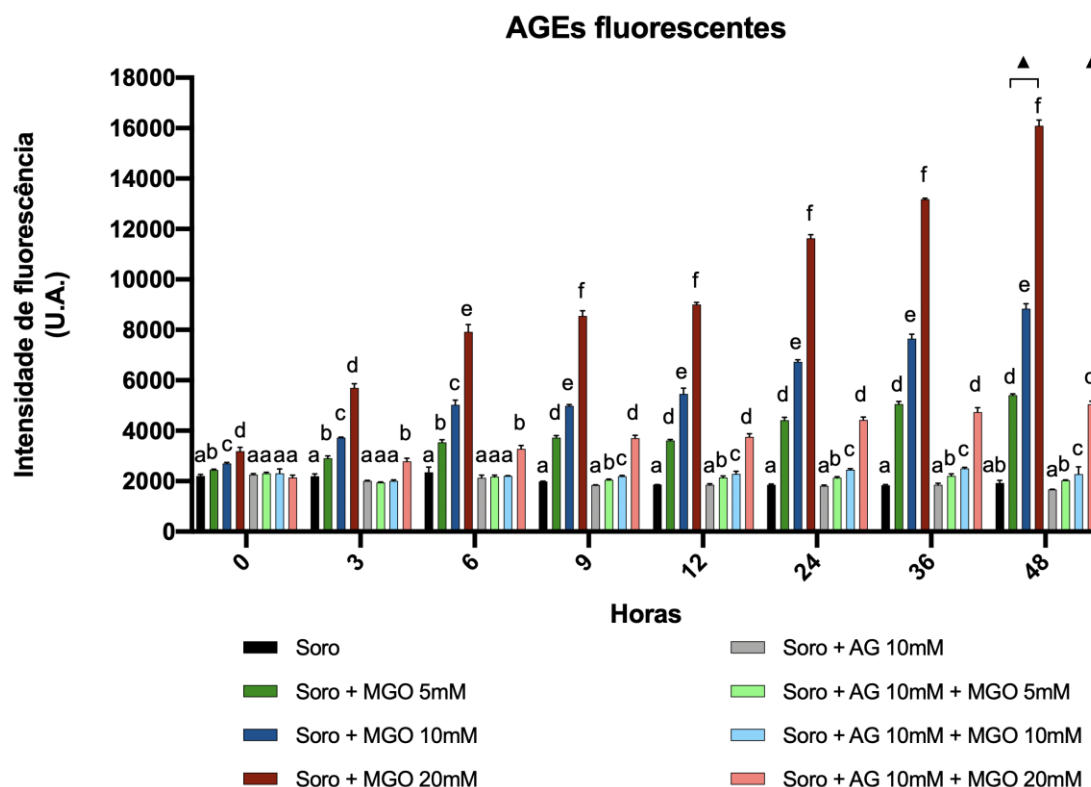
Na figura 15 são apresentados os resultados relacionados à formação de AGEs fluorescentes, monitorados antes do início das incubações (tempo 0) e após 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas de incubação. São apresentados os valores relativos aos AGEs fluorescentes obtidos do soro sanguíneo incubado na ausência ou na presença de MGO (5, 10 e 20 mM), na ausência ou na presença de AG (10 mM).

As incubações de soro + MGO, nas diferentes concentrações do composto dicarbonílico, desde o tempo 0 e no decorrer das horas de incubação, apresentaram aumentos progressivos na intensidade de fluorescência relativa aos AGEs, em comparação às incubações de soro não acrescido de MGO (Figura 15). A intensidade de fluorescência dos AGEs no soro incubado com concentrações

crescentes de MGO apresentou, ao longo do tempo, uma relação concentração dependente, isto é, quanto maior a concentração de MGO, maior a intensidade de fluorescência (Figura 15). Após 48 horas de incubação, as intensidades de fluorescência de AGEs na condição soro + MGO encontram-se aumentadas em cerca de 2,8 vezes (5 mM), 4,6 vezes (10 mM) e 8,4 vezes (20 mM), em relação aos valores de fluorescência nas incubações de soro sem a adição de MGO (Figura 15).

A presença de AG nas incubações de soro + MGO, nas diferentes concentrações de MGO (5, 10 e 20 mM), foi capaz de inibir significativamente a formação de AGEs fluorescentes, desde o tempo 0 até o término do experimento (48 horas), em comparação às amostras de soro + MGO em suas respectivas concentrações e sem AG. Após 48 horas de incubação, a adição de AG na condição soro + MGO + AG foi capaz de diminuir a formação de AGEs fluorescentes em aproximadamente 62% (5 mM), 74% (10 mM) e 68% (20 mM), em relação às respectivas incubações de soro + MGO sem a adição de AG (Figura 15).

**Figura 15.** Intensidade de fluorescência relativa aos AGEs em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal.



A formação de AGEs fluorescentes foi monitorado através de fluorescência em fluorímetro (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc) nos comprimentos de onda de excitação de  $\lambda 350\text{nm}$  e emissão de  $\lambda 440\text{nm}$ , em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO) e/ou aminoguanidina (AG), foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 48 horas. As amostras foram diluídas na proporção 1:25 com tampão PBS. Os valores de intensidade de fluorescência (U.A.) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo  $\blacktriangle$  indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

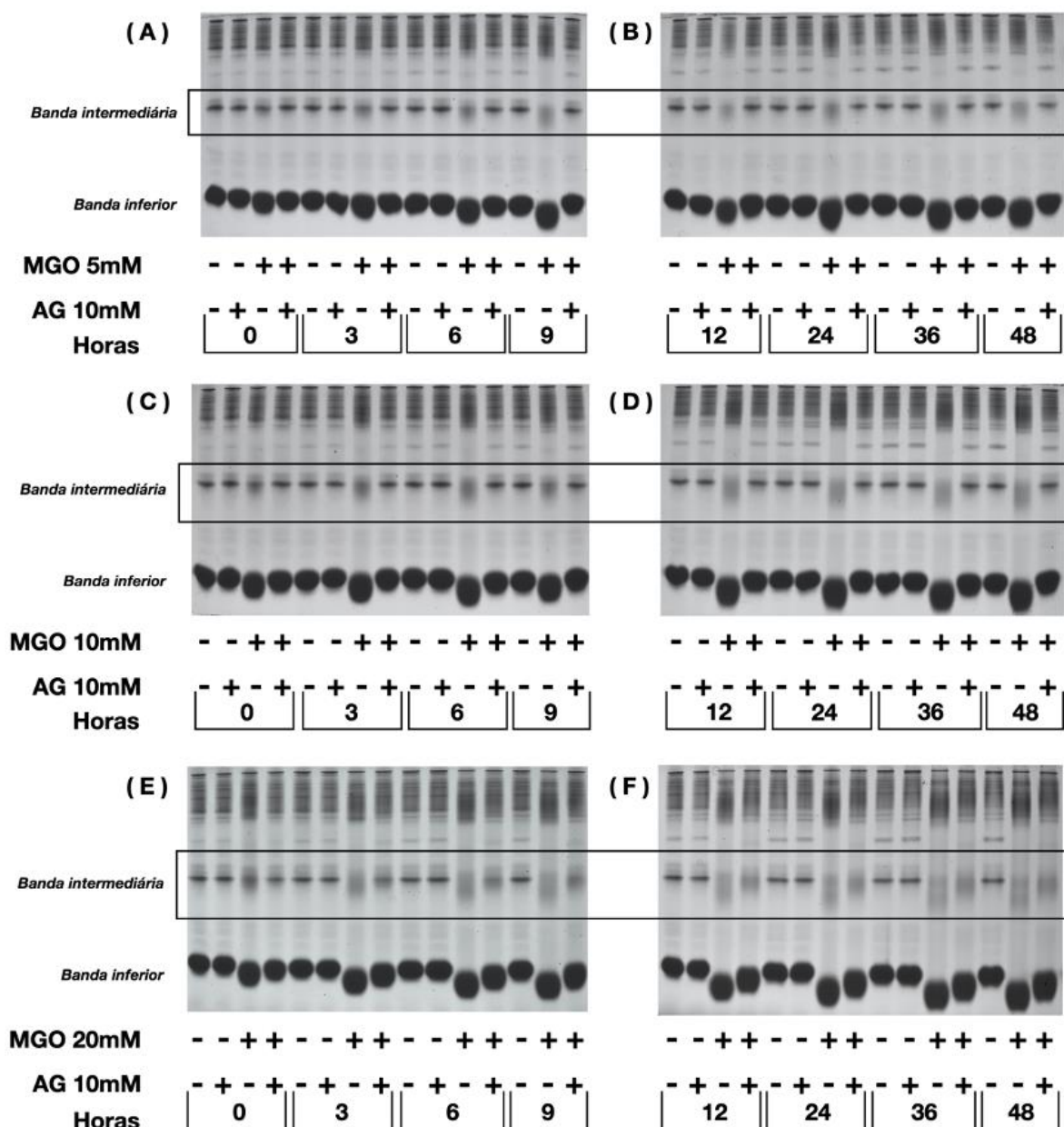
A figura 16 representa o perfil de separação eletroforética de proteínas de amostras de soro sanguíneo incubadas na ausência ou na presença de AG (10 mM) e na ausência ou na presença de MGO, sendo: concentração de 5 mM de MGO nos tempos 0, 3, 6 e 9 horas (Figura 16A) e nos tempos 12, 24, 36 e 48 horas (Figura 16B); concentração de 10 mM de MGO nos tempos 0, 3, 6 e 9 horas (Figura 16C) e nos tempos 12, 24, 36 e 48 horas (Figura 16D); concentração de 20 mM de MGO nos tempos 0, 3, 6 e 9 horas (Figura 16E) e nos tempos 12, 24, 36 e 48 horas (Figura 16F).

Em relação aos resultados das incubações de soro conduzidas na ausência ou na presença de 5 mM de MGO (Figuras 16A e 16B), foi possível observar “espalhamento” da banda intermediária nas incubações contendo soro + MGO, a

partir de 3 horas, em relação às incubações contendo somente soro, sem o acréscimo de MGO. Alterações na banda intermediária e diferenças na corrida eletroforética da banda inferior se tornam mais evidentes com o passar do tempo. A AG parece ser efetiva na proteção das proteínas séricas contra as alterações estruturais promovidas pelo MGO, uma vez que, nas incubações de soro + MGO + AG, desde o tempo 3 horas até 48 horas, não houve o “espalhamento” da banda intermediária, bem como não houve alteração na migração da banda inferior em relação às incubações soro + MGO. As incubações soro + MGO + AG mostram características de corrida eletroforética semelhantes à incubação contendo somente soro.

Em relação aos resultados das incubações conduzidas na ausência ou na presença de 10 mM de MGO (Figuras 16C e 16D) e na presença de 20 mM de MGO (Figuras 16E e 16F), desde o tempo 0, foi possível observar o “espalhamento” da banda intermediária nas incubações contendo soro + MGO, em comparação às incubações contendo somente soro; também houve aumento “espalhamento” no padrão migratório da banda inferior nas incubações soro + MGO, quando comparadas às incubações contendo somente soro. As incubações de soro + MGO + AG, na concentração de 10 mM de MGO (Figuras 16C e 16D), desde o tempo 0 até 48 horas, não foram observadas as alterações na banda intermediária ou do padrão de corrida eletroforética, quando comparadas às incubações de soro + MGO, sem a adição do agente anti-AGE. Em comparação às incubações de AG + soro + 5 mM ou AG + soro + 10 mM de MGO, a AG apresentou-se menos efetiva nas incubações de soro + 20 mM de MGO: desde o tempo de 3 horas, foi observado um menor “espalhamento” da banda intermediária e também uma menor migração da banda inferior, em comparação à incubação de soro + MGO, porém houve um aumento discreto tanto do “espalhamento” da banda intermediária quanto na migração da banda inferior, em relação à incubação contendo somente soro, sem a adição de MGO.

**Figura 16.** Perfil de separação eletroforética de proteínas séricas em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal.



As figuras representam o perfil de separação de proteínas em eletroforese de gel de acrilamida/bisacrilamida, sob condições não-desnaturantes, de incubações de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO 5mM), e/ou aminoguanidina (AG 10mM), em diferentes tempos, antes do início das incubações, após 3, 6 e 9 horas (A), após 12, 24, 36 e 48 horas (B); de incubações de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO 10mM), e/ou aminoguanidina (AG 10mM), em diferentes tempos, antes do início das incubações, após 3, 6 e 9 horas (C), após 12, 24, 36 e 48 horas (D); de incubações de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO 20mM), e/ou aminoguanidina (AG 10mM), em diferentes tempos, antes do início das incubações, após 3, 6 e 9 horas (E), após 12, 24, 36 e 48 horas (F). Abaixo de cada figura está a legenda de ausência ( - ) ou presença ( + ) de compostos.

### 4.3 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal e avaliação do potencial anti-AGE de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e naringenina

A tabela 1 apresenta os resultados referentes às concentrações de glicose das amostras de soro sanguíneo humano no tempo 0 e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, na ausência ou na presença de MGO, preparações de caule de *Siolmatra brasiliensis*, sendo essas SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL), bem como o flavonoide naringenina (400, 200 e 100 µM).

Antes do início das incubações (tempo 0), os valores de glicose das amostras soro, soro + AG e soro + MGO não diferiram entre si. Após 48 horas de incubação, amostras contendo somente soro apresentaram diminuição nos níveis de glicose (aproximadamente 8,9%), em relação ao tempo 0. Nas amostras de soro + AG, não foram observadas diferenças nos valores de glicose, em todos os tempos de incubação monitorados.

Antes do início das incubações (tempo 0) de soro + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), não foram observadas diferenças nos níveis de glicose, tanto nas comparações de soro + SbExt e soro sem o acréscimo do extrato, bem como nas comparações de soro + SbExt nas diferentes concentrações estudadas do extrato. As amostras soro + MGO + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) também não diferiram entre si, entretanto apresentam valores de glicose discretamente inferiores em relação à condição soro. Após 48 horas de incubação, os valores de glicose das amostras soro + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) diferiram entre si, e apresentam valores de glicose inferiores aos observados no tempo 0 nas comparações com suas respectivas condições, porém somente as incubações soro + SbExt 500 µg/mL e soro + SbExt 250 µg/mL apresentaram níveis de glicose inferiores em relação ao grupo soro, após 48 horas. Amostras de soro + MGO + SbExt (500 e 250 µg/mL), após 48 horas de incubação, apresentaram valores de glicose inferior à 10 mg/dL.

Amostras de soro sem MGO e acrescidas de SbCHCl<sub>3</sub> nas diferentes concentrações (250, 125 e 62,5 µg/mL), no tempo 0, não diferiram estatisticamente entre si em relação aos valores de glicose, e também não apresentaram diferenças nos valores de glicose em relação à condição soro, no mesmo tempo. Os níveis de glicose das amostras soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL), antes do início das incubações (tempo 0) também não apresentam diferenças entre si. Após

48 horas de incubação, nas amostras de soro incubadas na presença de  $\text{SbCHCl}_3$  (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), tanto na ausência quanto na presença de MGO, os valores de glicose não diferiram entre si.

Antes do início das incubações (tempo 0) de soro + NAR (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ), os valores de glicose dessas condições não diferiram entre si, e também não diferiram em relação aos valores de glicose de amostra contendo somente soro. Amostras de soro + MGO + NAR (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) também não apresentaram diferenças nos valores de glicose entre si, no tempo 0, porém apresentaram valores de glicose inferiores em comparação às amostras contendo somente soro, no mesmo tempo. Ao término da incubação (48 horas), amostras de soro + NAR (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) apresentaram valores de glicose inferiores em relação ao início da incubação (tempo 0), de aproximadamente 22%, 63% e 80%, respectivamente. Os valores de glicose das amostras de soro + MGO + NAR (400 e 200  $\mu\text{M}$ ), após 48 horas de incubação, não diferiram entre si.

**Tabela 1.** Níveis de glicose em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e naringenina.

A)

| Horas | Soro       |     | Soro + AG  |    | Soro + MGO |    | Soro + MGO + AG |    | Soro +<br>SbExt 500µg/mL | Soro +<br>SbExt 250µg/mL | Soro +<br>SbExt 125µg/mL | Soro + MGO +<br>SbExt 500µg/mL | Soro + MGO +<br>SbExt 250µg/mL | Soro + MGO +<br>SbExt 125µg/mL |            |     |            |     |            |   |
|-------|------------|-----|------------|----|------------|----|-----------------|----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------|-----|------------|-----|------------|---|
| 0     | 83,0 ± 0,6 | b   | 82,8 ± 0,9 | b  | 83,0 ± 0,6 | b  | 80,3 ± 0,9      | a  | 84,0 ± 1,2               | b                        | 83,3 ± 1,2               | b                              | 83,7 ± 0,9                     | a                              | 79,3 ± 1,2 | a   |            |     |            |   |
| 6     | 81,7 ± 1,2 | bc  | 84,0 ± 0,9 | bc | 83,3 ± 0,9 | bc | 80,3 ± 1,2      | ab | 83,7 ± 0,7               | bc                       | 84,5 ± 1,2               | bc                             | 83,0 ± 0,6                     | bc                             | 78,7 ± 0,7 | a   | 78,7 ± 0,3 | a   |            |   |
| 12    | 84,3 ± 0,7 | bc  | 85,3 ± 0,7 | c  | 86,7 ± 0,7 | c  | 83,7 ± 0,9      | ab | 86,0 ± 1,0               | c                        | 85,3 ± 1,0               | c                              | 86,0 ± 1,0                     | c                              | 82,0 ± 0,6 | a   | 81,7 ± 1,2 | a   | 82,0 ± 0,0 | a |
| 24    | 77,7 ± 0,9 | c   | 84,0 ± 0,6 | d  | 88,0 ± 0,6 | e  | 84,3 ± 0,9      | d  | 35,7 ± 2,7               | a                        | 46,2 ± 0,9               | b                              | 83,7 ± 1,5                     | d                              | 83,3 ± 0,3 | d   | 82,7 ± 0,9 | d   | 82,7 ± 0,9 | d |
| 48    | 75,7 ± 1,2 | c ▲ | 83,0 ± 1,5 | d  | 85,7 ± 2,7 | d  | 84,0 ± 0,6      | d  | < 10,0                   | a ▲                      | 25,0 ± 1,5               | b ▲                            | 73,3 ± 1,5                     | c ▲                            | < 10,0     | a ▲ | < 10,0     | a ▲ | 84,3 ± 1,2 | d |

B)

| Horas | Soro       |     | Soro + AG  |    | Soro + MGO |   | Soro + MGO + AG |    | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL |            |   |            |   |            |   |
|-------|------------|-----|------------|----|------------|---|-----------------|----|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------|---|------------|---|------------|---|
| 0     | 83,0 ± 0,6 | b   | 82,8 ± 0,9 | b  | 83,0 ± 0,6 | b | 80,3 ± 0,9      | a  | 83,3 ± 0,3                             | b                                      | 84,2 ± 0,6                              | b                                            | 83,7 ± 0,3                                   | b                                             | 79,3 ± 0,3 | a | 79,3 ± 0,3 | a | 79,0 ± 0,0 | a |
| 6     | 81,7 ± 1,2 | ab  | 84,0 ± 0,9 | ab | 83,3 ± 0,9 | b | 80,3 ± 1,2      | a  | 85,3 ± 0,3                             | c                                      | 84,7 ± 0,3                              | c                                            | 85,7 ± 0,3                                   | c                                             | 80,7 ± 1,2 | a | 80,7 ± 0,9 | a | 81,0 ± 1,2 | a |
| 12    | 84,3 ± 0,7 | b   | 85,3 ± 0,7 | bc | 86,7 ± 0,7 | c | 83,7 ± 0,9      | b  | 82,7 ± 0,7                             | b                                      | 84,3 ± 0,3                              | b                                            | 82,7 ± 0,7                                   | b                                             | 78,3 ± 1,3 | a | 77,7 ± 1,2 | a | 78,0 ± 1,5 | a |
| 24    | 77,7 ± 0,9 | a   | 84,0 ± 0,6 | bc | 88,0 ± 0,6 | d | 84,3 ± 0,9      | bc | 85,7 ± 0,9                             | c                                      | 83,8 ± 0,3                              | c                                            | 85,0 ± 1,2                                   | c                                             | 82,3 ± 0,9 | b | 82,3 ± 0,9 | b | 82,0 ± 1,2 | b |
| 48    | 75,7 ± 1,2 | a ▲ | 83,0 ± 1,5 | bc | 85,7 ± 2,7 | c | 84,0 ± 0,6      | b  | 84,3 ± 0,7                             | b                                      | 83,3 ± 0,9                              | b                                            | 84,0 ± 0,6                                   | b                                             | 82,7 ± 0,7 | b | 82,7 ± 0,7 | b | 82,7 ± 0,9 | b |

C)

| Horas | Soro       |     | Soro + AG  |    | Soro + MGO |   | Soro + MGO + AG |   | Soro +<br>NAR 400µM | Soro +<br>NAR 200µM | Soro +<br>NAR 100µM | Soro + MGO +<br>NAR 400µM | Soro + MGO +<br>NAR 200µM | Soro + MGO +<br>NAR 100µM |            |    |            |    |            |   |
|-------|------------|-----|------------|----|------------|---|-----------------|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------|----|------------|----|------------|---|
| 0     | 83,0 ± 0,6 | b   | 82,8 ± 0,9 | b  | 83,0 ± 0,6 | b | 80,3 ± 0,9      | a | 83,3 ± 0,3          | b                   | 84,3 ± 0,3          | b                         | 84,0 ± 0,0                | b                         | 79,3 ± 0,3 | a  | 78,7 ± 0,3 | a  | 80,0 ± 0,0 | a |
| 6     | 81,7 ± 1,2 | ab  | 84,0 ± 0,9 | ab | 83,3 ± 0,9 | b | 80,3 ± 1,2      | a | 85,7 ± 1,2          | c                   | 84,5 ± 1,0          | c                         | 87,7 ± 0,7                | c                         | 81,3 ± 0,9 | a  | 81,3 ± 0,9 | a  | 81,7 ± 0,3 | a |
| 12    | 84,3 ± 0,7 | b   | 85,3 ± 0,7 | bc | 86,7 ± 0,7 | c | 83,7 ± 0,9      | b | 83,0 ± 1,5          | b                   | 67,5 ± 1,0          | b                         | 82,0 ± 1,2                | ab                        | 82,0 ± 1,2 | ab | 81,3 ± 0,9 | ab | 80,3 ± 0,7 | a |
| 24    | 77,7 ± 0,9 | d   | 84,0 ± 0,6 | e  | 88,0 ± 0,6 | f | 84,3 ± 0,9      | e | 69,7 ± 0,9          | c                   | 41,5 ± 1,7          | b                         | 38,0 ± 0,6                | a                         | 82,0 ± 1,5 | e  | 82,3 ± 1,3 | e  | 78,0 ± 0,0 | d |
| 48    | 75,7 ± 1,2 | d ▲ | 83,0 ± 1,5 | ef | 85,7 ± 2,7 | f | 84,0 ± 0,6      | e | 64,7 ± 0,9          | c ▲                 | 31,0 ± 0,6          | b ▲                       | 16,7 ± 0,9                | a ▲                       | 82,3 ± 0,9 | e  | 82,0 ± 1,2 | e  | 74,3 ± 1,2 | d |

A glicemia foi monitorada em sistema automatizado utilizando química seca (Vitros250, Ortho Clinical Diagnostics), em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 48 horas. As tabelas apresentam os valores de glicemia expressos em mg/dL como médias ± erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

A tabela 2 apresenta os resultados referentes aos níveis de proteínas totais nas amostras de soro sanguíneo humano no tempo 0 e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, na ausência ou na presença de MGO, e na ausência ou na presença de SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) ou naringenina (400, 200 e 100 µM).

No tempo 0, os valores de proteínas totais em amostras das condições soro, soro + MGO e soro + MGO + AG não foram diferentes entre si, e este perfil se mantém até o tempo de incubação de 48 horas para as condições soro e soro + MGO + AG. Os níveis de proteínas totais nas amostras soro + MGO apresentaram discretos aumentos (aproximadamente de 7%), quando comparados aos valores encontrados em soro e soro + MGO + AG, após 48 horas de incubação. Após 48 horas de incubação, todas as condições (soro; soro + AG; soro + MGO) apresentaram discretos aumentos na concentração de proteínas totais, em relação às respectivas amostras no tempo 0.

No tempo 0, nas incubações de soro + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), tanto na ausência quanto na presença de MGO, não foram observadas diferenças nos níveis de proteínas totais, seja na comparação entre as amostras contendo diferentes concentrações do extrato, seja na comparação com os valores obtidos em amostras contendo somente soro. Após o término das incubações (48 horas), as amostras soro + MGO + SbExt, nas diferentes concentrações do extrato, não mostraram diferenças entre si em relação aos níveis de proteínas totais, e também não diferiram dos níveis de proteínas totais das amostras contendo somente soro. Porém, foi possível observar um aumento discreto nos níveis de proteínas totais nas amostras soro + SbExt (500, 250 µg/mL) e soro + MGO + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), no tempo 48 horas, em comparação ao tempo 0.

Antes do início das incubações de soro + SbCHCl<sub>3</sub> e soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL), os níveis de proteínas totais não diferiram das respectivas condições soro e soro + MGO; o mesmo ocorreu após 48 horas de incubação. Porém no tempo 48 horas, os valores de proteínas totais das incubações soro + SbCHCl<sub>3</sub> 62,5µg/mL e soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) apresentaram-se discretamente superiores, em relação ao tempo 0.

No tempo 0, os níveis de proteínas totais das amostras de soro + MGO + NAR (400, 200 e 100 µM) não apresentaram diferenças entre si. Após 48 horas de incubação, amostras contendo soro + MGO + NAR (400, 200 e 100 µM)

apresentaram aumento nos valores de proteínas totais, em relação ao tempo 0, enquanto a condição soro + MGO + NAR (400 e 200 $\mu$ M) apresentou discretas alterações na concentração de proteínas totais, em comparação ao tempo 0.

**Tabela 2.** Níveis de proteínas totais em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e naringenina.

| A) | Horas | Soro             | Soro + AG       | Soro + MGO      | Soro + MGO + AG | Soro +          | Soro +          | Soro +         | Soro + MGO +    | Soro + MGO +     | Soro + MGO +     |
|----|-------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|
|    |       |                  |                 |                 |                 | SbExt 500µg/mL  | SbExt 250µg/mL  | SbExt 125µg/mL | SbExt 500µg/mL  | SbExt 250µg/mL   | SbExt 125µg/mL   |
|    | 0     | 6,85 ± 0,03 b    | 5,42 ± 0,02 a   | 6,76 ± 0,04 b   | 6,80 ± 0,04 b   | 7,00 ± 0,05 c   | 7,02 ± 0,07 c   | 6,99 ± 0,08 c  | 6,73 ± 0,05 b   | 6,80 ± 0,05 b    | 6,79 ± 0,04 b    |
|    | 6     | 6,95 ± 0,09 c    | 5,39 ± 0,05 a   | 7,06 ± 0,09 c   | 7,03 ± 0,06 c   | 7,12 ± 0,04 c   | 7,07 ± 0,07 c   | 7,10 ± 0,06 c  | 6,83 ± 0,07 b   | 6,81 ± 0,04 b    | 6,84 ± 0,07 b    |
|    | 12    | 7,06 ± 0,03 c    | 5,59 ± 0,04 a   | 7,22 ± 0,01 d   | 7,10 ± 0,03 c   | 7,25 ± 0,08 d   | 7,28 ± 0,03 d   | 7,28 ± 0,04 d  | 6,95 ± 0,09 b   | 7,01 ± 0,10 b    | 6,96 ± 0,06 b    |
|    | 24    | 7,09 ± 0,08 c    | 5,61 ± 0,03 a   | 7,44 ± 0,07 e   | 6,95 ± 0,02 b   | 7,24 ± 0,04 c   | 7,31 ± 0,03 c   | 7,39 ± 0,01 d  | 7,12 ± 0,06 b   | 7,13 ± 0,05 b    | 7,07 ± 0,06 b    |
|    | 48    | 7,23 ± 0,05 bc ▲ | 5,87 ± 0,09 a ▲ | 7,71 ± 0,11 d ▲ | 7,15 ± 0,09 b   | 7,61 ± 0,07 d ▲ | 7,57 ± 0,05 d ▲ | 7,27 ± 0,10 bc | 7,32 ± 0,05 c ▲ | 7,30 ± 0,03 bc ▲ | 7,27 ± 0,05 bc ▲ |

| B) | Horas | Soro            | Soro + AG       | Soro + MGO      | Soro + MGO + AG | Soro +                       | Soro +                       | Soro +                        | Soro + MGO +                 | Soro + MGO +                 | Soro + MGO +                  |
|----|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
|    |       |                 |                 |                 |                 | SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL | SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL | SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL | SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL | SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL | SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL |
|    | 0     | 6,85 ± 0,03 d   | 5,42 ± 0,02 a   | 6,76 ± 0,04 d   | 6,80 ± 0,04 d   | 6,82 ± 0,06 d                | 6,83 ± 0,06 d                | 6,83 ± 0,05 d                 | 6,47 ± 0,07 b                | 6,58 ± 0,03 bc               | 6,63 ± 0,08 c                 |
|    | 6     | 6,95 ± 0,09 b   | 5,39 ± 0,05 a   | 7,06 ± 0,09 b   | 7,03 ± 0,06 b   | 7,40 ± 0,07 c                | 7,46 ± 0,06 c                | 7,39 ± 0,06 c                 | 7,07 ± 0,04 b                | 7,06 ± 0,03 b                | 7,07 ± 0,06 b                 |
|    | 12    | 7,06 ± 0,03 d   | 5,59 ± 0,04 a   | 7,22 ± 0,01 e   | 7,10 ± 0,03 d   | 6,92 ± 0,03 c                | 6,96 ± 0,08 c                | 6,96 ± 0,08 c                 | 6,66 ± 0,03 b                | 6,71 ± 0,09 bc               | 6,84 ± 0,07 c                 |
|    | 24    | 7,09 ± 0,08 bc  | 5,61 ± 0,03 a   | 7,44 ± 0,07 e   | 6,95 ± 0,02 b   | 7,11 ± 0,03 c                | 7,23 ± 0,05 d                | 7,31 ± 0,05 d                 | 6,92 ± 0,02 b                | 7,03 ± 0,06 c                | 7,22 ± 0,08 d                 |
|    | 48    | 7,23 ± 0,05 d ▲ | 5,87 ± 0,09 a ▲ | 7,71 ± 0,11 e ▲ | 7,15 ± 0,09 cd  | 7,05 ± 0,06 cd               | 7,09 ± 0,08 cd               | 7,19 ± 0,05 d ▲               | 6,85 ± 0,04 b ▲              | 6,94 ± 0,03 bc ▲             | 7,05 ± 0,03 c ▲               |

| C) | Horas | Soro            | Soro + AG       | Soro + MGO      | Soro + MGO + AG | Soro +        | Soro +         | Soro +        | Soro + MGO +    | Soro + MGO +    | Soro + MGO +   |
|----|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|----------------|---------------|-----------------|-----------------|----------------|
|    |       |                 |                 |                 |                 | NAR 400µM     | NAR 200µM      | NAR 100µM     | NAR 400µM       | NAR 200µM       | NAR 100µM      |
|    | 0     | 6,85 ± 0,03 c   | 5,42 ± 0,02 a   | 6,76 ± 0,04 c   | 6,80 ± 0,04 c   | 6,84 ± 0,09 c | 7,13 ± 0,07 cd | 7,02 ± 0,02 d | 6,57 ± 0,07 b   | 6,60 ± 0,06 b   | 6,75 ± 0,08 bc |
|    | 6     | 6,95 ± 0,09 cd  | 5,39 ± 0,05 a   | 7,06 ± 0,09 cd  | 7,03 ± 0,06 cd  | 7,27 ± 0,04 e | 7,26 ± 0,05 e  | 7,17 ± 0,02 d | 7,13 ± 0,06 cd  | 7,03 ± 0,04 c   | 6,80 ± 0,01 b  |
|    | 12    | 7,06 ± 0,03 c   | 5,59 ± 0,04 a   | 7,22 ± 0,01 c   | 7,10 ± 0,03 c   | 7,13 ± 0,06 c | 7,24 ± 0,01 cd | 7,17 ± 0,05 c | 6,96 ± 0,03 b   | 6,96 ± 0,04 b   | 6,97 ± 0,08 b  |
|    | 24    | 7,09 ± 0,08 c   | 5,61 ± 0,03 a   | 7,44 ± 0,07 d   | 6,95 ± 0,02 c   | 7,37 ± 0,04 d | 7,23 ± 0,05 d  | 7,02 ± 0,05 c | 7,13 ± 0,08 cd  | 7,02 ± 0,07 c   | 6,78 ± 0,05 b  |
|    | 48    | 7,23 ± 0,05 d ▲ | 5,87 ± 0,09 a ▲ | 7,71 ± 0,11 e ▲ | 7,15 ± 0,09 d   | 7,27 ± 0,06 d | 7,18 ± 0,03 d  | 6,96 ± 0,01 c | 7,18 ± 0,09 d ▲ | 6,94 ± 0,04 c ▲ | 6,66 ± 0,04 b  |

A proteína total foi monitorada em sistema automatizado utilizando química seca (Vitros250, Ortho Clinical Diagnostics), em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 48 horas. As tabelas apresentam os valores de proteínas totais expressos em g/dL como médias ± erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

A tabela 3 apresenta os resultados referentes aos níveis de albumina nas amostras de soro sanguíneo humano no tempo 0 e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, na ausência ou na presença de MGO, e na ausência ou na presença de SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) ou naringenina (400, 200 e 100 µM).

Amostras contendo soro, soro + AG, soro + MGO + AG, no tempo 0, apresentaram níveis de albumina semelhantes entre si. Já na condição soro + MGO, foi possível observar uma diminuição (11%) nos valores de albumina sérica, em relação às demais condições, no tempo 0. Após 48 horas de incubação, houve aumento nos valores de albumina, nas condições soro, soro + AG, soro + MGO, soro + MGO + AG, em relação aos valores encontrados no tempo 0.

Os níveis de albumina nas amostras de soro + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) ou soro + MGO + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) não foram diferentes entre si, antes do início da incubação (tempo 0). Após 48 horas de incubação, os valores de albumina aumentaram, nas condições soro + SbExt e soro + MGO + SbExt, em relação ao tempo 0.

Os valores de albumina nas condições soro + SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL), no tempo 0, não foram diferentes entre si; esse mesmo perfil de resposta pode ser observado nas condições soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL). Ao término do período de incubação (48 horas), nas condições soro + SbCHCl<sub>3</sub> nas diferentes concentrações, bem como soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> nas diferentes concentrações, foram observados aumentos nos valores de albumina, em comparação às respectivas condições, no tempo 0.

Antes do início das incubações (tempo 0), os níveis de albumina presentes nas amostras soro + NAR (400, 200 e 100 µM) apresentam valores semelhantes aos níveis de albumina da amostra contendo somente soro. Amostras de soro + MGO + NAR (400, 200 e 100 µM), no tempo 0, apresentam valores de albumina semelhantes entre si. Após 48 horas de incubação, as amostras soro + NAR (400, 200 e 100 µM) e soro + MGO + NAR (400, 200 e 100 µM) apresentam aumentos nos valores de albumina, em comparação às mesmas condições no tempo 0.

**Tabela 3.** Níveis de albumina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e naringenina.

| A) | Horas | Soro            | Soro + AG       | Soro + MGO      | Soro + MGO + AG | Soro +          | Soro +          | Soro +          | Soro + MGO +    | Soro + MGO +     | Soro + MGO +    |
|----|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
|    |       |                 |                 |                 |                 | SbExt 500µg/mL  | SbExt 250µg/mL  | SbExt 125µg/mL  | SbExt 500µg/mL  | SbExt 250µg/mL   | SbExt 125µg/mL  |
|    | 0     | 4,97 ± 0,06 c   | 4,97 ± 0,03 c   | 4,44 ± 0,04 a   | 5,00 ± 0,07 c   | 5,02 ± 0,09 c   | 5,04 ± 0,09 c   | 5,03 ± 0,08 c   | 4,49 ± 0,05 ab  | 4,47 ± 0,05 ab   | 4,54 ± 0,08 b   |
|    | 6     | 5,00 ± 0,06 b   | 5,00 ± 0,05 b   | 4,73 ± 0,06 a   | 5,11 ± 0,05 b   | 5,08 ± 0,05 b   | 5,10 ± 0,08 b   | 5,03 ± 0,06 b   | 4,71 ± 0,07 a   | 4,75 ± 0,07 a    | 4,77 ± 0,07 a   |
|    | 12    | 5,19 ± 0,05 b   | 5,29 ± 0,05 c   | 4,99 ± 0,04 a   | 5,48 ± 0,03 d   | 5,36 ± 0,08 c   | 5,38 ± 0,06 c   | 5,30 ± 0,03 c   | 4,98 ± 0,06 a   | 5,00 ± 0,04 a    | 5,06 ± 0,04 a   |
|    | 24    | 4,90 ± 0,05 c   | 4,90 ± 0,04 c   | 4,63 ± 0,04 a   | 5,02 ± 0,04 c   | 5,02 ± 0,03 c   | 5,00 ± 0,04 c   | 4,95 ± 0,02 c   | 4,72 ± 0,02 b   | 4,72 ± 0,01 b    | 4,73 ± 0,03 b   |
|    | 48    | 5,32 ± 0,04 c ▲ | 5,37 ± 0,05 c ▲ | 5,07 ± 0,04 a ▲ | 5,65 ± 0,05 e ▲ | 5,56 ± 0,04 d ▲ | 5,53 ± 0,03 d ▲ | 5,47 ± 0,05 d ▲ | 5,22 ± 0,03 b ▲ | 5,25 ± 0,03 bc ▲ | 5,31 ± 0,03 c ▲ |

| B) | Horas | Soro            | Soro + AG       | Soro + MGO      | Soro + MGO + AG | Soro +                       | Soro +                       | Soro +                        | Soro + MGO +                 | Soro + MGO +                 | Soro + MGO +                  |
|----|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
|    |       |                 |                 |                 |                 | SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL | SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL | SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL | SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL | SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL | SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL |
|    | 0     | 4,97 ± 0,06 c   | 4,97 ± 0,03 c   | 4,44 ± 0,04 a   | 5,00 ± 0,07 c   | 4,80 ± 0,06 b                | 4,84 ± 0,06 b                | 4,87 ± 0,08 bc                | 4,36 ± 0,05 a                | 4,38 ± 0,04 a                | 4,41 ± 0,04 a                 |
|    | 6     | 5,00 ± 0,06 c   | 5,00 ± 0,05 c   | 4,73 ± 0,06 a   | 5,11 ± 0,05 d   | 5,23 ± 0,10 de               | 5,24 ± 0,04 e                | 5,24 ± 0,07 e                 | 4,91 ± 0,08 b                | 4,95 ± 0,07 b                | 4,96 ± 0,06 b                 |
|    | 12    | 5,19 ± 0,05 cd  | 5,29 ± 0,05 d   | 4,99 ± 0,04 b   | 5,48 ± 0,03 e   | 5,15 ± 0,06 c                | 5,14 ± 0,07 c                | 5,15 ± 0,07 c                 | 4,78 ± 0,07 a                | 4,83 ± 0,06 a                | 4,84 ± 0,08 a                 |
|    | 24    | 4,90 ± 0,05 c   | 4,90 ± 0,04 c   | 4,63 ± 0,04 b   | 5,02 ± 0,04 d   | 4,88 ± 0,02 bc               | 4,89 ± 0,08 bc               | 4,94 ± 0,05 c                 | 4,62 ± 0,04 a                | 4,70 ± 0,06 ab               | 4,81 ± 0,05 b                 |
|    | 48    | 5,32 ± 0,04 d ▲ | 5,37 ± 0,05 d ▲ | 5,07 ± 0,04 b ▲ | 5,65 ± 0,05 e ▲ | 5,18 ± 0,07 c ▲              | 5,24 ± 0,03 cd ▲             | 5,35 ± 0,04 d ▲               | 4,93 ± 0,05 a ▲              | 5,05 ± 0,06 b ▲              | 5,16 ± 0,04 c ▲               |

| C) | Horas | Soro            | Soro + AG       | Soro + MGO      | Soro + MGO + AG | Soro +          | Soro +          | Soro +          | Soro + MGO +    | Soro + MGO +     | Soro + MGO +    |
|----|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
|    |       |                 |                 |                 |                 | NAR 400µM       | NAR 200µM       | NAR 100µM       | NAR 400µM       | NAR 200µM        | NAR 100µM       |
|    | 0     | 4,97 ± 0,06 cd  | 4,97 ± 0,03 cd  | 4,44 ± 0,04 a   | 5,00 ± 0,07 cd  | 4,92 ± 0,06 cd  | 4,92 ± 0,03 c   | 5,02 ± 0,03 d   | 4,41 ± 0,02 a   | 4,47 ± 0,03 ab   | 4,53 ± 0,01 b   |
|    | 6     | 5,00 ± 0,06 b   | 5,00 ± 0,05 b   | 4,73 ± 0,06 a   | 5,11 ± 0,05 c   | 5,31 ± 0,04 d   | 5,33 ± 0,03 d   | 5,13 ± 0,03 bc  | 5,06 ± 0,04 bc  | 5,03 ± 0,07 bc   | 4,71 ± 0,03 a   |
|    | 12    | 5,19 ± 0,05 c   | 5,29 ± 0,05 cd  | 4,99 ± 0,04 a   | 5,48 ± 0,03 f   | 5,49 ± 0,07 f   | 5,31 ± 0,04 d   | 5,37 ± 0,01 e   | 5,25 ± 0,07 c   | 5,00 ± 0,04 a    | 5,02 ± 0,03 a   |
|    | 24    | 4,90 ± 0,05 c   | 4,90 ± 0,04 c   | 4,63 ± 0,04 b   | 5,02 ± 0,04 d   | 5,01 ± 0,01 d   | 4,95 ± 0,06 d   | 4,64 ± 0,02 b   | 4,62 ± 0,03 b   | 4,61 ± 0,03 b    | 4,33 ± 0,03 a   |
|    | 48    | 5,32 ± 0,04 d ▲ | 5,37 ± 0,05 d ▲ | 5,07 ± 0,04 b ▲ | 5,65 ± 0,05 f ▲ | 5,49 ± 0,06 e ▲ | 5,51 ± 0,04 e ▲ | 5,21 ± 0,03 c ▲ | 5,23 ± 0,08 c ▲ | 5,10 ± 0,05 bc ▲ | 4,84 ± 0,05 a ▲ |

A albumina foi monitorada em sistema automatizado utilizando química seca (Vitros250, Ortho Clinical Diagnostics), em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 48 horas. As tabelas apresentam os valores de albumina expressos em g/dL como médias ± erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

A tabela 4 apresenta os resultados referentes aos níveis de ALT (monitorados via atividade da enzima) nas amostras de soro sanguíneo humano no tempo 0 e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, na ausência ou na presença de MGO, e na ausência ou na presença de SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) ou naringenina (400, 200 e 100 µM).

No tempo 0, amostras de soro acrescidas de AG (soro + AG) ou de MGO (soro + MGO) apresentam diminuição na atividade de ALT, em relação às amostras contendo somente soro. Nas amostras de soro acrescidas de MGO e AG (soro + MGO + AG), as atividades de ALT também estão diminuídas, porém pouco maiores em relação aos valores observados nas condições soro + AG e soro + MGO. Após 48 horas de incubação, diminuições na atividade de ALT foram observadas, nas diversas condições estudadas. As amostras contendo somente soro apresentaram diminuição de 32% na atividade de ALT, após 48 horas de incubação, em relação ao tempo 0. Amostras de soro + AG apresentaram diminuição de 57% na atividade de ALT, em relação à atividade da enzima antes do início da incubação. Amostras de soro acrescidas de MGO (soro + MGO e soro + MGO + AG) não apresentaram alteração na atividade de ALT, em relação ao tempo 0.

A adição de SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) em amostras de soro, antes de serem iniciadas as incubações, não causaram alterações na atividade da ALT, tanto nas comparações entre as diferentes concentrações do extrato, quanto nas comparações presença e ausência de extrato. Amostras de soro + MGO + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), antes do início das incubações, não diferiram entre si em relação à atividade da ALT, porém apresentam diminuição da atividade da enzima (58%) em relação aos valores da amostra soro, e não diferiram do grupo soro + MGO. Após 48 horas de incubação, amostras soro + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) apresentaram diversos perfis de alteração na atividade de ALT, em relação ao tempo 0: aumento de 82% na atividade de ALT na condição soro + SbExt 500 µg/mL, ausência de alteração na atividade de ALT na condição soro + SbExt 250 µg/mL, e diminuição de 35% na atividade de ALT na condição soro + SbExt 125 µg/mL. Após 48 horas de incubação, amostras de soro + MGO + SbExt nas concentrações de 500 e 250 µg/mL apresentaram aumentos (3,4 e 2,5 vezes, respectivamente) na atividade de ALT, em relação ao tempo 0, enquanto não houve

alteração significativa na atividade da enzima em amostra de soro + MGO + SbExt na concentração de 125 µg/mL.

Antes do início das incubações (tempo 0), as atividades de ALT não foram alteradas nas amostras soro + SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL), seja na comparação dessas condições entre si, seja na comparação de soro + SbCHCl<sub>3</sub> *versus* soro sem o acréscimo de SbCHCl<sub>3</sub>. Ao término da incubação (48 horas), as atividades de ALT nas amostras de soro + SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) apresentaram valores semelhantes entre si, e também semelhantes aos valores encontrados no soro sem o acréscimo de SbCHCl<sub>3</sub>. No tempo 0, soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) apresentaram valores de atividade de ALT semelhantes entre si (11,7 U/L, 11,7 U/L e 10,7 U/L, respectivamente), porém esses valores são significativamente menores em relação à atividade da enzima na condição soro (24,0 U/L). Após 48 horas de incubação, as atividades de ALT nas amostras soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) não diferiram entre si (10,3 U/L), porém foram maiores em relação aos valores de soro + MGO (8,0 U/L), no tempo 48 horas.

No tempo 0, nas amostras de soro + NAR em suas diferentes concentrações, a atividade da ALT não foi diferente na comparação dessas condições entre si, e também não diferiram em relação aos valores encontrados na amostra de soro sem o flavonoide, no mesmo tempo. Após 48 horas de incubação, amostras soro + NAR (400, 200 e 100 µM) apresentam maiores valores de atividade de ALT (10,4%, 22,7%, 28,8%, respectivamente) em relação aos valores encontrados na condição soro. Após 48 horas de incubação, amostras soro + MGO + NAR (400, 200 e 100 µM) apresentam valores de atividade de ALT semelhantes entre si (12,7 U/L, 11,3 U/L e 11,7 U/L, respectivamente), porém esses valores foram maiores em relação à atividade de ALT encontrada na condição soro + MGO (8,0 U/L).

**Tabela 4.** Níveis de ALT em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e naringenina.

| <b>A)</b> |                |               |             |                 |                                        |                                        |                                         |                                              |                                              |                                               |  |
|-----------|----------------|---------------|-------------|-----------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|--|
| Horas     | Soro           | Soro + AG     | Soro + MGO  | Soro + MGO + AG | Soro +<br>SbExt 500µg/mL               | Soro +<br>SbExt 250µg/mL               | Soro +<br>SbExt 125µg/mL                | Soro + MGO +<br>SbExt 500µg/mL               | Soro + MGO +<br>SbExt 250µg/mL               | Soro + MGO +<br>SbExt 125µg/mL                |  |
| 0         | 24,0 ± 0,0 d   | 9,3 ± 0,3 a   | 9,0 ± 0,6 a | 13,0 ± 0,6 c    | 24,3 ± 0,3 d                           | 24,0 ± 0,6 d                           | 24,3 ± 0,3 d                            | 10,0 ± 0,6 a                                 | 10,0 ± 0,6 a                                 | 10,0 ± 0,6 a                                  |  |
| 6         | 23,0 ± 0,6 d   | 10,0 ± 0,3 b  | 7,3 ± 0,3 a | 15,7 ± 0,3 c    | 24,3 ± 0,9 d                           | 24,0 ± 0,6 d                           | 23,7 ± 0,9 d                            | 9,7 ± 0,3 b                                  | 10,3 ± 0,7 b                                 | 10,3 ± 0,7 b                                  |  |
| 12        | 23,7 ± 0,3 e   | 10,0 ± 0,3 b  | 8,3 ± 0,3 a | 15,7 ± 0,3 d    | 24,3 ± 0,3 e                           | 24,3 ± 0,3 e                           | 24,7 ± 0,3 e                            | 10,7 ± 0,3 b                                 | 10,7 ± 0,3 b                                 | 11,0 ± 0,0 b                                  |  |
| 24        | 22,3 ± 0,3 e   | 6,7 ± 0,3 b   | 8,3 ± 0,3 a | 13,0 ± 0,0 d    | 25,0 ± 0,6 g                           | 23,3 ± 0,3 f                           | 22,3 ± 0,3 e                            | 11,0 ± 0,0 c                                 | 11,0 ± 0,0 c                                 | 11,0 ± 0,0 c                                  |  |
| 48        | 16,3 ± 0,3 d ▲ | 4,0 ± 0,0 a ▲ | 8,0 ± 0,0 b | 11,7 ± 0,3 c    | 44,3 ± 0,9 g ▲                         | 25,7 ± 0,9 e                           | 15,7 ± 0,9 d ▲                          | 33,7 ± 0,9 f ▲                               | 24,7 ± 0,7 e ▲                               | 11,0 ± 0,0 c                                  |  |
| <b>B)</b> |                |               |             |                 |                                        |                                        |                                         |                                              |                                              |                                               |  |
| Horas     | Soro           | Soro + AG     | Soro + MGO  | Soro + MGO + AG | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL |  |
| 0         | 24,0 ± 0,0 e   | 9,3 ± 0,3 a   | 9,0 ± 0,6 a | 13,0 ± 0,6 d    | 24,3 ± 0,3 ef                          | 24,7 ± 0,3 f                           | 24,7 ± 0,3 f                            | 11,7 ± 0,3 c                                 | 11,7 ± 0,3 c                                 | 10,7 ± 0,3 b                                  |  |
| 6         | 23,0 ± 0,6 e   | 10,0 ± 0,3 b  | 7,3 ± 0,3 a | 15,7 ± 0,3 d    | 24,3 ± 0,3 f                           | 23,7 ± 0,3 ef                          | 23,3 ± 0,3 e                            | 11,3 ± 0,3 c                                 | 11,0 ± 0,0 c                                 | 10,7 ± 0,3 c                                  |  |
| 12        | 23,7 ± 0,3 e   | 10,0 ± 0,3 bc | 8,3 ± 0,3 a | 15,7 ± 0,3 d    | 24,3 ± 0,3 e                           | 23,7 ± 0,7 e                           | 23,7 ± 0,3 e                            | 10,0 ± 0,0 b                                 | 10,7 ± 0,3 c                                 | 10,3 ± 0,3 bc                                 |  |
| 24        | 22,3 ± 0,3 f   | 6,7 ± 0,3 b   | 8,3 ± 0,3 a | 13,0 ± 0,0 e    | 22,3 ± 0,3 f                           | 22,3 ± 0,3 f                           | 22,7 ± 0,3 f                            | 11,3 ± 0,3 d                                 | 11,3 ± 0,3 d                                 | 10,7 ± 0,3 c                                  |  |
| 48        | 16,3 ± 0,3 f ▲ | 4,0 ± 0,0 a ▲ | 8,0 ± 0,0 b | 11,7 ± 0,3 d    | 15,7 ± 0,3 f ▲                         | 15,0 ± 0,0 e ▲                         | 15,7 ± 0,3 f ▲                          | 10,3 ± 0,3 c                                 | 10,3 ± 0,3 c                                 | 10,3 ± 0,3 c                                  |  |
| <b>C)</b> |                |               |             |                 |                                        |                                        |                                         |                                              |                                              |                                               |  |
| Horas     | Soro           | Soro + AG     | Soro + MGO  | Soro + MGO + AG | Soro +<br>NAR 400µM                    | Soro +<br>NAR 200µM                    | Soro +<br>NAR 100µM                     | Soro + MGO +<br>NAR 400µM                    | Soro + MGO +<br>NAR 200µM                    | Soro + MGO +<br>NAR 100µM                     |  |
| 0         | 24,0 ± 0,0 e   | 9,3 ± 0,3 a   | 9,0 ± 0,6 a | 13,0 ± 0,6 d    | 24,3 ± 0,3 e                           | 24,3 ± 0,3 e                           | 24,7 ± 0,3 e                            | 11,3 ± 0,3 c                                 | 10,7 ± 0,3 cb                                | 10,3 ± 0,3 b                                  |  |
| 6         | 23,0 ± 0,6 f   | 10,0 ± 0,3 b  | 7,3 ± 0,3 a | 15,7 ± 0,3 e    | 23,7 ± 0,3 f                           | 23,7 ± 0,3 f                           | 23,7 ± 0,3 f                            | 11,7 ± 0,3 d                                 | 10,7 ± 0,3 c                                 | 11,0 ± 0,0 c                                  |  |
| 12        | 23,7 ± 0,3 ef  | 10,0 ± 0,3 b  | 8,3 ± 0,3 a | 15,7 ± 0,3 d    | 23,7 ± 0,3 ef                          | 24,3 ± 0,3 f                           | 23,3 ± 0,3 e                            | 11,0 ± 0,0 c                                 | 10,7 ± 0,3 bc                                | 11,0 ± 0,0 c                                  |  |
| 24        | 22,3 ± 0,3 e   | 6,7 ± 0,3 b   | 8,3 ± 0,3 a | 13,0 ± 0,0 d    | 23,3 ± 0,3 e                           | 23,7 ± 0,3 e                           | 23,7 ± 0,3 e                            | 11,3 ± 0,3 c                                 | 11,0 ± 0,0 c                                 | 11,0 ± 0,0 c                                  |  |
| 48        | 16,3 ± 0,3 f ▲ | 4,0 ± 0,0 a ▲ | 8,0 ± 0,0 b | 11,7 ± 0,3 d    | 18,0 ± 0,6 g ▲                         | 20,0 ± 0,0 h ▲                         | 21,0 ± 0,6 i ▲                          | 12,7 ± 0,3 e                                 | 11,3 ± 0,3 c                                 | 11,7 ± 0,7 cde                                |  |

Os níveis de ALT foram monitoradas em sistema automatizado utilizando química seca (Vitros250, Ortho Clinical Diagnostics), em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 48 horas. As tabelas apresentam os níveis de ALT expressos em U/L como médias ± erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

A tabela 5 apresenta os resultados referentes aos níveis de triglicerídeos nas amostras de soro sanguíneo humano no tempo 0 e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, na ausência ou na presença de MGO, e na ausência ou na presença de SbExt (500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ ),  $\text{SbCHCl}_3$  (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) ou naringenina (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ).

No tempo 0, os níveis de triglicerídeos foram semelhantes entre si nas amostras soro, soro + MGO e soro + MGO + AG. Porém, após 48 horas de incubação, os níveis de triglicerídeos nas amostras soro e soro + MGO + AG foram discretamente maiores (8%), em relação aos valores observados no tempo 0, e não diferiram entre si ao término da incubação (48 horas). Nas amostras soro + MGO também houve aumento (13%) nos níveis de triglicerídeos, em relação ao tempo 0, e esses valores foram superiores àqueles encontrados nas condições soro e soro + MGO + AG, após 48 horas.

Antes do início das incubações, amostras soro + MGO + SbExt (500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ ) não apresentaram diferenças entre si em relação aos níveis de triglicerídeos. Já após 48 horas de incubação, houve uma discreta alteração nos níveis desse lipídeo, em relação ao tempo 0, onde a menor concentração de SbExt promoveu menor aumento nos níveis de triglicerídeos: as taxas de aumento nos níveis de triglicerídeos nas amostras soro + MGO + SbExt 500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$  foram de 10,5%, 7,9% e 7,2%, respectivamente, na comparação entre o tempo 0 *versus* 48 horas.

No tempo 0, a adição de  $\text{SbCHCl}_3$  nas diferentes concentrações estudadas (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), em soro ou soro + MGO, não promoveu alterações nos níveis de triglicerídeos, sendo esses valores semelhantes aos encontrados na amostra contendo somente soro. Após 48 horas de incubação, houve discreto aumento nos níveis de triglicerídeos na condição soro +  $\text{SbCHCl}_3$  na ausência de MGO, em relação ao tempo 0, sendo esses aumentos de 9,65% (250  $\mu\text{g/mL}$ ), 9,97% (125  $\mu\text{g/mL}$ ) e 11,11% (62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), o mesmo pode ser observado em amostras soro + MGO +  $\text{SbCHCl}_3$  os quais apresentaram aumento de 7,01% (250  $\mu\text{g/mL}$ ), 6,97% (125  $\mu\text{g/mL}$ ) e 6,95% (62,5  $\mu\text{g/mL}$ ).

As incubações de soro + MGO na presença de NAR nas concentrações de 400, 200  $\mu\text{M}$ , e antes do início da incubação (tempo 0), não apresentam diferenças entre si nos níveis de triglicerídeos. O avanço da incubação não causou mudanças nos níveis de triglicerídeos; porém, após 48 horas de incubação, NAR nas

concentrações de 400 e 200  $\mu\text{M}$  promoveu um discreto aumento no conteúdo de triglicerídeos (5,2 e 5,8% respectivamente), em relação ao tempo 0, enquanto incubações na presença de NAR 100  $\mu\text{M}$  apresentaram níveis de triglicerídeos semelhantes na comparação tempo 0 *versus* tempo 48 horas.

**Tabela 5.** Níveis de triglicerídeos em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e naringenina.

|    |       |             |     |             |     |             |     |                 |     |                          |          |                          |     |                          |     |                                |     |                                |      |                                |     |
|----|-------|-------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-----------------|-----|--------------------------|----------|--------------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------------|-----|--------------------------------|------|--------------------------------|-----|
| A) | Horas | Soro        |     | Soro + AG   |     | Soro + MGO  |     | Soro + MGO + AG |     | Soro +<br>SbExt 500µg/mL |          | Soro +<br>SbExt 250µg/mL |     | Soro +<br>SbExt 125µg/mL |     | Soro + MGO +<br>SbExt 500µg/mL |     | Soro + MGO +<br>SbExt 250µg/mL |      | Soro + MGO +<br>SbExt 125µg/mL |     |
|    | 0     | 118,7 ± 1,5 | ab  | 119,0 ± 1,2 | ab  | 118,0 ± 1,0 | a   | 119,0 ± 1,2     | ab  | 118,0 ± 1,0              | a        | 121,3 ± 1,3              | b   | 119,7 ± 0,9              | ab  | 117,0 ± 1,5                    | a   | 117,7 ± 1,2                    | a    | 117,3 ± 1,5                    | a   |
|    | 6     | 119,3 ± 1,5 | ab  | 120,3 ± 0,9 | ab  | 125,3 ± 0,9 | d   | 120,3 ± 0,9     | ab  | 125,3 ± 0,9              | d        | 122,3 ± 1,5              | c   | 121,3 ± 0,9              | bc  | 117,7 ± 1,9                    | a   | 118,0 ± 1,5                    | a    | 118,7 ± 1,5                    | a   |
|    | 12    | 123,3 ± 0,3 | b   | 124,3 ± 0,9 | b   | 127,3 ± 1,3 | c   | 124,3 ± 0,9     | b   | 127,3 ± 1,3              | c        | 126,7 ± 1,2              | c   | 126,0 ± 1,2              | c   | 121,0 ± 0,6                    | a   | 121,0 ± 1,5                    | a    | 120,7 ± 0,7                    | a   |
|    | 24    | 123,3 ± 0,9 | ab  | 125,0 ± 1,2 | b   | 128,0 ± 1,5 | c   | 125,0 ± 1,2     | b   | 128,0 ± 1,5              | c        | 126,0 ± 1,7              | bc  | 126,3 ± 1,5              | bc  | 121,7 ± 1,2                    | a   | 122,0 ± 1,0                    | a    | 121,3 ± 1,3                    | a   |
|    | 48    | 128,3 ± 0,9 | b ▲ | 132,0 ± 0,6 | c ▲ | 134,0 ± 0,6 | d ▲ | 129,7 ± 0,9     | b ▲ | 133,0                    | 0,6 cd ▲ | 130,7 ± 0,9              | b ▲ | 125,0 ± 0,6              | a ▲ | 129,7 ± 0,9                    | b ▲ | 127,0 ± 1,5                    | ab ▲ | 125,7 ± 0,9                    | a ▲ |

|    |       |             |     |             |     |             |     |                 |     |                                        |     |                                        |     |                                         |     |                                              |     |                                              |     |                                               |     |
|----|-------|-------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-----------------|-----|----------------------------------------|-----|----------------------------------------|-----|-----------------------------------------|-----|----------------------------------------------|-----|----------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------|-----|
| B) | Horas | Soro        |     | Soro + AG   |     | Soro + MGO  |     | Soro + MGO + AG |     | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL |     | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL |     | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL |     | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL |     | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL |     | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL |     |
|    | 0     | 118,7 ± 1,5 | bc  | 119,0 ± 1,2 | c   | 118,0 ± 1,0 | bc  | 119,0 ± 1,2     | c   | 117,0 ± 1,2                            | bc  | 117,3 ± 1,2                            | bc  | 117,0 ± 0,6                             | b   | 114,3 ± 0,9                                  | a   | 114,7 ± 0,9                                  | a   | 115,0 ± 1,2                                   | a   |
|    | 6     | 119,3 ± 1,5 | a   | 120,3 ± 0,9 | a   | 125,3 ± 0,9 | b   | 120,3 ± 0,9     | a   | 124,3 ± 1,8                            | b   | 123,7 ± 1,2                            | b   | 123,7 ± 1,2                             | b   | 119,3 ± 1,5                                  | a   | 119,7 ± 0,9                                  | a   | 119,7 ± 1,8                                   | a   |
|    | 12    | 123,3 ± 0,3 | c   | 124,3 ± 0,9 | c   | 127,3 ± 1,3 | d   | 124,3 ± 0,9     | c   | 120,0 ± 1,5                            | b   | 120,3 ± 1,3                            | b   | 120,7 ± 1,7                             | b   | 116,0 ± 2,0                                  | a   | 115,7 ± 1,2                                  | a   | 116,0 ± 1,5                                   | a   |
|    | 24    | 123,3 ± 0,9 | b   | 125,0 ± 1,2 | b   | 128,0 ± 1,5 | c   | 125,0 ± 1,2     | b   | 125,7 ± 0,9                            | bc  | 127,7 ± 0,9                            | c   | 126,0 ± 1,7                             | bc  | 120,7 ± 0,7                                  | a   | 121,0 ± 1,7                                  | a   | 121,0 ± 1,2                                   | a   |
|    | 48    | 128,3 ± 0,9 | b ▲ | 132,0 ± 0,6 | c ▲ | 134,0 ± 0,6 | d ▲ | 129,7 ± 0,9     | b ▲ | 128,3 ± 1,8                            | b ▲ | 129,0 ± 2,1                            | b ▲ | 130,0 ± 1,0                             | b ▲ | 122,0 ± 1,5                                  | a ▲ | 122,7 ± 1,5                                  | a ▲ | 123,0 ± 1,0                                   | a ▲ |

|    |       |             |      |             |     |             |     |                 |     |                     |     |                     |     |                     |     |                           |     |                           |     |                           |     |
|----|-------|-------------|------|-------------|-----|-------------|-----|-----------------|-----|---------------------|-----|---------------------|-----|---------------------|-----|---------------------------|-----|---------------------------|-----|---------------------------|-----|
| C) | Horas | Soro        |      | Soro + AG   |     | Soro + MGO  |     | Soro + MGO + AG |     | Soro +<br>NAR 400µM |     | Soro +<br>NAR 200µM |     | Soro +<br>NAR 100µM |     | Soro + MGO +<br>NAR 400µM |     | Soro + MGO +<br>NAR 200µM |     | Soro + MGO +<br>NAR 100µM |     |
|    | 0     | 118,7 ± 1,5 | bc   | 119,0 ± 1,2 | c   | 118,0 ± 1,0 | bc  | 119,0 ± 1,2     | c   | 117,3 ± 1,2         | b   | 117,3 ± 0,3         | b   | 119,7 ± 0,3         | c   | 115,0 ± 1,0               | a   | 115,0 ± 0,6               | a   | 118,0 ± 0,6               | b   |
|    | 6     | 119,3 ± 1,5 | b    | 120,3 ± 0,9 | b   | 125,3 ± 0,9 | d   | 120,3 ± 0,9     | b   | 123,3 ± 0,3         | c   | 123,7 ± 0,3         | c   | 119,0 ± 0,6         | b   | 120,3 ± 0,7               | b   | 119,0 ± 0,6               | b   | 115,7 ± 0,3               | a   |
|    | 12    | 123,3 ± 0,3 | b    | 124,3 ± 0,9 | b   | 127,3 ± 1,3 | c   | 124,3 ± 0,9     | b   | 123,7 ± 0,9         | b   | 123,7 ± 0,9         | b   | 123,3 ± 0,9         | b   | 119,0 ± 1,2               | a   | 118,3 ± 1,2               | a   | 119,7 ± 0,9               | a   |
|    | 24    | 123,3 ± 0,9 | cd   | 125,0 ± 1,2 | d   | 128,0 ± 1,5 | e   | 125,0 ± 1,2     | d   | 122,0 ± 1,0         | bc  | 121,7 ± 1,2         | bc  | 114,3 ± 0,3         | a   | 120,0 ± 0,6               | b   | 120,3 ± 0,7               | b   | 114,7 ± 0,3               | a   |
|    | 48    | 128,3 ± 0,9 | de ▲ | 132,0 ± 0,6 | e ▲ | 134,0 ± 0,6 | g ▲ | 129,7 ± 0,9     | e ▲ | 127,0 ± 1,0         | d ▲ | 127,3 ± 1,2         | d ▲ | 124,3 ± 0,7         | c ▲ | 121,0 ± 2,1               | b ▲ | 121,7 ± 1,3               | b ▲ | 117,7 ± 0,9               | a ▲ |

Os níveis de triglicerídeos foram monitorados em sistema automatizado utilizando química seca (Vitros250, Ortho Clinical Diagnostics), em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 48 horas. As tabelas apresentam os valores de triglicerídeos expressos em mg/dL como médias ± erro padrão da média (EPM) (*n* = 3). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas (*p*<0,05) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas (*p*<0,05) entre os tempos 0 e 48 horas.

A tabela 6 apresenta os resultados referentes aos níveis de colesterol total nas amostras de soro sanguíneo humano no tempo 0 e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, na ausência ou na presença de MGO, e na ausência ou na presença de SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) ou naringenina (400, 200 e 100 µM).

No tempo 0, os níveis de colesterol total nas amostras soro, soro + MGO e soro + MGO + AG não foram diferentes entre si. Após 48 horas de incubação, as amostras soro, soro + MGO e soro + MGO + AG também não diferiram entre si em relação aos níveis desse lipídeo. Ainda no tempo 48 horas não foi possível observar alteração nos níveis de colesterol total, em relação ao tempo 0, nas amostras soro, soro + MGO e soro + MGO + AG.

Antes do início (tempo 0), bem como ao término das incubações (tempo 48 horas), as amostras soro + MGO + SbExt nas diferentes concentrações (500, 200 e 125 µg/mL) não diferiram entre si em relação aos níveis de colesterol total. Entretanto, na comparação tempo 0 *versus* tempo 48 horas, não foi possível observar alterações nos níveis de colesterol total, nas amostras após 48 horas de incubação.

No tempo 0, as incubações de soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) não diferiram entre si em relação aos níveis de colesterol total; o mesmo perfil foi mantido após 48 horas de incubação. Já na comparação tempo 0 *versus* 48 horas, amostras soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) apresentaram discretos aumentos nos níveis de colesterol, após 48 horas de incubação.

Nas incubações de soro + NAR (400, 200 e 100 µM), antes do início das incubações, os níveis de colesterol total não diferiram entre si, e também não diferiram dos níveis de colesterol de amostras contendo somente soro. Ainda antes do início das incubações, nas amostras de soro + MGO + NAR (400, 200 e 100 µM), os níveis de colesterol estão discretamente diminuídos nas incubações soro + MGO + NAR 400 µM, em relação às incubações soro + MGO + NAR 200 µM e soro + MGO + NAR 100 µM. Após 48 horas de incubação, amostras soro + NAR (400 e 200 µM) não diferiram entre si e apresentam valores superiores de colesterol total, em relação às incubações contendo somente soro. Já soro + NAR 100 µM apresentou menores níveis de colesterol total em relação à soro + NAR 400 ou 200 µM, e não diferiu de amostras contendo somente soro. Os níveis de colesterol nas incubações soro + MGO + NAR 400 µM e soro + MGO + NAR 200 µM não diferiram

entre si, e também não foram diferentes das incubações soro, soro + MGO, soro + MGO + AG, no tempo 48 horas.

**Tabela 6.** Níveis de colesterol total em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e naringenina.

A)

| Horas | Soro        |    | Soro + AG   |    | Soro + MGO  |    | Soro + MGO + AG |    | Soro +<br>SbExt 500µg/mL | Soro +<br>SbExt 250µg/mL | Soro +<br>SbExt 125µg/mL | Soro + MGO +<br>SbExt 500µg/mL | Soro + MGO +<br>SbExt 250µg/mL | Soro + MGO +<br>SbExt 125µg/mL |             |   |             |   |             |    |
|-------|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-----------------|----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------|---|-------------|---|-------------|----|
| 0     | 178,7 ± 2,0 | bc | 177,3 ± 2,8 | bc | 180,0 ± 2,4 | bc | 176,0 ± 2,1     | ab | 177,0 ± 1,5              | b                        | 179,3 ± 0,9              | bc                             | 181,7 ± 1,7                    | c                              | 175,0 ± 0,6 | a | 174,7 ± 0,3 | a | 176,0 ± 1,0 | ab |
| 6     | 174,7 ± 1,3 | b  | 176,3 ± 2,0 | bc | 177,3 ± 2,0 | bc | 175,0 ± 2,1     | bc | 177,0 ± 1,5              | bc                       | 177,0 ± 1,0              | bc                             | 178,3 ± 1,2                    | c                              | 169,0 ± 1,2 | a | 171,0 ± 0,6 | a | 170,7 ± 1,7 | a  |
| 12    | 185,0 ± 1,0 | b  | 184,0 ± 1,5 | b  | 186,3 ± 1,8 | bc | 184,7 ± 1,2     | b  | 187,7 ± 2,2              | bc                       | 188,0 ± 1,0              | c                              | 187,3 ± 0,3                    | c                              | 178,3 ± 1,9 | a | 179,0 ± 1,5 | a | 180,3 ± 1,2 | a  |
| 24    | 184,7 ± 0,9 | bc | 183,7 ± 0,9 | bc | 185,7 ± 1,5 | c  | 183,0 ± 1,2     | b  | 186,3 ± 0,7              | c                        | 186,0 ± 0,6              | c                              | 186,3 ± 0,3                    | c                              | 179,0 ± 0,6 | a | 179,7 ± 1,9 | a | 180,3 ± 0,9 | a  |
| 48    | 181,0 ± 1,0 | a  | 182,0 ± 0,6 | a  | 183,0 ± 1,2 | a  | 181,0 ± 1,5     | a  | 186,0 ± 1,7              | b                        | 185,7 ± 2,7              | ab                             | 187,3 ± 2,0                    | b                              | 182,7 ± 2,0 | a | 182,0 ± 1,5 | a | 182,3 ± 1,3 | a  |

B)

| Horas | Soro        |    | Soro + AG   |    | Soro + MGO  |    | Soro + MGO + AG |    | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL |             |    |             |   |             |    |
|-------|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-----------------|----|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------|----|-------------|---|-------------|----|
| 0     | 178,7 ± 2,0 | bc | 177,3 ± 2,8 | bc | 180,0 ± 2,4 | bc | 176,0 ± 2,1     | b  | 178,3 ± 1,5                            | bc                                     | 178,3 ± 1,7                             | bc                                           | 178,3 ± 1,2                                  | bc                                            | 172,3 ± 1,8 | a  | 172,7 ± 1,3 | a | 173,0 ± 1,5 | a  |
| 6     | 174,7 ± 1,3 | a  | 176,3 ± 2,0 | a  | 177,3 ± 2,0 | a  | 175,0 ± 2,1     | a  | 182,3 ± 1,2                            | b                                      | 183,3 ± 1,5                             | b                                            | 181,7 ± 0,9                                  | b                                             | 175,0 ± 1,5 | a  | 175,0 ± 1,5 | a | 177,7 ± 2,4 | a  |
| 12    | 185,0 ± 1,0 | c  | 184,0 ± 1,5 | c  | 186,3 ± 1,8 | c  | 184,7 ± 1,2     | c  | 181,3 ± 1,3                            | b                                      | 181,7 ± 0,3                             | b                                            | 181,0 ± 1,2                                  | b                                             | 171,0 ± 1,5 | a  | 172,0 ± 2,1 | a | 173,0 ± 1,5 | a  |
| 24    | 184,7 ± 0,9 | b  | 183,7 ± 0,9 | ab | 185,7 ± 1,5 | bc | 183,0 ± 1,2     | ab | 186,7 ± 1,2                            | c                                      | 186,7 ± 1,5                             | c                                            | 185,7 ± 0,9                                  | b                                             | 182,7 ± 3,3 | ab | 180,7 ± 2,3 | a | 182,3 ± 2,3 | ab |
| 48    | 181,0 ± 1,0 | a  | 182,0 ± 0,6 | a  | 183,0 ± 1,2 | ab | 181,0 ± 1,5     | a  | 185,3 ± 1,7                            | b                                      | 185,7 ± 1,2                             | b                                            | 185,7 ± 0,9                                  | b                                             | 183,0 ± 0,6 | a  | 182,0 ± 1,2 | a | 183,0 ± 1,0 | ab |

C)

| Horas | Soro        |    | Soro + AG   |    | Soro + MGO  |    | Soro + MGO + AG |    | Soro +<br>NAR 400µM | Soro +<br>NAR 200µM | Soro +<br>NAR 100µM | Soro + MGO +<br>NAR 400µM | Soro + MGO +<br>NAR 200µM | Soro + MGO +<br>NAR 100µM |             |    |             |    |             |   |
|-------|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-----------------|----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|----|-------------|----|-------------|---|
| 0     | 178,7 ± 2,0 | bc | 177,3 ± 2,8 | bc | 180,0 ± 2,4 | bc | 176,0 ± 2,1     | b  | 179,7 ± 0,7         | c                   | 178,7 ± 0,9         | bc                        | 180,7 ± 0,9               | c                         | 173,7 ± 1,2 | a  | 174,3 ± 1,9 | ab | 176,0 ± 0,6 | b |
| 6     | 174,7 ± 1,3 | b  | 176,3 ± 2,0 | bc | 177,3 ± 2,0 | bc | 175,0 ± 2,1     | bc | 181,7 ± 0,9         | d                   | 182,7 ± 0,9         | d                         | 178,3 ± 1,2               | c                         | 174,3 ± 0,9 | b  | 174,7 ± 1,3 | b  | 167,3 ± 0,9 | a |
| 12    | 185,0 ± 1,0 | b  | 184,0 ± 1,5 | b  | 186,3 ± 1,8 | bc | 184,7 ± 1,2     | b  | 183,7 ± 1,2         | b                   | 184,7 ± 0,7         | b                         | 187,0 ± 0,6               | c                         | 178,7 ± 0,9 | a  | 178,0 ± 1,5 | a  | 178,7 ± 1,2 | a |
| 24    | 184,7 ± 0,9 | de | 183,7 ± 0,9 | de | 185,7 ± 1,5 | ef | 183,0 ± 1,2     | d  | 187,0 ± 0,6         | f                   | 186,0 ± 0,6         | f                         | 182,0 ± 0,6               | c                         | 179,7 ± 0,3 | b  | 179,0 ± 1,5 | b  | 173,3 ± 0,3 | a |
| 48    | 181,0 ± 1,0 | bc | 182,0 ± 0,6 | c  | 183,0 ± 1,2 | cd | 181,0 ± 1,5     | bc | 184,7 ± 0,7         | d                   | 184,3 ± 1,2         | d                         | 179,7 ± 0,7               | b                         | 181,0 ± 1,5 | bc | 179,7 ± 1,5 | bc | 176,0 ± 0,6 | a |

Os níveis de colesterol total foram monitorados em sistema automatizado utilizando química seca (Vitros250, Ortho Clinical Diagnostics), em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 48 horas. As tabelas apresentam os valores de colesterol total expressos em mg/dL como médias ± erro padrão da média (EPM) (*n* = 3). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas (*p* < 0,05) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas (*p* < 0,05) entre os tempos 0 e 48 horas.

A tabela 7 apresenta os resultados referentes aos níveis de HDL-colesterol nas amostras de soro sanguíneo humano no tempo 0 e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, na ausência ou na presença de MGO, e na ausência ou na presença de SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) ou naringenina (400, 200 e 100 µM).

Antes do início das incubações, as amostras soro, soro + MGO e soro + MGO + AG não apresentaram diferenças entre si em relação aos níveis de HDL-colesterol. Após 12 horas de incubação, as amostras das condições soro, soro + AG, soro + MGO e soro + MGO + AG apresentaram aumentos nos valores de HDL-colesterol, em relação ao tempo 0, de aproximadamente 9,8%, 9,2%, 2,0% e 5,4%, respectivamente. Ao término da incubação (48 horas), não foram observadas alterações nos níveis de HDL-colesterol nas amostras soro, soro + AG, soro + MGO e soro + MGO + AG, em relação às respectivas amostras no tempo 0.

No tempo 0, as amostras de soro + MGO + SbExt, nas diferentes concentrações de extrato estudadas, não diferiram entre si em relação aos níveis de HDL-colesterol. Após 48 horas de incubação, as amostras soro + MGO + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) não apresentaram alterações nos níveis de HDL-colesterol quando comparadas ao tempo 0.

No tempo 0, a amostra soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> 125 µg/mL apresentou um discreto aumento (3,6%) nos níveis de HDL-colesterol, quando comparada à condição soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> 250 µg/mL, enquanto a condição soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> 62,5µg/mL não apresentou diferença nos níveis de HDL-colesterol em comparação às outras duas condições previamente citadas. Após 48 horas de incubação, as amostras soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> em suas diferentes concentrações não demonstraram diferença significativa. Quando os valores obtidos de 48 horas são comparados aos obtidos antes do início da incubação (tempo 0) não foi possível observar alterações nos níveis de HDL-colesterol.

No tempo 0, as amostras soro + MGO + NAR, em suas diferentes concentrações, não apresentaram diferenças entre si em relação aos níveis de HDL-colesterol. Ao término do tempo de incubação (48 horas), os valores de HDL-colesterol nas amostras soro + MGO + NAR nas diferentes concentrações apresentam discretas diferenças entre si: a amostra soro + MGO + NAR 400µM apresentou valores de HDL-colesterol superiores (49,7 mg/dL) em relação à condição soro + MGO + NAR 100 µM (46,0 mg/dL), e a condição soro + MGO +

NAR 200  $\mu\text{M}$  apresentou valores de HDL-colesterol (48,0 mg/dL) que não diferiram dos valores encontrados nas condições previamente descritas. Quando comparamos os valores de HDL-colesterol nas condições tempo 0 *versus* 48 horas, é possível observar que não houve diferença nos níveis de HDL-colesterol para a amostra soro + MGO + NAR (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ).

**Tabela 7.** Níveis de HDL-colesterol em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e naringenina.

|    |       |               |               |               |                 |                                        |                                        |                                         |                                              |                                              |                                               |
|----|-------|---------------|---------------|---------------|-----------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| A) | Horas | Soro          | Soro + AG     | Soro + MGO    | Soro + MGO + AG | Soro +<br>SbExt 500µg/mL               | Soro +<br>SbExt 250µg/mL               | Soro +<br>SbExt 125µg/mL                | Soro + MGO +<br>SbExt 500µg/mL               | Soro + MGO +<br>SbExt 250µg/mL               | Soro + MGO +<br>SbExt 125µg/mL                |
|    | 0     | 51,0 ± 1,2 bc | 51,0 ± 0,6 bc | 49,7 ± 0,7 b  | 50,0 ± 0,6 b    | 52,3 ± 0,7 c                           | 52,3 ± 0,7 c                           | 52,0 ± 0,6 c                            | 48,0 ± 0,6 a                                 | 48,3 ± 0,9 a                                 | 48,0 ± 1,0 a                                  |
|    | 6     | 52,0 ± 0,6 c  | 51,7 ± 0,3 c  | 49,0 ± 0,6 ab | 50,3 ± 0,9 b    | 55,0 ± 0,6 d                           | 54,7 ± 0,7 d                           | 55,0 ± 0,6 d                            | 48,0 ± 1,0 a                                 | 48,0 ± 0,6 a                                 | 48,3 ± 0,7 a                                  |
|    | 12    | 56,0 ± 0,0 d  | 55,7 ± 0,7 de | 50,7 ± 0,7 b  | 52,7 ± 0,7 c    | 56,7 ± 0,7 de                          | 57,3 ± 0,3 e                           | 57,0 ± 0,0 e                            | 49,0 ± 0,6 a                                 | 49,0 ± 0,6 a                                 | 49,3 ± 0,3 a                                  |
|    | 24    | 50,3 ± 0,3 d  | 50,0 ± 0,6 d  | 46,0 ± 0,6 b  | 47,3 ± 0,3 c    | 52,0 ± 0,0 e                           | 52,0 ± 0,6 e                           | 52,0 ± 0,6 e                            | 45,0 ± 0,6 a                                 | 45,3 ± 0,3 a                                 | 45,3 ± 0,3 a                                  |
|    | 48    | 50,7 ± 0,7 b  | 50,7 ± 0,9 b  | 48,0 ± 1,0 a  | 49,7 ± 0,9 ab   | 53,0 ± 0,6 c                           | 52,3 ± 0,7 c                           | 52,0 ± 0,6 c                            | 53,7 ± 0,9 c                                 | 52,0 ± 1,2 bc                                | 50,3 ± 0,9 b                                  |
| B) | Horas | Soro          | Soro + AG     | Soro + MGO    | Soro + MGO + AG | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL | Soro +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 250µg/mL | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 125µg/mL | Soro + MGO +<br>SbCHCl <sub>3</sub> 62,5µg/mL |
|    | 0     | 51,0 ± 1,2 c  | 51,0 ± 0,6 c  | 49,7 ± 0,7 c  | 50,0 ± 0,6 c    | 49,3 ± 0,9 c                           | 51,0 ± 1,2 c                           | 50,7 ± 0,9 c                            | 46,3 ± 0,7 a                                 | 48,0 ± 0,6 b                                 | 47,7 ± 0,3 ab                                 |
|    | 6     | 52,0 ± 0,6 c  | 51,7 ± 0,3 c  | 49,0 ± 0,6 b  | 50,3 ± 0,9 b    | 54,0 ± 1,0 d                           | 55,3 ± 1,5 d                           | 55,0 ± 0,6 d                            | 46,3 ± 0,9 a                                 | 48,0 ± 0,6 ab                                | 49,0 ± 1,2 b                                  |
|    | 12    | 56,0 ± 0,0 f  | 55,7 ± 0,7 f  | 50,7 ± 0,7 d  | 52,7 ± 0,7 e    | 49,0 ± 0,6 c                           | 51,3 ± 0,3 d                           | 52,7 ± 0,7 e                            | 42,3 ± 0,7 a                                 | 45,0 ± 0,6 b                                 | 45,3 ± 0,9 b                                  |
|    | 24    | 50,3 ± 0,3 d  | 50,0 ± 0,6 d  | 46,0 ± 0,6 ab | 47,3 ± 0,3 b    | 49,3 ± 1,2 d                           | 54,0 ± 0,6 e                           | 54,0 ± 0,0 e                            | 44,0 ± 1,5 a                                 | 47,0 ± 0,6 bc                                | 48,0 ± 0,6 cd                                 |
|    | 48    | 50,7 ± 0,7 c  | 50,7 ± 0,9 c  | 48,0 ± 1,0 bc | 49,7 ± 0,9 c    | 47,0 ± 0,6 ab                          | 49,3 ± 0,9 c                           | 50,7 ± 0,7 c                            | 45,7 ± 0,7 a                                 | 46,3 ± 0,3 a                                 | 47,3 ± 0,9 ab                                 |
| C) | Horas | Soro          | Soro + AG     | Soro + MGO    | Soro + MGO + AG | Soro +<br>NAR 400µM                    | Soro +<br>NAR 200µM                    | Soro +<br>NAR 100µM                     | Soro + MGO +<br>NAR 400µM                    | Soro + MGO +<br>NAR 200µM                    | Soro + MGO +<br>NAR 100µM                     |
|    | 0     | 51,0 ± 1,2 bc | 51,0 ± 0,6 b  | 49,7 ± 0,7 ab | 50,0 ± 0,6 ab   | 50,0 ± 0,6 ab                          | 51,3 ± 0,7 bc                          | 52,3 ± 0,3 c                            | 50,0 ± 0,6 ab                                | 49,0 ± 0,6 a                                 | 49,3 ± 0,3 a                                  |
|    | 6     | 52,0 ± 0,6 b  | 51,7 ± 0,3 b  | 49,0 ± 0,6 a  | 50,3 ± 0,9 ab   | 51,0 ± 0,6 b                           | 53,7 ± 0,3 c                           | 54,3 ± 0,3 c                            | 50,7 ± 0,7 ab                                | 50,0 ± 0,6 ab                                | 49,3 ± 0,3 a                                  |
|    | 12    | 56,0 ± 0,0 e  | 55,7 ± 0,7 e  | 50,7 ± 0,7 b  | 52,7 ± 0,7 c    | 51,3 ± 0,7 c                           | 54,0 ± 0,6 d                           | 55,3 ± 0,3 e                            | 51,7 ± 0,3 c                                 | 49,3 ± 0,3 b                                 | 48,0 ± 0,6 a                                  |
|    | 24    | 50,3 ± 0,3 d  | 50,0 ± 0,6 d  | 46,0 ± 0,6 b  | 47,3 ± 0,3 c    | 46,0 ± 0,6 b                           | 48,0 ± 0,6 c                           | 49,7 ± 0,3 d                            | 47,3 ± 0,3 c                                 | 45,7 ± 0,9 b                                 | 42,7 ± 0,3 a                                  |
|    | 48    | 50,7 ± 0,7 d  | 50,7 ± 0,9 d  | 48,0 ± 1,0 bc | 49,7 ± 0,9 cd   | 47,7 ± 0,7 b                           | 49,3 ± 0,3 c                           | 50,0 ± 0,6 cd                           | 49,7 ± 0,9 cd                                | 48,0 ± 1,2 bc                                | 46,0 ± 0,0 a                                  |

Os níveis de HDL-colesterol foram monitorados em sistema automatizado utilizando química seca (Vitros250, Ortho Clinical Diagnostics), em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 48 horas. As tabelas apresentam os valores de HDL-colesterol expressos em mg/dL como médias ± erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

Na figura 17 são apresentados os resultados relacionados à estimativa dos AGEs fluorescentes, monitorados nos tempos 0 (antes da incubação) e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubações de soro sanguíneo humano na ausência ou na presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), e na ausência ou na presença de extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbExt 500, 250 e 125 µg/mL) (Figura 17A), fração clorofórmica do extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbCHCl<sub>3</sub> 250, 125 e 62,5 µg/mL) (Figura 17B), e do flavonoide naringenina (NAR 400, 200 e 100 µM) (Figura 17C).

É possível observar um aumento progressivo na intensidade de fluorescência emitidas pelos AGEs nas amostras soro + MGO, desde o tempo 0 até o término das incubações (48 horas). Destaca-se que, após 48 horas de incubação, a condição soro + MGO apresentou um significativo aumento (794%) na intensidade de fluorescência dos AGEs, em comparação às incubações contendo somente soro (sem adição do MGO). A AG demonstrou ser efetiva na inibição da formação dos AGEs fluorescentes, durante todo o período de incubação. Após 48 horas de incubação, a intensidade de fluorescência dos AGEs na condição soro + MGO + AG foi 75% menor em relação à condição soro + MGO.

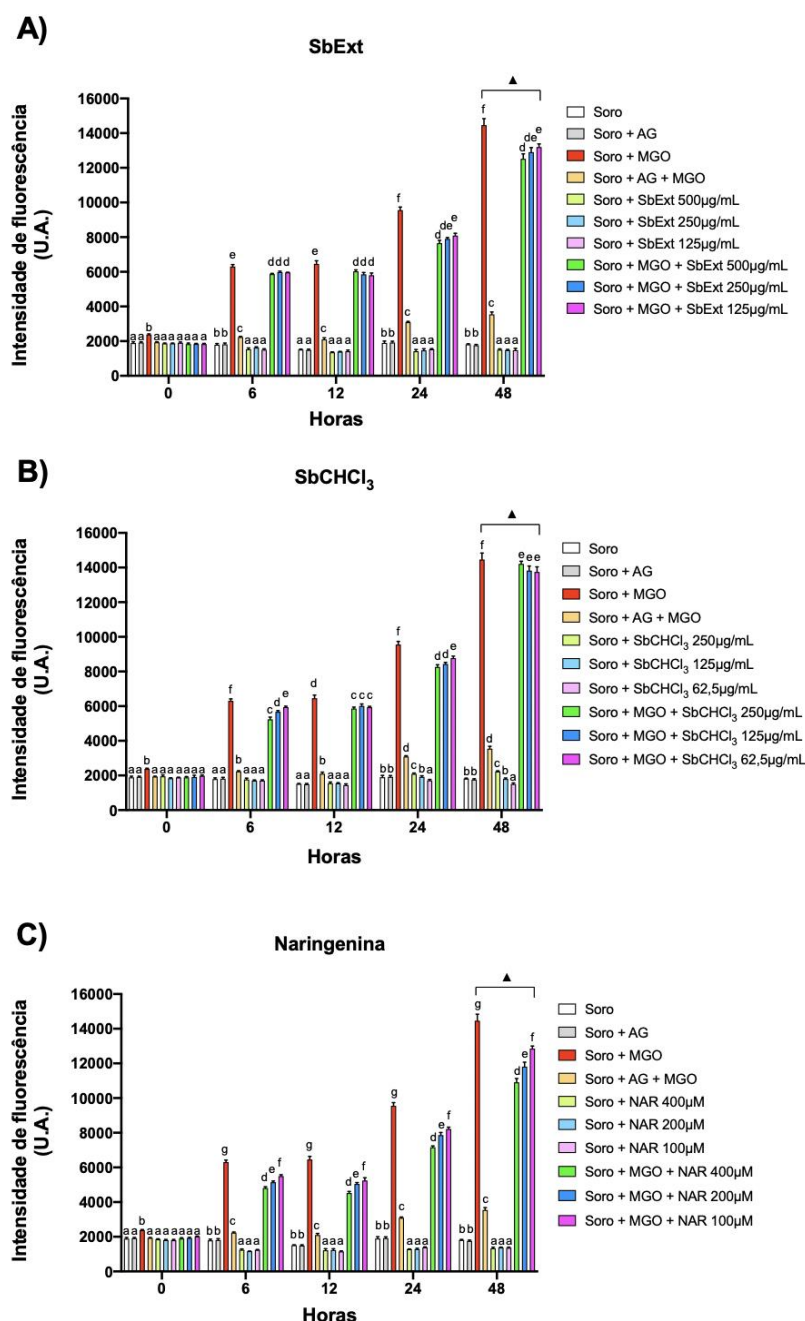
O extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (Figura 17A), em todas as concentrações estudadas e nas condições de incubação soro + MGO + SbExt, demonstrou significativa capacidade de inibir a formação de AGEs fluorescentes. A partir de 24 horas de incubação, foi possível observar uma relação concentração-dependente do SbExt em relação ao potencial em diminuir a formação de AGEs do sistema-modelo soro + MGO. No tempo de 24 horas, as diferentes concentrações de SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) foram capazes de inibir a formação de AGEs em aproximadamente 19%, 17% e 15%, respectivamente, sendo o extrato menos eficaz nessa atividade anti-AGE no tempo de 48 horas, onde a inibição na formação de AGEs fluorescentes foi menor em comparação ao tempo de 24 horas, cujas diminuições nos níveis de AGEs foram de 13%, 10% e 8%, respectivamente (Figura 17A).

A fração SbCHCl<sub>3</sub> também demonstrou ser eficaz em diminuir a intensidade de fluorescência dos AGEs gerados no sistema-modelo soro + MGO. No tempo de 6 horas, foi possível observar uma relação concentração-dependente de SbCHCl<sub>3</sub> em relação à atividade anti-AGE, sendo essa fração capaz de diminuir a intensidade de fluorescência dos AGEs nas incubações soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> nas concentrações

de 250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$  em aproximadamente 17%, 10% e 5%, respectivamente, em relação aos valores de fluorescência obtidos das incubações de soro + MGO. Após 48 horas de incubação,  $\text{SbCHCl}_3$  apresentou discreta capacidade em inibir a formação de AGEs, diminuindo a intensidade de fluorescência em cerca de 10% em relação a incubação soro + MGO, em todas as concentrações estudadas (Figura 17B).

A naringenina, em todas as concentrações estudadas e desde o tempo 6 horas, apresentou significativa capacidade em inibir a formação de AGEs fluorescentes no sistema-modelo soro + MGO, sendo observada uma diminuição na intensidade de fluorescência com perfil concentração-dependente. Após 48 horas de incubação, foi possível observar que a naringenina diminuiu a formação de AGEs fluorescentes nas incubações de soro + MGO, em cerca de 24% (400  $\mu\text{M}$ ), 18% (200  $\mu\text{M}$ ) e 11% (100  $\mu\text{M}$ ), quando comparados ao sistema-modelo soro + MGO sem a adição do flavonoide (Figura 17C).

**Figura 17.** Intensidade de fluorescência relativa aos AGEs em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> ou naringenina.



A formação de AGEs fluorescentes foi monitorado através de fluorescência em fluorímetro (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc) nos comprimentos de onda de excitação de  $\lambda$ 350nm e emissão de  $\lambda$ 440nm, em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 40 dias. As amostras foram diluídas na proporção 1:25 com tampão PBS. Os valores de intensidade de fluorescência (U.A.) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

Processos oxidativos que ocorrem sobre resíduos de triptofano em proteínas favorecem a formação de N'-formilquinurenina, a qual pode ser monitorada via fluorescência, nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 325 nm e 344 nm, respectivamente

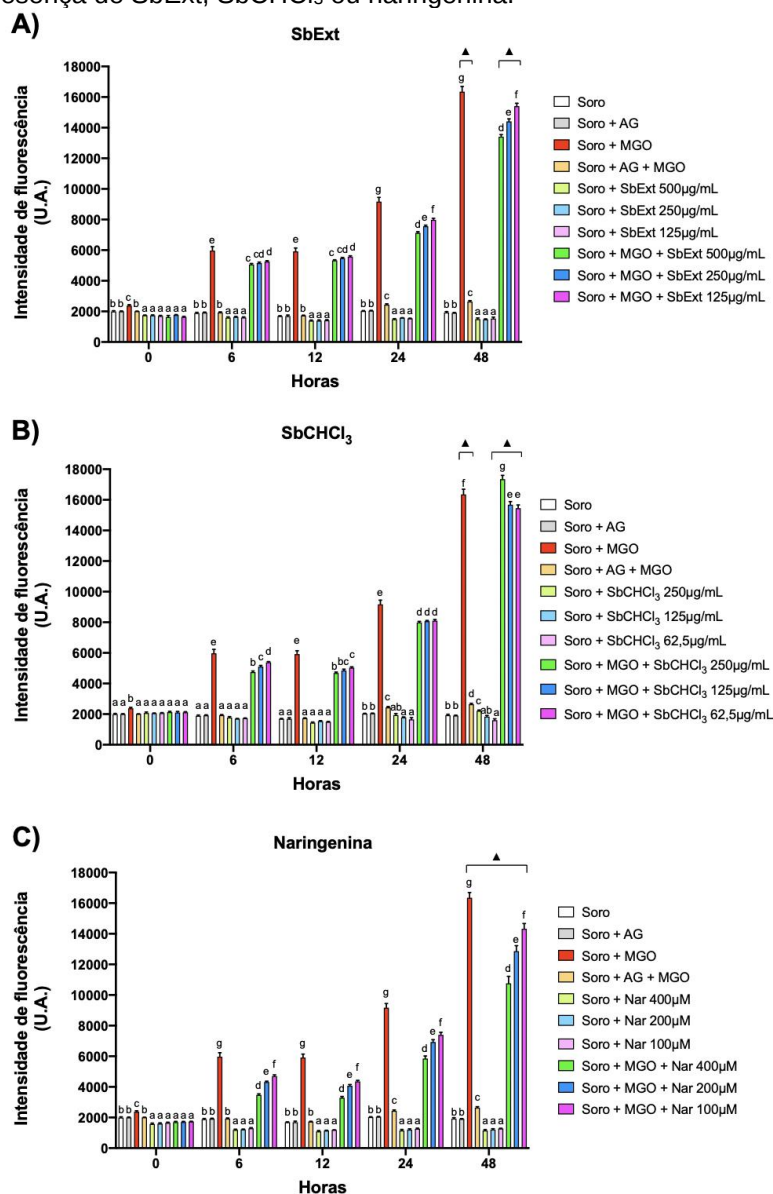
Na figura 18 estão as representações gráficas dos valores de fluorescência referentes à N'-formilquinurenina, monitorados nos tempos 0 (antes da incubação) e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubações de soro sanguíneo humano na ausência ou na presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), e na ausência ou na presença de extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbExt 500, 250 e 125 µg/mL) (Figura 18A), fração clorofórmica do extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbCHCl<sub>3</sub> 250, 125 e 62,5 µg/mL) (Figura 18B), e do flavonoide naringenina (NAR 400, 200 e 100 µM) (Figura 18C).

No decorrer dos tempos de incubação, as amostras soro + MGO apresentaram um aumento progressivo na intensidade de fluorescência, o que caracteriza maior formação de N'-formilquinurenina. Este aumento de fluorescência nas amostras soro + MGO alcançou maiores valores de fluorescência no tempo de 48 horas, representando um aumento de intensidade de cerca de 8,5 vezes em relação às incubações contendo somente soro. Também foi possível observar o efeito protetor da AG sobre a oxidação de resíduos de triptofano, diminuindo a formação de N'-formilquinurenina, consequentemente houve diminuição na intensidade de fluorescência, a qual foi evidente desde o tempo 0 até 12 horas, onde as incubações soro + MGO + AG não apresentaram aumento de fluorescência em relação às incubações soro + MGO. Como exemplo do efeito protetor da AG, este fármaco protótipo anti-AGE foi capaz de inibir em 83% a formação N'-formilquinurenina no sistema-modelo soro + MGO, no tempo de incubação de 48 horas, em comparação aos valores encontrados nas incubações de soro + MGO.

O extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (Figura 18A), bem como sua fração clorofórmica (SbCHCl<sub>3</sub>) (Figura 18B) e a substância majoritária presente nesta fração, o flavonoide naringenina (Figura 18C), nas diferentes concentrações estudadas, não apresentaram a mesma eficácia de inibição na formação de N'-formilquinurenina, quando comparados ao efeito da AG. Dentre essas preparações/metabólitos, quem mais se destacou foi a naringenina, especialmente na concentração de 400 µM (Figura 18C), a qual diminuiu em 34% a

fluorescência de N'-formilquinurenina, em relação aos valores de fluorescência observados no soro + MGO, no tempo de 48 horas.

**Figura 18.** Intensidade de fluorescência relativa a N'-formilquinurenina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas in vitro em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> ou naringenina.



A formação de N'-formilquinurenina foi monitorado através de fluorescência em fluorímetro (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc) nos comprimentos de onda de excitação de  $\lambda$ 325nm e emissão de  $\lambda$ 344nm, em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 40 dias. As amostras foram diluídas na proporção 1:25 com tampão PBS. Os valores de intensidade de fluorescência (U.A.) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste t-student, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

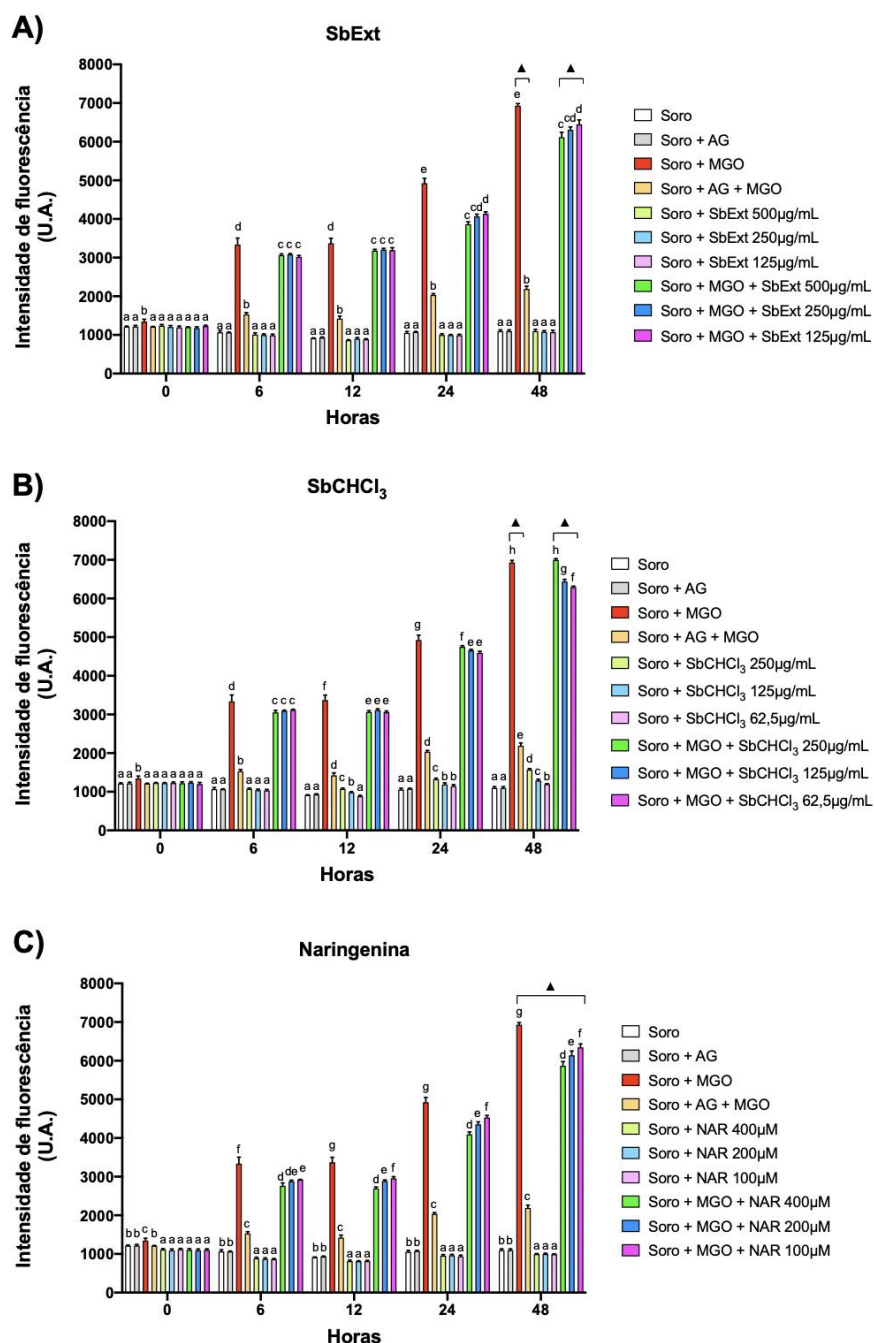
A N'-formilquinureína, gerada como um produto da oxidação dos resíduos de triptofano, pode ser desformilada, produzindo quinurenina, a qual pode ser monitorada via fluorescência, nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 nm e 480 nm, respectivamente.

Na figura 19 estão as representações gráficas dos valores de fluorescência referentes à quinurenina, monitorados nos tempos 0 (antes da incubação) e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubações de soro sanguíneo humano na ausência ou na presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), e na ausência ou na presença de extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbExt 500, 250 e 125 µg/mL) (Figura 19A), fração clorofórmica do extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbCHCl<sub>3</sub> 250, 125 e 62,5 µg/mL) (Figura 19B), e do flavonoide naringenina (NAR 400, 200 e 100 µM) (Figura 18C).

É possível observar que a fluorescência emitida pela quinurenina, nas amostras contendo soro + MGO, apresentaram um aumento progressivo de intensidade, desde o tempo 0, alcançando um aumento em aproximadamente de 6 vezes após 48 horas de incubação, em comparação às incubações contendo somente soro, sem o acréscimo de MGO. A AG promoveu significativa inibição na formação de quinurenina no sistema-modelo soro + MGO, em especial no tempo de 48 horas, onde a intensidade de fluorescência da incubação soro + MGO + AG foi 68% menor em relação aos valores de fluorescência nas incubações soro + MGO.

Os efeitos do extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (Figura 19A), da fração clorofórmica (SbCHCl<sub>3</sub>) (Figura 19B) e da naringenina (Figura 19C), nas diferentes concentrações estudadas, foram mais discretos em comparação à AG, em relação à inibição na formação de quinurenina. As preparações de *Siolmatra brasiliensis* e o flavonoide foram capazes de diminuir, em pequena escala, a intensidade de fluorescência da quinurenina no sistema-modelo soro + MGO, nos tempos 6 e 12 horas, comportamento este que continuou para SbCHCl<sub>3</sub> nos demais tempos (Figura 19B). O SbExt e a NAR, nas diferentes concentrações estudadas, apresentam efeito concentração-dependente na inibição da formação da quinurenina. Os efeitos inibitórios de SbExt foram mais discretos, em relação ao da NAR, no tempo de 48 horas. As incubações de soro + MGO na maior concentração de SbExt (500 µg/mL; figura 19A) e de NAR (400 µM; figura 19C) apresentaram diminuições nos valores de fluorescência relativos à quinurenina de 11% e 15%, respectivamente, quando comparados aos valores da incubação soro + MGO.

**Figura 19.** Intensidade de fluorescência relativa a quinurenina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas in vitro em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> ou naringenina.



A formação de quinurenina foi monitorado através de fluorescência em fluorímetro (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc) nos comprimentos de onda de excitação de  $\lambda$ 360nm e emissão de  $\lambda$ 480nm, em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 40 dias. As amostras foram diluídas na proporção 1:25 com tampão PBS. Os valores de intensidade de fluorescência (U.A.) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

Resíduos do aminoácido tirosina presentes em proteínas podem sofrer oxidação, formando ditirosina, a qual pode ser monitorada via fluorescência, nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 330 nm e 415 nm, respectivamente.

Na figura 20 estão as representações gráficas dos valores de fluorescência referentes à ditirosina, monitorados nos tempos 0 (antes da incubação) e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubações de soro sanguíneo humano na ausência ou na presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), e na ausência ou na presença de extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbExt 500, 250 e 125 µg/mL) (Figura 20A), fração clorofórmica do extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbCHCl<sub>3</sub> 250, 125 e 62,5 µg/mL) (Figura 20B), e do flavonoide naringenina (NAR 400, 200 e 100 µM) (Figura 20C).

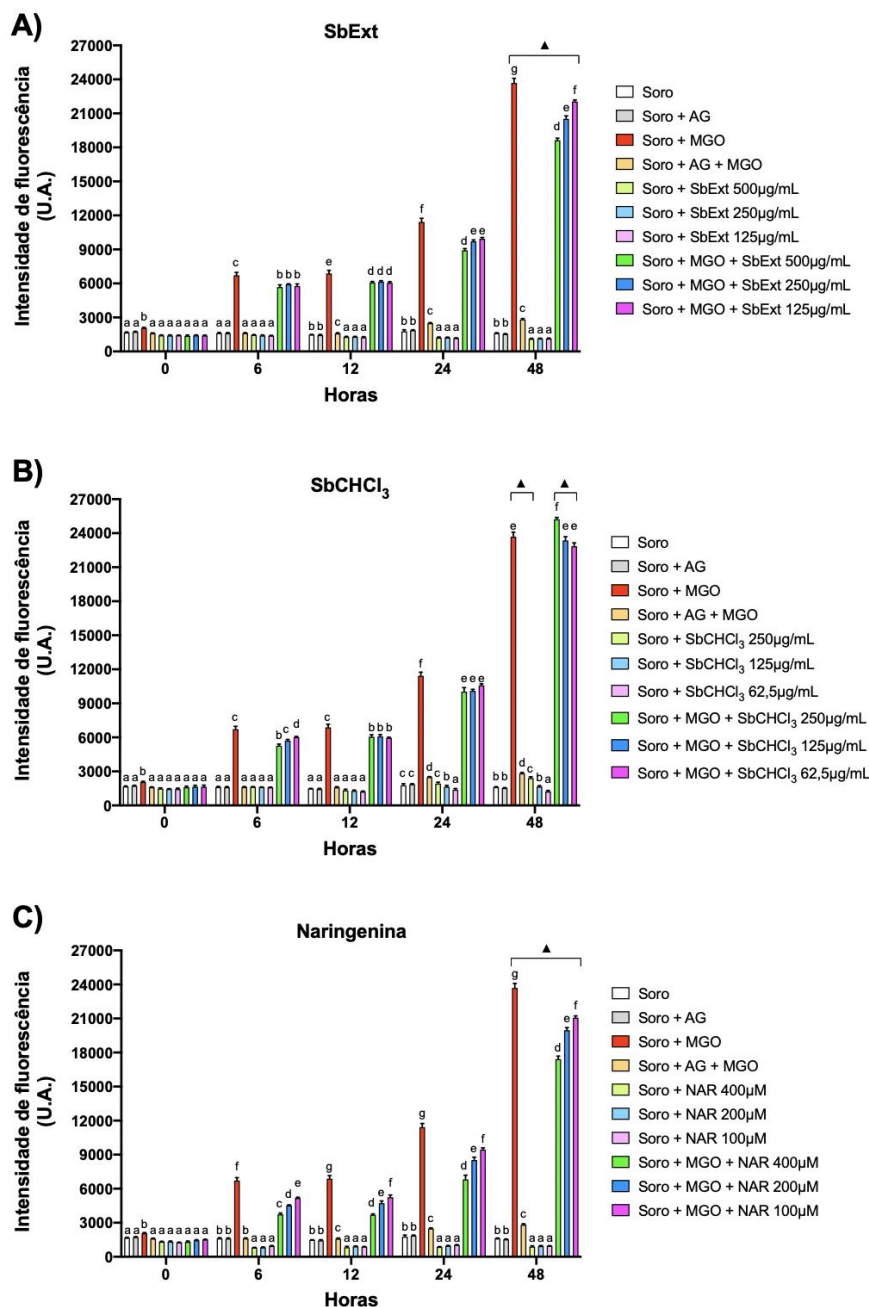
Incubações de soro + MGO apresentaram maior intensidade de fluorescência relativa à ditirosina, desde o tempo 0, em comparação às incubações contendo somente soro, sendo as alterações mais evidentes a partir de 6 horas e alcançando valores máximos no tempo de 48 horas, onde a intensidade de fluorescência foi 14 vezes maior em relação à incubação de soro. A adição do agente anti-AGE, a AG, se mostrou eficaz na proteção da oxidação de resíduos de tirosina no sistema-modelo soro + MGO, uma vez que houve diminuição na intensidade de fluorescência da ditirosina, desde o tempo 0 até 48 horas de incubação, diminuindo a intensidade de fluorescência em aproximadamente 88%, após 48 horas, em relação ao soro + MGO.

SbExt (Figura 20A) e naringenina (Figura 20C), em todas as concentrações estudadas, foram capazes de diminuir a formação de ditirosina no sistema-modelo soro + MGO, desde o tempo 0 até 48 horas de incubação. No tempo de 48 horas, foi possível observar perfil de resposta inibitória concentração-dependente: SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) diminuiu os níveis de ditiroxina em 21%, 13% e 7%, respectivamente, enquanto NAR (400, 200 e 100 µM) diminuiu os níveis deste produto de oxidação em 26%, 16% e 11%, respectivamente.

SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) em amostras de soro + MGO (Figura 20B), causou discreta diminuição nos níveis de ditirosina, desde o tempo 0 até 24 horas, com perfil concentração-dependente somente no tempo de 6 horas; nos tempos 12 e 24 horas, não foi possível observar diferenças entre as diferentes concentrações de SbCHCl<sub>3</sub>. Após 48 horas, SbCHCl<sub>3</sub> 250 µg/mL não foi capaz de diminuir a

formação de ditirosina, enquanto  $\text{SbCHCl}_3$  125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$  promoveram discretas inibições.

**Figura 20.** Intensidade de fluorescência relativa a ditirosina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> ou naringenina.



A formação de ditirosina foi monitorado através de fluorescência em fluorímetro (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc) nos comprimentos de onda de excitação de  $\lambda$ 330nm e emissão de  $\lambda$ 415nm, em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 40 dias. As amostras foram diluídas na proporção 1:25 com tampão PBS. Os valores de intensidade de fluorescência (U.A.) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

Na figura 21 estão apresentados os valores relacionados os níveis de PCO em amostras de soro sanguíneo humano incubados na ausência ou presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), ausência ou presença de extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbExt; 500, 250 e 125 µg/mL) (Figura 21A), da fração clorofórmica do extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbCHCl<sub>3</sub>; 250, 125 e 62,5 µg/mL) (Figura 21B), e do flavonoide naringenina (NAR; 400, 200 e 100 µM) (Figura 21C).

Desde o tempo 0, é possível observar um aumento significativo (8,3 vezes) nos níveis de PCO nas incubações de soro + MGO, em comparação às incubações contendo somente soro. Após 6 horas de incubação, as amostras de soro + MGO apresentaram um aumento ainda maior nos níveis de PCO (12,3 vezes), em comparação às amostras contendo somente soro. A partir dos demais tempos de incubação, houve estabilização nos níveis de PCO, até o tempo de 48 horas, nas incubações de soro + MGO. A presença de AG nas incubações de soro + MGO foi capaz de diminuir os níveis de PCO, desde o tempo 0 até o final do experimento. Em comparação às incubações soro + MGO, os níveis de PCO em soro + MGO + AG foram diminuídos em cerca de 71,8% no tempo 0, 76,0% nos tempos 6 e 12 horas, 71,5% no tempo 24 horas e 63,5% no tempo 48 horas.

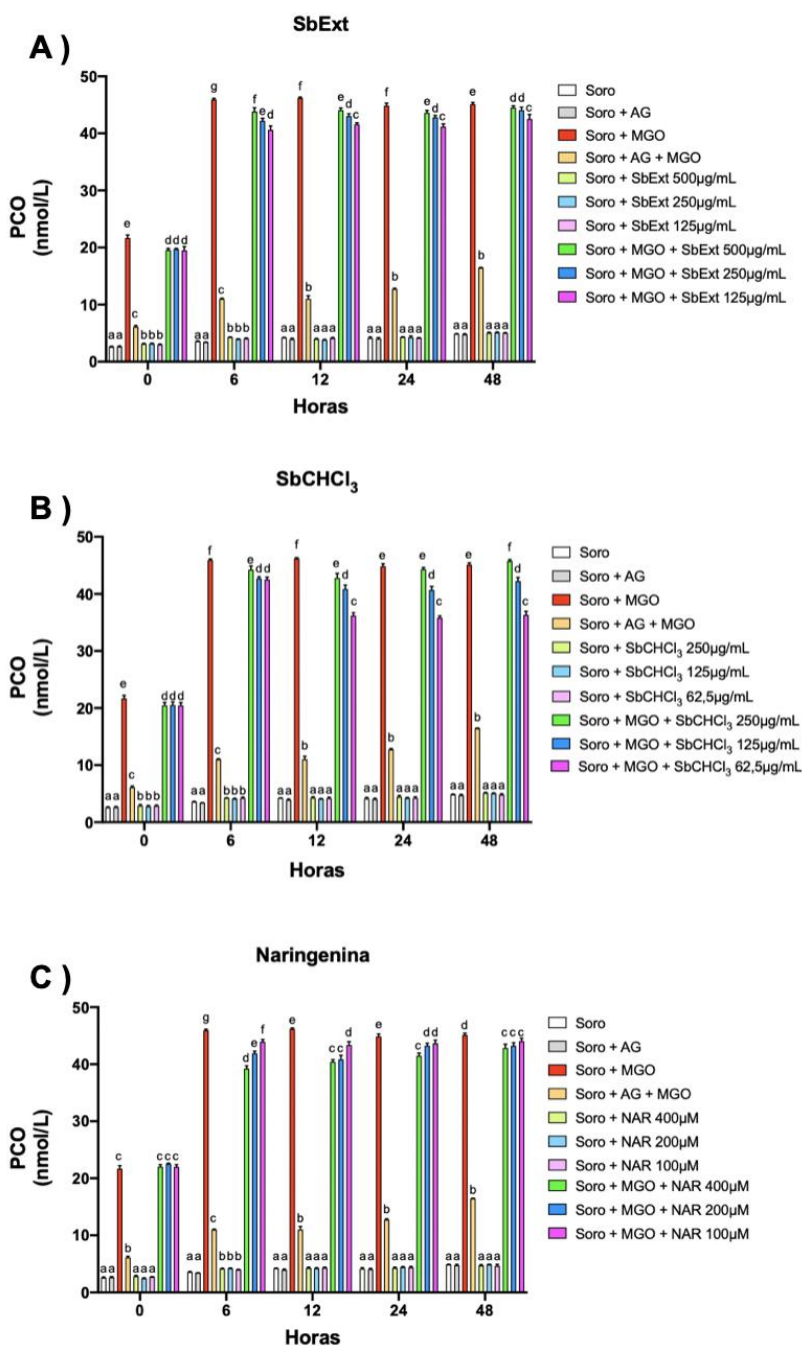
Incubações de soro + MGO + SbExt (Figura 21A), em todas as concentrações estudadas do extrato (500, 250 e 125 µg/mL), apresentaram discreta diminuição nos níveis de PCO, desde o tempo 0, onde todas as concentrações estudadas de SbExt apresentaram o mesmo perfil de resposta. Interessantemente, nos demais tempos de incubação, a menor concentração de SbExt (125 µg/mL) foi a mais efetiva na promoção de diminuição nos níveis de PCO, em comparação as demais concentrações, sendo capaz de inibir a geração de PCO em 11,61% em 6 horas, 9,94% em 12 horas, 8,15% em 24 horas e 5,69% 48 horas, em comparação aos valores de PCO observados nas incubações soro + MGO.

Incubações de soro + MGO + SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL), no tempo 0, apresentaram discreta diminuição nos níveis de PCO. Após 6 horas de incubação, tal como observado para SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> na menor concentração foi a mais efetiva em promover diminuição nos níveis de PCO, nas incubações com soro + MGO. Após 48 horas de incubação, SbCHCl<sub>3</sub> na concentração de 62,5 µg/mL foi capaz de diminuir os níveis de PCO em cerca de 19,4%, enquanto a concentração de 125

$\mu\text{g/mL}$  diminuiu os níveis de PCO em 6,3%, em relação aos níveis de PCO em soro + MGO.

Incubações de soro + MGO na presença de naringenina, em todas as concentrações estudadas (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) e antes do início da incubação (tempo 0), não apresentaram diminuição nos níveis de PCO. Após 6 horas de incubação foi possível observar um efeito inibitório da NAR sobre a formação de PCO, de maneira concentração dependente. Esse perfil concentração-dependente de NAR sobre a capacidade de inibição na formação de PCO nas incubações soro + MGO não se manteve após 12, 24 e 48 horas de incubação. Após 48 horas de incubação, todas as concentrações de naringenina estudadas (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) não diferiram entre si em relação à capacidade de diminuir os níveis de PCO, sendo observada uma resposta inibitória na formação desse marcador de oxidação bastante discreta, em relação às incubações de soro + MGO.

**Figura 21.** Níveis de PCO em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> ou naringenina.



Os níveis de PCO foram monitorados espectrofotometricamente (PowerWave XS2, BioTek Instruments Inc) no comprimento de onda de  $\lambda 370\text{nm}$ , em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 40 dias. Os grupos carbonilas presentes nas proteínas das amostras reagem com DNPH, formando 2,4-dinitrofenilhidrazona, o qual é monitorado espectrofotometricamente. Os níveis de PCO (mmol/L) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e

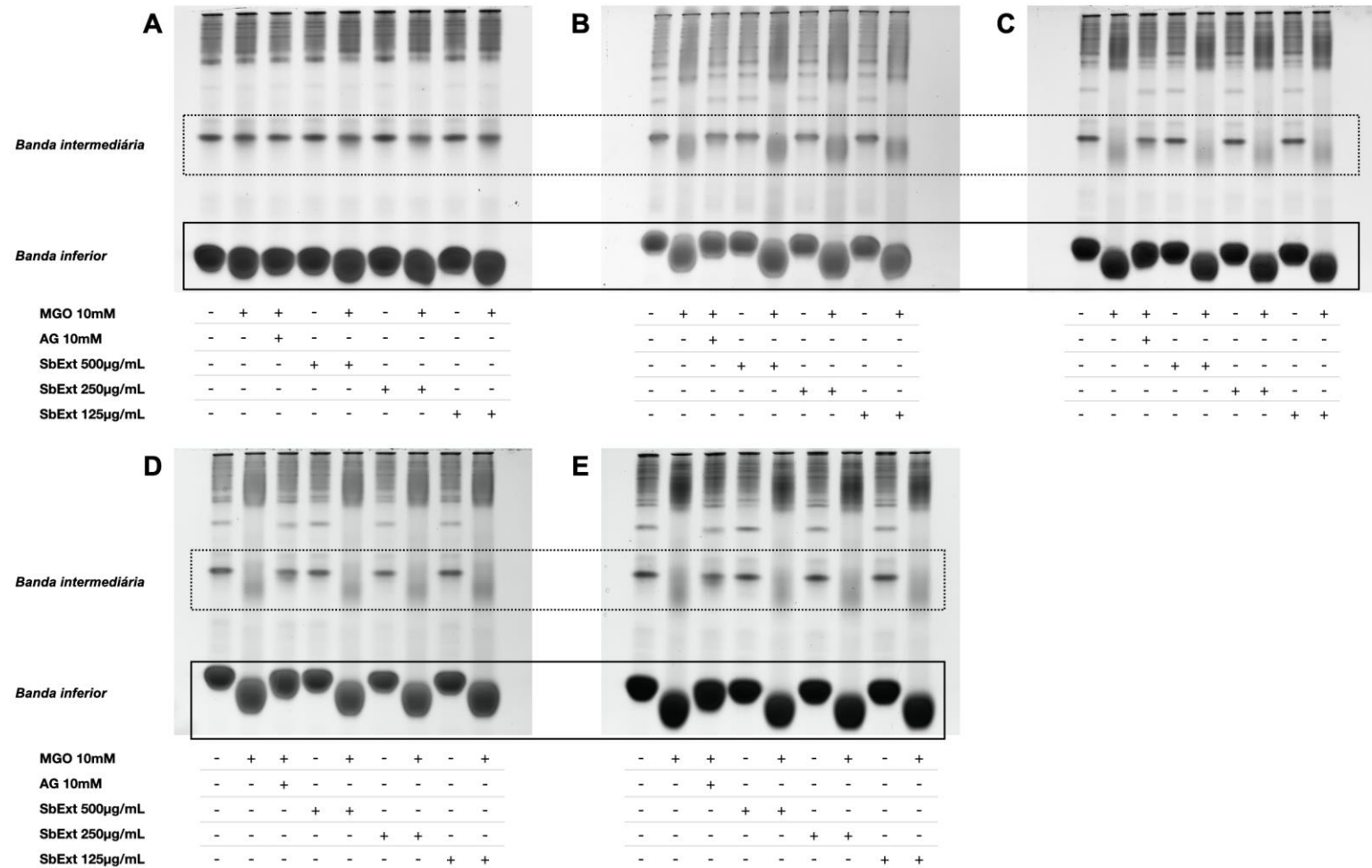
48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

As figuras 22, 23 e 24 apresentam o perfil de separação eletroforética de proteínas do soro sanguíneo humano das incubações conduzidas na ausência ou presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), presença de SbExt (500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 21), presença de SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 22), e presença NAR (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) (Figura 23), em diferentes tempos, antes do início das incubações (Figuras 22A, 23A e 24A), após 6 horas (Figuras 22B, 23B e 24B), após 12 horas (Figuras 22C, 23C e 24C), após 24 horas (Figuras 22D, 23D e 24D) e após 48 horas de incubação (Figuras 22E, 23E e 24E).

Antes do início das incubações, foi possível observar que a adição de MGO em amostras de soro (soro + MGO) alterou discretamente o perfil da corrida eletroforética, em relação às amostras contendo somente soro (soro); foi possível observar alteração no tamanho da banda inferior e discreto “espalhamento” da banda intermediária (Figuras 22A, 23A e 24A). Com o decorrer do tempo de incubação, houve mudanças no padrão migratório da banda inferior das amostras soro + MGO, em relação às amostras contendo somente soro, e a banda intermediária se tornou mais dispersa, dispersão essa gradativamente maior no decorrer do tempo de incubação (Figuras 22, 23 e 24). A adição de AG atenuou as alterações anteriormente descritas nas incubações de soro + MGO (Figuras 22, 23 e 24).

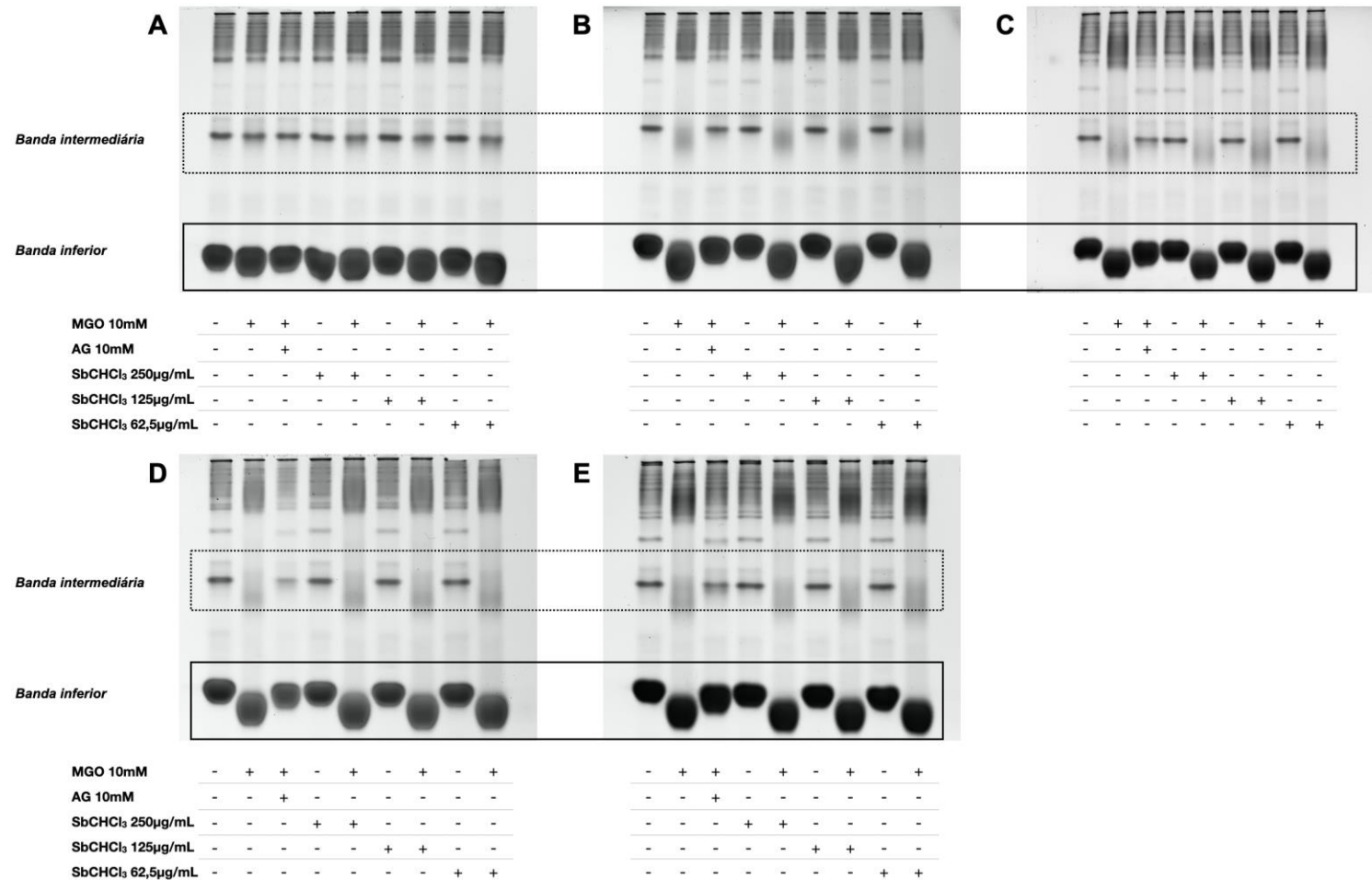
Incubações na presença de SbExt (500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 22), ou SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 23) ou NAR (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) (Figura 24), em amostras contendo somente soro, demonstraram perfis de separação eletroforética de proteínas semelhantes entre si e semelhantes ao perfil das amostras contendo somente soro, durante todo período experimental. Já a adição de SbExt (Figuras 22B, C, D e E), SbCHCl<sub>3</sub> (Figuras 23B, C, D e E) ou NAR (Figuras 24B, C, D e E) às amostras de soro + MGO parece não proteger o sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* das alterações estruturais promovidas pelo MGO.

**Figura 22.** Perfil de separação eletroforética de proteínas séricas em sistema-modelo de glicação *in vitro* de soro sanguíneo incubado com metilglioxal tratados com SbExt (experimento 2).



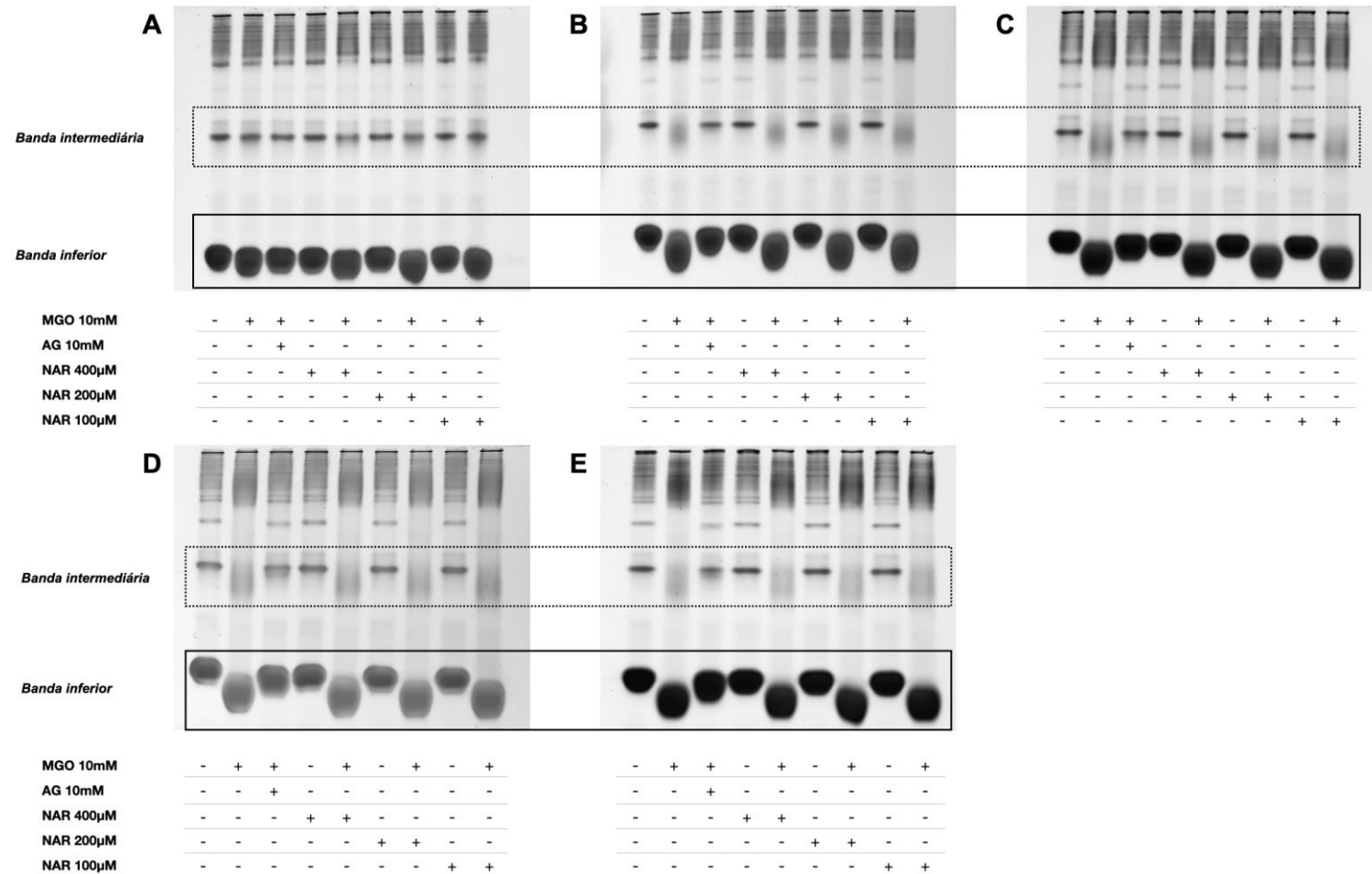
As figuras representam o perfil de separação de proteínas em eletroforese de gel de acrilamida/bisacrilamida, sob condições não-desnaturantes, de incubações de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), em diferentes tempos, antes do início das incubações (A), após 6 horas (B), após 12 horas (C), após 24 horas (D) e após 48 horas de incubação (E). Abaixo de cada figura está a legenda de ausência ( - ) ou presença ( + ) de compostos e/ou de SbExt.

**Figura 23.** Perfil de separação eletroforética de proteínas séricas em sistema-modelo de glicação *in vitro* de soro sanguíneo incubado com metilglioxal tratados com SbCHCl<sub>3</sub> (experimento 2).



As figuras representam o perfil de separação de proteínas em eletroforese de gel de acrilamida/bisacrilamida, sob condições não-desnaturantes, de incubações de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL), em diferentes tempos, antes do início das incubações (A), após 6 horas (B), após 12 horas (C), após 24 horas (D) e após 48 horas de incubação (E). Abaixo de cada figura está a legenda de ausência ( - ) ou presença ( + ) de compostos e/ou de SbCHCl<sub>3</sub>.

**Figura 24.** Perfil de separação eletroforética de proteínas séricas em sistema-modelo de glicação *in vitro* de soro sanguíneo incubado com metilglioxal tratados com NAR (experimento 2).



As figuras representam o perfil de separação de proteínas em eletroforese de gel de acrilamida/bisacrilamida, sob condições não-desnaturantes, de incubações de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de NAR (400, 200 e 100 µM), em diferentes tempos, antes do início das incubações (A), após 6 horas (B), após 12 horas (C), após 24 horas (D) e após 48 horas de incubação (E). Abaixo de cada figura está a legenda de ausência (-) ou presença (+) de compostos e/ou de NAR.

Na figura 25 estão apresentados os valores relacionados à atividade arilesterase de PON 1 em amostras de soro sanguíneo humano incubadas na ausência ou presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), ausência ou presença de extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbExt; 500, 250 e 125 µg/mL) (Figura 25A), ausência ou presença da fração clorofórmica do extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbCHCl<sub>3</sub>; 250, 125 e 62,5 µg/mL) (Figura 25B), ausência ou presença do flavonoide naringenina (NAR; 400, 200 e 100 µM) (Figura 25C).

Antes do início das incubações de soro na presença de AG e/ou MGO (soro + AG, soro + MGO, soro + AG + MGO), não foram observadas mudanças na atividade arilesterase de PON 1, em relação à incubação contendo somente soro. Após 12 horas de incubação, as atividades do tipo arilesterase de PON 1 foram semelhantes entre si nas comparações entre soro, soro + AG, soro + MGO, soro + AG + MGO, porém elas foram menores em relação às respectivas incubações no tempo 0 [17,8% (soro), 18,4% (soro + AG), 18,2% (soro + MGO), 14,4% (soro + AG + MGO)]. Após 48 horas de incubação, incubações contendo somente soro não apresentaram diferenças na atividade arilesterase de PON 1 em relação ao tempo 0; já a incubação soro + AG apresentou diminuição na atividade arilesterase de PON 1 em 10,6%; por fim, a adição de MGO promoveu aumentos na atividade arilesterase de PON 1, de 15,3% na condição soro + MGO e 11,1% na condição soro + MGO + AG.

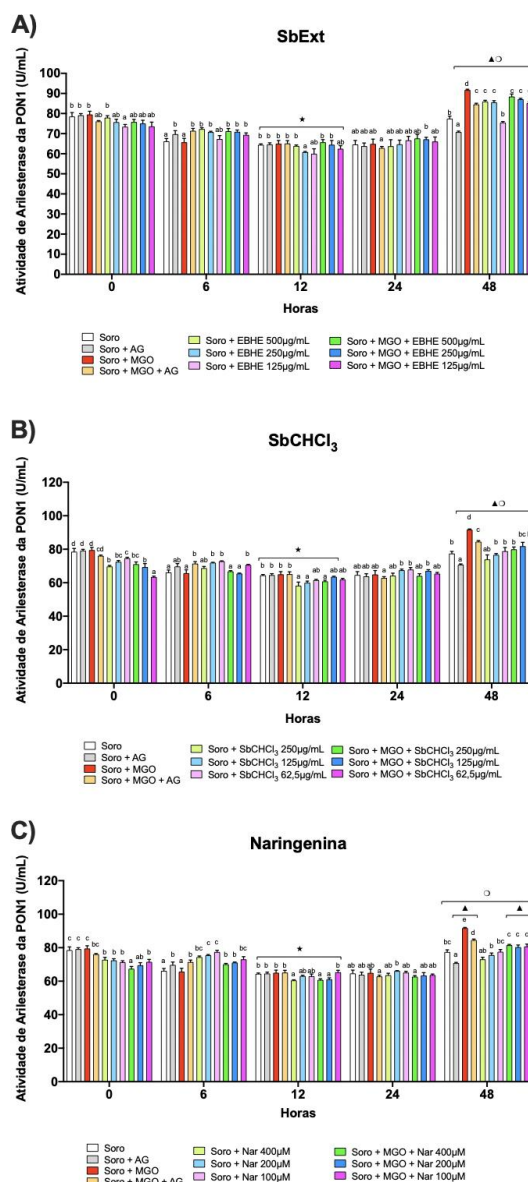
Antes do início da incubação, A adição de 125 µg/mL de SbExt ao soro sanguíneo humano (soro + SbExt 125 µg/mL) promoveu diminuição na atividade arilesterase da PON 1, em relação à incubação contendo somente soro, enquanto que as condições soro + SbExt nas concentrações de 500 e 250 µg/mL não apresentaram alterações na atividade arilesterase da PON 1 em relação aos valores encontrados na incubação de soro sozinho. Após 12 horas, todas as incubações de soro na presença de SbExt (soro + SbExt; soro + MGO e SbExt) apresentaram diminuição na atividade arilesterase da PON 1, em relação ao tempo 0. Já após 48 horas, a atividade arilesterase de PON 1 apresentou-se maior em relação ao tempo 0, nas incubações contendo SbExt; é possível observar um aumento de 37,6% nas incubações soro + SbExt (500 e 250 µg/mL), e um aumento de 25,9% nas incubações soro + SbExt 125 µg/mL.

Antes do início da incubação, a presença de  $\text{SbCHCl}_3$  (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) no soro sanguíneo (soro +  $\text{SbCHCl}_3$ ) promoveu diminuição na atividade arilesterase da PON 1, em relação à incubação contendo somente soro, sendo esse perfil de resposta concentração dependente (11,3%, 7,7% e 5,0%, respectivamente). Incubações de soro + MGO +  $\text{SbCHCl}_3$ , em todas as concentrações de  $\text{SbCHCl}_3$  (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentam menor atividade arilesterase de PON 1, em relação às incubações contendo somente soro (9,5%, 11,6% e 19,3%, respectivamente). Após 12 horas de incubação, incubações de soro +  $\text{SbCHCl}_3$  (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentam menor atividade arilesterase de PON 1, em relação às respectivas incubações no tempo 0. Após 12 horas de incubações, amostras de soro + MGO +  $\text{SbCHCl}_3$  nas concentrações de 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$  apresentam diminuições na atividade arilesterase de PON 1 de 14,4% e 8,4%, respectivamente, em relação ao tempo 0; soro + MGO +  $\text{SbCHCl}_3$  na concentração de 6,25  $\mu\text{g/mL}$  não apresentou diferenças na atividade da enzima em relação aos valores dessa condição no tempo 0. Após 48 horas, incubações de soro +  $\text{SbCHCl}_3$  nas diferentes concentrações (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) não apresentaram diferenças entre si em relação à atividade arilesterase de PON 1, porém seus valores foram maiores em relação às respectivas incubações no tempo 0. Ainda após 48 horas, a incubação soro + MGO +  $\text{SbCHCl}_3$  250  $\mu\text{g/mL}$  apresentou menores valores de atividade arilesterase da PON 1 (79,95 U/mL) em relação às incubações soro + MGO +  $\text{SbCHCl}_3$  nas concentrações de 125  $\mu\text{g/mL}$  (81,85 U/mL) e 62,5  $\mu\text{g/mL}$  (83,17 U/mL). Quando os valores da atividade arilesterase de PON 1 em soro + MGO +  $\text{SbCHCl}_3$  (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) no tempo 48 horas são comparados às respectivas incubações no tempo 0, é possível observar aumentos nas atividades enzimáticas, em todas as concentrações, de 12,5%, 18,0% e 31,2%, respectivamente.

Antes do início da incubação, é possível observar que incubações de soro na presença de NAR (soro + NAR) em suas diferentes concentrações (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) não apresentaram diferença entre si em relação à atividade arilesterase da PON 1, porém seus valores foram menores em relação à atividade da enzima em soro sozinho. Ainda no tempo 0, incubações soro + MGO + NAR (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) apresentaram uma discreta diminuição na atividade arilesterase da PON 1 (67,45 U/mL, 69,50 U/mL e 71,53 U/mL, respectivamente), em relação às incubações contendo somente soro (78,54 U/mL). Após 12 horas de incubação, a

atividade arilesterase da PON 1 nas incubações soro + NAR (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) não diferiram entre si, já na comparação com o tempo 0, é possível observar diminuição da atividade enzimática em cerca de 14%. Ainda após 12 horas de incubação, soro + MGO + NAR 400 e 200  $\mu\text{M}$  não diferiram entre si nos valores de atividade arilesterase da PON 1 (60,8 U/mL e 61,1 U/mL, respectivamente), e foram inferiores em relação aos valores encontrados na condição soro + MGO + NAR 100  $\mu\text{M}$  (65,4 U/mL), e tais valores não diferiram da atividade observada em amostras contendo somente soro (64,4 U/mL). Após 48 horas, incubações de soro + NAR (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) não apresentaram diferenças entre si nos valores de atividade arilesterase da PON 1; porém, quando esses valores são comparados aos obtidos no tempo de 12 horas, é possível observar que houve um aumento na atividade da enzima (73,1 U/mL, 75,6 U/mL e 77,5 U/mL, respectivamente:). Após as 48 horas de incubação, amostras de soro + MGO + NAR nas diferentes concentrações (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) não diferiram entre si nos valores de atividade arilesterase da PON 1; no entanto na comparação com as mesmas incubações no tempo 0, é possível observar aumentos na atividade da enzima (81,4 U/mL, 80,4 U/mL e 80,8 U/mL, respectivamente).

**Figura 25.** Atividade de arilesterase da PON 1 em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> ou naringenina.



A atividade de arilesterase da PON1 foi monitorada espectrofotometricamente (PowerWave XS2, BioTek Instruments Inc) no comprimento de onda de  $\lambda 270\text{nm}$  a  $25^\circ\text{C}$  por 3 minutos, em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ ), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e **C)** NAR (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ), foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 40 dias. Às amostras foi adicionado o substrato fenilacetato 2,96mM, o qual na presença de PON1 é hidrolisado, formando cromóforo, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente. Os valores da atividade enzimática da arilesterase da PON1 (UI) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da atividade enzimática; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 12 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ★ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 12 horas; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 12 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ○ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 12 e 48 horas; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

Na figura 26 estão apresentados os valores relacionados à atividade lactonase de PON 1 em amostras de soro sanguíneo humano incubadas na ausência ou presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), ausência ou presença de extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbExt; 500, 250 e 125 µg/mL) (Figura 26A), ausência ou presença da fração clorofórmica do extrato hidroetanólico do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbCHCl<sub>3</sub>; 250, 125 e 62,5 µg/mL) (Figura 26B), ausência ou presença do flavonoide naringenina (NAR; 400, 200 e 100 µM) (Figura 26C).

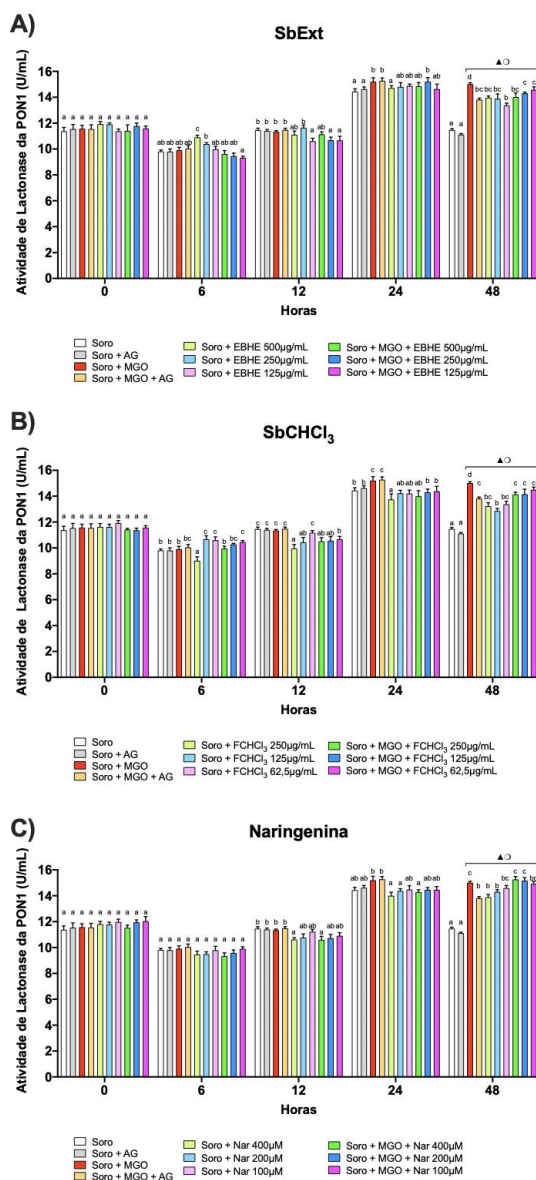
Antes do início da incubação (tempo 0) é possível observar que as amostras soro, soro + AG, soro + MGO, soro + AG + MGO não apresentaram diferenças significativas entre si em relação à atividade lactonase de PON 1. O mesmo ocorreu em relação aos valores da atividade de PON 1 após 12 horas de incubação. Após 48 horas de incubação, é possível observar um aumento na atividade lactonase de PON 1 nas amostras soro + MGO (31,0%) em comparação aos valores de atividade obtidos de amostras contendo somente soro. Ainda após 48 horas, a atividade lactonase de PON 1 na condição soro sozinho não foi diferente nas comparações tempo 0 *versus* 48 horas ou 12 horas *versus* 48 horas.

Antes do início da incubação (tempo 0), amostras das incubações das condições soro ou soro + MGO, na presença de SbExt em suas diferentes concentrações (500, 250 e 125 µg/mL), não apresentaram diferenças entre si em relação à atividade lactonase de PON 1, também não foram diferentes em relação à atividade da enzima na condição somente soro. Após 12 horas de incubação, amostras soro e soro + MGO na presença de SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) não apresentaram mudanças na atividade lactonase de PON 1, em relação às suas respectivas amostras no tempo 0. Após 48 horas de incubação, amostras soro + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) não diferiram entre si em relação à atividade lactonase de PON 1, no entanto apresentaram aumentos na atividade da enzima em relação à condição soro sozinho. Após 48 horas de incubação, é possível observar que amostras soro + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) apresentaram aumentos de cerca de 17% na atividade lactonase de PON 1, em relação ao tempo 0. As amostras soro + MGO + SbExt (500, 250 e 125 µg/mL) não apresentaram diferenças entre si em relação à atividade lactonase de PON 1, porém é possível observar que houve um aumento na atividade da enzima em relação ao tempo 0.

Antes do início da incubação (tempo 0), amostras das incubações soro +  $\text{SbCHCl}_3$  e soro + MGO +  $\text{SbCHCl}_3$ , em suas diferentes concentrações (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), não diferiram estatisticamente entre si quanto aos valores de atividade lactonase da PON 1. Após 12 horas de incubação, amostras soro +  $\text{SbCHCl}_3$  nas concentrações de 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$  apresentam menores valores de atividade lactonase de PON 1 (9,9 U/mL 10,4 U/mL, respectivamente), em relação aos valores observados na condição somente soro (11,5 U/mL). Ainda após 12 horas de incubação, amostras das condições soro + MGO +  $\text{SbCHCl}_3$  (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) não diferiram entre si em relação aos valores de atividade lactonase da PON 1. Ao serem realizadas as comparações tempo 0 *versus* tempo 12 horas, observa-se que os valores de atividade lactonase da PON 1 permaneceram semelhantes nas condições soro +  $\text{SbCHCl}_3$  (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ) ou soro + MGO +  $\text{SbCHCl}_3$  (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ). Ao término da incubação (48 horas), foram observados aumentos na atividade lactonase de PON 1 (15,3%, 12,1% e 16,6%, respectivamente) nas condições soro +  $\text{SbCHCl}_3$  (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), em relação aos valores observados na amostra contendo somente soro, o mesmo ocorreu nas amostras contendo soro + MGO +  $\text{SbCHCl}_3$  (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), cujos aumentos nas atividades de PON 1 foram de 23,3%, 23,4% e 26,4%, respectivamente, em relação aos valores encontrados nas amostras contendo somente soro.

Antes do início da incubação (tempo 0), as amostras soro + NAR e soro + MGO + NAR nas diferentes concentrações (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) não apresentaram diferenças na atividade lactonase de PON 1, seja na comparação entre si, seja na comparação da atividade encontrada na condição soro sozinho. Após 12 horas, o mesmo perfil de resposta foi observado, com exceção das incubações de soro na presença de NAR 400 $\mu\text{M}$ , as quais apresentaram menores valores de atividade de PON 1 em relação às amostras contendo somente soro [soro + NAR 400  $\mu\text{M}$  (7,4%); soro + MGO + NAR 400 $\mu\text{M}$  (7,6%)]. Após 48 horas de incubação, os valores de atividade lactonase de PON 1 nas amostras soro + NAR (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ) não diferiram entre si, o mesmo ocorreu nas amostras soro + MGO + NAR (400, 200 e 100  $\mu\text{M}$ ). Ao serem realizadas as comparações tempo 0 *versus* tempo 48 horas, observa-se que houve um aumento na atividade lactonase de PON 1 em todas as amostras de soro incubadas na presença de NAR.

**Figura 26.** Atividade de lactonase da PON 1 em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> ou naringenina.



A atividade de lactonase da PON1 foi monitorada espectrofotometricamente (PowerWave XS2, BioTek Instruments Inc) no comprimento de onda de  $\lambda$ 270nm a 25°C por 3 minutos, em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de compostos e/ou preparações de *Siolmatra brasiliensis*: **A)** SbExt (500, 250 e 125 µg/mL), **B)** SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) e **C)** NAR (400, 200 e 100 µM), foram incubadas a 37°C por 40 dias. Às amostras foi adicionado o substrato dihidrocoumarina 100mM, o qual na presença de PON1 é hidrolisado, formando cromóforo, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente. Os valores da atividade enzimática da lactonase da PON1 (UI) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da atividade enzimática; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 12 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ★ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 12 horas; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 12 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ○ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 12 e 48 horas; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

#### 4.4 Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal e avaliação do potencial anti-AGE de SbAcE

A tabela 8 apresenta resultados referentes às concentrações de glicose das amostras de soro sanguíneo humano no tempo 0 e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, na ausência ou na presença de MGO, ou na ausência ou presença de fração acetato de etila do caule de *Siolmatra brasiliensis* (SbAcE; 250, 125 e 62,5 µg/mL).

Antes do início das incubações (tempo 0), é possível observar que não houve diferenças nas concentrações de glicose nas amostras soro, soro + AG, soro + MGO e soro + AG + MGO. Após 48 horas de incubação, amostras soro, soro + AG e soro + MGO não diferiram entre si, somente a amostra soro + AG + MGO apresentou um discreto aumento nas concentrações de glicose, em relação as demais condições. Quando comparados os valores das concentrações de glicose entre os tempos 0 e 48 horas, foi possível observar um discreto aumento na condição soro + AG + MGO.

No tempo 0, quando o soro foi incubado na presença de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), seja soro + SbAcE ou soro + MGO + SbAcE, não foram observadas diferenças nas concentrações de glicose, seja na comparação entre si, ou na comparação com a condição soro sozinho. Após 48 horas, as concentrações de glicose nas amostras soro + SbAcE ou soro + MGO + SbAcE não diferiram entre si, porém apresentaram discreto aumento em relação à condição soro sozinho. Na comparação tempo 0 *versus* tempo 48 horas, amostras de soro + SbAcE e soro + MGO + SbAcE apresentaram um discreto aumento nas concentrações de glicose.

A tabela 9 apresenta resultados referentes às concentrações de proteínas totais (Tabela 9A) e de albumina (Tabela 9B) das amostras de soro sanguíneo humano no tempo 0 e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, na ausência ou na presença de MGO, ou na ausência ou presença de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL).

Antes do início das incubações (tempo 0), os valores de proteínas totais em amostras obtidas das incubações soro, soro + MGO e soro + MGO + AG não foram diferentes entre si, e este perfil se manteve até o tempo de incubação de 48 horas. Após 48 horas de incubação, todas as condições (soro; soro + AG; soro + MGO; soro + AG + MGO) não apresentaram diferenças nas concentrações de proteínas totais na comparação com os valores obtidos das amostras no tempo 0.

Na condição soro + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), as concentrações de proteínas totais foram mantidas em valores semelhantes, seja na comparação entre os grupos, seja na comparação tempo 0 *versus* tempo 48 horas. Na condição soro + MGO + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), antes do início da incubação (tempo 0), as concentrações de proteínas totais foram semelhantes entre os grupos e na comparação com a condição soro sozinho. Já os níveis de proteínas totais das amostras soro + MGO + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), após 48 horas de incubação, apesar de não diferirem entre si, apresentaram valores discretamente aumentados em relação a incubações contendo somente soro, nas condições soro + MGO + SbAcE 125 µg/mL e soro + MGO + SbAcE 62,5 µg/mL.

Antes do início das incubações (tempo 0), as concentrações de albumina nas amostras soro, soro + AG, soro + MGO e soro + AG + MGO não diferiram entre si, e o mesmo perfil foi observado após 48 horas de incubação. Quando foi realizada a comparação tempo 0 *versus* tempo 48 horas, as concentrações de albumina permaneceram semelhantes entre si, em todos os grupos mencionados.

Nas condições soro + SbAcE ou soro + MGO + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), seja no tempo 0 ou 48 horas, as concentrações de albumina não foram diferentes entre os grupos, no mesmo tempo de incubação, também não foram diferentes na comparação intragrupo nos tempos 0 *versus* 48 horas.

**Tabela 8.** Níveis de glicose em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE.

| Horas | Soro         | Soro + AG    | Soro + MGO   | Soro + AG + MGO | Soro +<br>SbAcE 250 µg/mL | Soro +<br>SbAcE 125 µg/mL | Soro +<br>SbAcE 62,5 µg/mL | Soro + MGO +<br>SbAcE 250 µg/mL | Soro + MGO +<br>SbAcE 125 µg/mL | Soro + MGO +<br>SbAcE 62,5 µg/mL |
|-------|--------------|--------------|--------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 0     | 82,0 ± 1,2 a | 81,7 ± 0,9 a | 80,7 ± 0,9 a | 82,0 ± 0,6 a    | 82,3 ± 0,7 a              | 83,0 ± 1,5 a              | 83,3 ± 1,2 a               | 82,0 ± 0,6 a                    | 82,0 ± 0,6 a                    | 82,0 ± 0,6 a                     |
| 6     | 82,7 ± 0,9 a | 84,0 ± 0,0 a | 80,7 ± 0,3 a | 84,0 ± 0,6 a    | 79,7 ± 2,3 a              | 82,3 ± 0,3 a              | 83,3 ± 0,3 a               | 82,3 ± 0,3 a                    | 82,7 ± 0,3 a                    | 80,7 ± 3,8 a                     |
| 12    | 83,0 ± 0,0 b | 83,3 ± 0,3 b | 81,0 ± 0,6 a | 84,3 ± 0,7 bc   | 85,7 ± 0,3 c              | 85,7 ± 0,9 c              | 86,0 ± 0,6 c               | 84,3 ± 0,3 b                    | 84,3 ± 0,3 b                    | 85,0 ± 0,6 b                     |
| 24    | 82,3 ± 0,3 b | 83,3 ± 0,3 c | 80,0 ± 0,6 a | 84,3 ± 0,7 cd   | 85,3 ± 0,3 d              | 85,0 ± 0,0 d              | 85,7 ± 0,3 d               | 85,0 ± 0,0 d                    | 84,7 ± 0,3 d                    | 85,7 ± 0,3 d                     |
| 48    | 81,3 ± 0,3 a | 81,7 ± 0,3 a | 81,3 ± 0,7 a | 83,3 ± 0,7 b    | 84,0 ± 0,0 b              | 84,3 ± 0,3 b              | 84,3 ± 0,7 b               | 84,7 ± 0,3 b                    | 84,3 ± 0,3 b                    | 85,0 ± 0,0 b                     |

A glicemia foi monitorada em sistema automatizado utilizando química seca (Vitros250, Ortho Clinical Diagnostics), em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de na presença fração acetato de etila do extrato bruto hidroetanólico de *Siolmatra brasiliensis*: SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), foram incubadas a 37°C por 48 horas. As tabelas apresentam os valores de albumina expressos em g/dL como médias ± erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

**Tabela 9.** Níveis de proteínas totais e albumina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE.

**A )**

| Horas | Soro          | Soro + AG     | Soro + MGO     | Soro + AG + MGO | Soro +<br>SbAcE 250 µg/mL | Soro +<br>SbAcE 125 µg/mL | Soro +<br>SbAcE 62,5 µg/mL | Soro + MGO +<br>SbAcE 250 µg/mL | Soro + MGO +<br>SbAcE 125 µg/mL | Soro + MGO +<br>SbAcE 62,5 µg/mL |
|-------|---------------|---------------|----------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 0     | 6,78 ± 0,10 b | 5,78 ± 0,49 a | 5,93 ± 0,37 ab | 6,62 ± 0,10 b   | 6,90 ± 0,08 b             | 6,94 ± 0,09 b             | 6,94 ± 0,10 b              | 6,87 ± 0,08 b                   | 6,83 ± 0,07 b                   | 6,80 ± 0,09 b                    |
| 6     | 7,00 ± 0,04 b | 5,47 ± 0,02 a | 6,97 ± 0,07 b  | 7,04 ± 0,03 b   | 6,70 ± 0,16 b             | 7,02 ± 0,05 b             | 7,09 ± 0,03 b              | 7,04 ± 0,02 b                   | 7,18 ± 0,05 b                   | 6,97 ± 0,32 b                    |
| 12    | 7,01 ± 0,01 b | 5,49 ± 0,04 a | 7,09 ± 0,01 b  | 7,21 ± 0,01 c   | 7,24 ± 0,04 c             | 7,30 ± 0,04 c             | 7,32 ± 0,01 c              | 7,22 ± 0,04 c                   | 7,27 ± 0,03 c                   | 7,32 ± 0,03 c                    |
| 24    | 6,96 ± 0,03 b | 5,39 ± 0,02 a | 7,03 ± 0,06 bc | 7,08 ± 0,02 bc  | 7,02 ± 0,03 bc            | 7,04 ± 0,04 bc            | 7,13 ± 0,04 bc             | 7,10 ± 0,05 bc                  | 7,11 ± 0,03 bc                  | 7,17 ± 0,04 c                    |
| 48    | 6,93 ± 0,06 b | 5,33 ± 0,05 a | 6,99 ± 0,02 b  | 7,01 ± 0,01 b   | 7,00 ± 0,04 b             | 7,06 ± 0,03 b             | 7,06 ± 0,03 b              | 7,12 ± 0,02 bc                  | 7,18 ± 0,03 c                   | 7,19 ± 0,02 c                    |

**B )**

| Horas | Soro          | Soro + AG     | Soro + MGO    | Soro + AG + MGO | Soro +<br>SbAcE 250 µg/mL | Soro +<br>SbAcE 125 µg/mL | Soro +<br>SbAcE 62,5 µg/mL | Soro + MGO +<br>SbAcE 250 µg/mL | Soro + MGO +<br>SbAcE 125 µg/mL | Soro + MGO +<br>SbAcE 62,5 µg/mL |
|-------|---------------|---------------|---------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 0     | 4,41 ± 0,04 a | 4,34 ± 0,18 a | 4,28 ± 0,16 a | 4,48 ± 0,03 a   | 4,44 ± 0,04 a             | 4,46 ± 0,05 a             | 4,47 ± 0,06 a              | 4,09 ± 0,08 a                   | 4,08 ± 0,04 a                   | 4,12 ± 0,04 a                    |
| 6     | 4,53 ± 0,10 a | 4,51 ± 0,01 a | 4,34 ± 0,47 a | 4,73 ± 0,05 a   | 4,25 ± 0,15 a             | 4,40 ± 0,02 a             | 4,46 ± 0,02 a              | 4,36 ± 0,04 a                   | 4,45 ± 0,04 a                   | 4,30 ± 0,28 a                    |
| 12    | 4,40 ± 0,02 a | 4,60 ± 0,03 b | 4,39 ± 0,03 a | 4,81 ± 0,01 c   | 4,59 ± 0,02 b             | 4,68 ± 0,07 bc            | 4,73 ± 0,02 bc             | 4,59 ± 0,01 b                   | 4,59 ± 0,03 b                   | 4,70 ± 0,05 bc                   |
| 24    | 4,40 ± 0,07 a | 4,60 ± 0,02 b | 4,35 ± 0,04 a | 4,78 ± 0,03 c   | 4,68 ± 0,05 bc            | 4,61 ± 0,04 b             | 4,60 ± 0,03 b              | 4,54 ± 0,01 b                   | 4,61 ± 0,03 b                   | 4,71 ± 0,02 bc                   |
| 48    | 4,38 ± 0,03 a | 4,60 ± 0,00 a | 4,33 ± 0,01 a | 4,69 ± 0,02 a   | 4,48 ± 0,04 a             | 4,58 ± 0,06 a             | 4,59 ± 0,06 a              | 4,53 ± 0,02 a                   | 4,51 ± 0,05 a                   | 4,62 ± 0,06 a                    |

As proteínas totais e albumina foram monitoradas em sistema automatizado utilizando química seca (Vitros250, Ortho Clinical Diagnostics), em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de na presença fração acetato de etila do extrato bruto hidroetanólico de *Siolmatra brasiliensis*: SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), foram incubadas a 37°C por 48 horas. As tabelas apresentam os valores de **A)** proteínas totais e **B)** albumina expressos em g/dL como médias ± erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

A tabela 10 apresenta os resultados referentes aos níveis de ALT (monitorados via atividade da enzima) nas amostras de soro sanguíneo humano no tempo 0 e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, na ausência ou na presença de MGO, e na ausência ou na presença de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL).

No tempo 0, amostras de soro incubadas com AG (soro + AG), MGO (soro + MGO) ou ambos (soro + AG + MGO) apresentaram diminuição na atividade de ALT, em relação às amostras contendo somente soro, o mesmo perfil foi observado após 48 horas de incubação. A amostra contendo somente soro, após 48 horas de incubação, apresentou uma diminuição de 20% na atividade de ALT, em relação à amostra de soro antes do início da incubação (tempo 0). No entanto, as incubações soro + AG, soro + MGO e soro + AG + MGO não demonstraram diferenças nos valores de ALT entre suas respectivas amostras, na comparação tempo 0 *versus* tempo 48 horas.

Antes do início das incubações (tempo 0), a adição de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) às amostras de soro não causou alterações na atividade de ALT, tanto nas comparações entre as diferentes concentrações de SbAcE, quanto nas comparações presença e ausência de SbAcE; o mesmo perfil de resposta foi observado após 48 horas de incubação. Quando foi avaliada a atividade da ALT nas amostras soro + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) e nos tempos 0 *versus* 48 horas, observa-se que houve diminuição na atividade de ALT após 48 horas de incubação, porém os valores de ALT não foram diferentes daqueles observados na condição soro sozinho. As atividades de ALT em amostras de soro + MGO + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), tanto no tempo 0 quanto no tempo 48 horas, não diferiram entre si.

**Tabela 10.** Níveis de ALT em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE.

| na presença de SbAcE: |            |     |  |            |   |  |            |   |  |                 |   |  |                           |     |                           |            |                            |  |                                 |     |                                 |            |                                  |  |            |   |  |            |   |
|-----------------------|------------|-----|--|------------|---|--|------------|---|--|-----------------|---|--|---------------------------|-----|---------------------------|------------|----------------------------|--|---------------------------------|-----|---------------------------------|------------|----------------------------------|--|------------|---|--|------------|---|
| Horas                 | Soro       |     |  | Soro + AG  |   |  | Soro + MGO |   |  | Soro + AG + MGO |   |  | Soro +<br>SbAcE 250 µg/mL |     | Soro +<br>SbAcE 125 µg/mL |            | Soro +<br>SbAcE 62,5 µg/mL |  | Soro + MGO +<br>SbAcE 250 µg/mL |     | Soro + MGO +<br>SbAcE 125 µg/mL |            | Soro + MGO +<br>SbAcE 62,5 µg/mL |  |            |   |  |            |   |
| 0                     | 21,3 ± 0,3 | b   |  | 11,3 ± 0,9 | a |  | 12,7 ± 1,2 | a |  | 13,3 ± 0,3      | a |  | 21,3 ± 0,3                | b   |                           | 21,3 ± 0,3 | b                          |  | 21,7 ± 0,3                      | b   |                                 | 13,0 ± 0,6 | a                                |  | 12,7 ± 0,3 | a |  | 12,0 ± 0,6 | a |
| 6                     | 19,3 ± 0,3 | d   |  | 8,3 ± 0,3  | a |  | 11,7 ± 0,3 | b |  | 14,7 ± 0,3      | c |  | 19,3 ± 0,3                | d   |                           | 19,7 ± 0,3 | d                          |  | 20,0 ± 0,0                      | d   |                                 | 12,0 ± 0,0 | b                                |  | 12,0 ± 0,0 | b |  | 11,7 ± 0,3 | b |
| 12                    | 20,0 ± 0,0 | d   |  | 8,3 ± 0,3  | a |  | 12,7 ± 0,3 | b |  | 15,7 ± 0,3      | c |  | 20,3 ± 0,3                | d   |                           | 21,0 ± 0,0 | d                          |  | 20,5 ± 0,5                      | d   |                                 | 13,0 ± 0,0 | b                                |  | 13,0 ± 0,0 | b |  | 13,3 ± 0,3 | b |
| 24                    | 19,0 ± 0,0 | d   |  | 7,7 ± 0,3  | a |  | 12,7 ± 0,3 | b |  | 14,3 ± 0,3      | c |  | 19,7 ± 0,3                | d   |                           | 19,0 ± 0,0 | d                          |  | 19,3 ± 0,3                      | d   |                                 | 14,0 ± 0,0 | b                                |  | 14,0 ± 0,0 | b |  | 13,7 ± 0,3 | b |
| 48                    | 17,0 ± 0,0 | c ▲ |  | 7,3 ± 0,3  | a |  | 12,7 ± 0,3 | b |  | 13,3 ± 0,3      | b |  | 16,0 ± 0,0                | c ▲ |                           | 16,0 ± 0,0 | c ▲                        |  | 16,7 ± 0,3                      | c ▲ |                                 | 13,0 ± 0,0 | b                                |  | 13,7 ± 0,3 | b |  | 13,7 ± 0,3 | b |

Os níveis de ALT foram monitorados em sistema automatizado utilizando química seca (Vitros250, Ortho Clinical Diagnostics), em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de na presença fração acetato de etila do extrato bruto hidroetanólico de *Siolmatra brasiliensis*: SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), foram incubadas a 37°C por 48 horas. As tabelas apresentam os níveis de ALT expressos em U/L como médias ± erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

A tabela 11 apresenta os resultados referentes aos níveis de triglicerídeos (Tabela 10A), níveis de colesterol total (Tabela 10B) e níveis de HDL-colesterol (Tabela 10C) das amostras de soro sanguíneo humano no tempo 0 e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubação, na ausência ou na presença de MGO, e na ausência ou na presença de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL).

No tempo 0, os níveis de triglicerídeos foram semelhantes entre si nas amostras de soro, soro + MGO e soro + MGO + AG. Porém, após 48 horas de incubação, os níveis de triglicerídeos nas amostras soro e soro + MGO + AG foram discretamente maiores (aproximadamente 8%), em relação aos valores observados no tempo 0, e não diferiram entre si ao término da incubação (48 horas). Nas amostras soro + MGO, após 48 horas de incubação, também houve um discreto aumento (aproximadamente 4%) nos níveis de triglicerídeos, em relação ao tempo 0, no entanto esses valores foram inferiores àqueles encontrados nas condições soro e soro + MGO + AG, após 48 horas.

Antes do início das incubações (tempo 0), as amostras soro + SbAcE ou soro + MGO + SbAcE, em todas as concentrações de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), não apresentaram diferenças entre si em relação aos níveis de triglicerídeos, e também não apresentam diferenças nos níveis desse lipídeo em relação aos valores encontrados nas amostras contendo somente soro. Após 48 horas de incubação, as amostras de soro incubadas com SbAcE em diferentes concentrações, na ausência ou na presença de MGO, apresentaram aumentos nos níveis de triglicerídeos, em relação ao tempo 0: soro + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) apresentaram aumentos de cerca de 9,5%, enquanto soro + MGO + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) apresentaram aumentos de aproximadamente 7,3%. No tempo 48 horas de incubação, amostras contendo SbAcE na ausência ou presença de MGO apresentaram níveis de triglicerídeos superiores às amostras contendo somente soro. Além disso, amostras soro + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) apresentaram um discreto aumento nos níveis de triglicerídeos, em relação aos valores de soro + MGO + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), após 48 horas.

Antes do início das incubações (tempo 0), os níveis de colesterol total foram semelhantes entre si nas amostras de soro, soro + MGO e soro + AG + MGO. O mesmo perfil foi observado após 48 horas de incubação, com exceção das incubações contendo soro + AG + MGO, cujos níveis de colesterol total foram

discretamente aumentados (3,5%) em relação aos valores encontrados nas amostras soro e soro + MGO.

Amostras das incubações de soro + SbAcE e de soro + MGO + SbAcE, em todas as concentrações de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), não apresentaram diferenças entre si em relação aos níveis de colesterol total, antes do início das incubações; o mesmo perfil de resposta foi observado após 48 horas de incubação. Os níveis de colesterol total em amostras de soro contendo SbAcE na ausência ou na presença de MGO não apresentaram diferenças estatísticas entre si, nas comparações intragrupos nos tempos 0 *versus* 48 horas.

No tempo 0, os níveis de HDL-colesterol das amostras de soro, soro + MGO e soro + AG + MGO não apresentaram diferenças entre si, bem como na comparação entre os tempos 0 e 48 horas, em suas respectivas amostras. Após 48 horas de incubação, os níveis de HDL-colesterol nas amostras de soro, soro + MGO e soro + AG + MGO) não diferem entre si.

Antes do início das incubações (tempo 0), a adição de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) nas amostras de soro ou nas amostras de soro + MGO não causou mudanças nos níveis de HDL-colesterol. Após 48 horas, os níveis de HDL-colesterol nestas amostras continuaram semelhantes entre si e semelhantes em relação aos valores encontrados no tempo 0. Adicionalmente, no tempo de 48 horas, todas as amostras de soro incubadas na presença de SbAcE (soro + SbAcE; soro + MGO + SbAcE) não apresentaram diferenças entre si quanto aos níveis de HDL-colesterol, sendo que soro + MGO + SbAcE 250µg/mL foi a única condição que apresentou os mesmos níveis de HDL-colesterol que aqueles encontrados na condição soro sozinho.

**Tabela 11.** Níveis de triglicerídeos, colesterol total e HDL-colesterol em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE.

| A ) | Horas | Soro        |     | Soro + AG   |     | Soro + MGO  |     | Soro + AG + MGO |     | Soro +<br>SbAcE 250 µg/mL |     | Soro +<br>SbAcE 125 µg/mL |     | Soro +<br>SbAcE 62,5 µg/mL |     | Soro + MGO +<br>SbAcE 250 µg/mL |     | Soro + MGO +<br>SbAcE 125 µg/mL |     | Soro + MGO +<br>SbAcE 62,5 µg/mL |     |
|-----|-------|-------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|-----------------|-----|---------------------------|-----|---------------------------|-----|----------------------------|-----|---------------------------------|-----|---------------------------------|-----|----------------------------------|-----|
|     |       |             |     |             |     |             |     |                 |     |                           |     |                           |     |                            |     |                                 |     |                                 |     |                                  |     |
|     | 0     | 104,3 ± 1,5 | a   | 105,0 ± 0,6 | a   | 104,7 ± 1,2 | a   | 104,7 ± 1,2     | a   | 108,3 ± 0,3               | a   | 108,0 ± 1,2               | a   | 107,7 ± 1,9                | a   | 109,0 ± 1,2                     | a   | 107,0 ± 1,0                     | a   | 107,7 ± 1,2                      | a   |
|     | 6     | 108,0 ± 0,6 | a   | 108,7 ± 0,3 | a   | 107,0 ± 0,6 | a   | 110,0 ± 0,6     | a   | 105,7 ± 2,8               | a   | 109,0 ± 0,6               | a   | 109,7 ± 0,7                | a   | 113,0 ± 1,0                     | a   | 111,7 ± 0,3                     | a   | 108,0 ± 5,0                      | a   |
|     | 12    | 109,0 ± 0,0 | a   | 109,7 ± 0,3 | a   | 110,7 ± 1,2 | a   | 111,7 ± 0,7     | a   | 116,0 ± 1,0               | b   | 114,7 ± 0,9               | b   | 114,7 ± 0,3                | b   | 115,7 ± 0,3                     | b   | 113,3 ± 0,3                     | b   | 115,0 ± 1,0                      | b   |
|     | 24    | 109,3 ± 0,3 | b   | 110,7 ± 0,7 | b   | 106,3 ± 0,9 | a   | 110,3 ± 0,3     | b   | 116,0 ± 0,6               | c   | 113,3 ± 0,3               | c   | 114,0 ± 0,6                | c   | 115,7 ± 0,3                     | c   | 113,7 ± 1,2                     | c   | 114,3 ± 0,3                      | c   |
|     | 48    | 112,7 ± 0,3 | b ▲ | 112,7 ± 0,3 | b ▲ | 109,0 ± 0,6 | a ▲ | 114,0 ± 0,6     | b ▲ | 119,0 ± 0,6               | d ▲ | 118,0 ± 0,0               | d ▲ | 117,7 ± 0,3                | d ▲ | 116,3 ± 0,3                     | c ▲ | 115,3 ± 0,3                     | c ▲ | 115,7 ± 0,3                      | c ▲ |

| B ) | Horas | Soro        |    | Soro + AG   |   | Soro + MGO  |    | Soro + AG + MGO |    | Soro +<br>SbAcE 250 µg/mL |    | Soro +<br>SbAcE 125 µg/mL |    | Soro +<br>SbAcE 62,5 µg/mL |    | Soro + MGO +<br>SbAcE 250 µg/mL |    | Soro + MGO +<br>SbAcE 125 µg/mL |    | Soro + MGO +<br>SbAcE 62,5 µg/mL |   |
|-----|-------|-------------|----|-------------|---|-------------|----|-----------------|----|---------------------------|----|---------------------------|----|----------------------------|----|---------------------------------|----|---------------------------------|----|----------------------------------|---|
|     |       |             |    |             |   |             |    |                 |    |                           |    |                           |    |                            |    |                                 |    |                                 |    |                                  |   |
|     | 0     | 182,7 ± 3,9 | a  | 179,0 ± 1,2 | a | 178,3 ± 2,9 | a  | 183,3 ± 0,9     | a  | 180,3 ± 1,8               | a  | 183,7 ± 2,3               | a  | 183,0 ± 2,9                | a  | 184,0 ± 1,0                     | a  | 183,7 ± 1,5                     | a  | 182,0 ± 2,1                      | a |
|     | 6     | 181,3 ± 1,2 | a  | 179,0 ± 0,6 | a | 179,3 ± 0,9 | a  | 185,0 ± 1,5     | a  | 174,0 ± 4,0               | a  | 179,0 ± 1,0               | a  | 180,7 ± 0,9                | a  | 186,0 ± 2,1                     | a  | 186,7 ± 0,7                     | a  | 180,7 ± 8,8                      | a |
|     | 12    | 181,3 ± 2,0 | ab | 182,0 ± 0,0 | b | 178,3 ± 1,8 | a  | 185,7 ± 0,7     | c  | 185,3 ± 1,3               | c  | 189,0 ± 2,3               | c  | 189,0 ± 1,7                | c  | 188,3 ± 0,9                     | c  | 186,7 ± 3,0                     | c  | 189,7 ± 2,0                      | c |
|     | 24    | 180,0 ± 2,6 | ab | 181,3 ± 1,2 | b | 177,7 ± 1,2 | a  | 187,0 ± 0,6     | cd | 184,7 ± 2,2               | c  | 185,7 ± 1,5               | c  | 186,0 ± 1,0                | c  | 189,0 ± 2,5                     | d  | 188,3 ± 3,8                     | d  | 190,7 ± 2,6                      | d |
|     | 48    | 183,3 ± 1,8 | ab | 179,7 ± 1,3 | a | 183,3 ± 0,3 | ab | 189,7 ± 0,9     | c  | 185,7 ± 0,9               | bc | 186,7 ± 2,0               | bc | 187,0 ± 2,0                | bc | 185,3 ± 1,9                     | bc | 188,0 ± 0,6                     | bc | 190,3 ± 0,9                      | c |

| C ) | Horas | Soro       |    | Soro + AG  |    | Soro + MGO |   | Soro + AG + MGO |    | Soro +<br>SbAcE 250 µg/mL |   | Soro +<br>SbAcE 125 µg/mL |   | Soro +<br>SbAcE 62,5 µg/mL |   | Soro + MGO +<br>SbAcE 250 µg/mL |    | Soro + MGO +<br>SbAcE 125 µg/mL |    | Soro + MGO +<br>SbAcE 62,5 µg/mL |    |
|-----|-------|------------|----|------------|----|------------|---|-----------------|----|---------------------------|---|---------------------------|---|----------------------------|---|---------------------------------|----|---------------------------------|----|----------------------------------|----|
|     |       |            |    |            |    |            |   |                 |    |                           |   |                           |   |                            |   |                                 |    |                                 |    |                                  |    |
|     | 0     | 70,3 ± 1,2 | a  | 70,7 ± 0,7 | a  | 69,3 ± 1,5 | a | 68,7 ± 0,7      | a  | 71,7 ± 0,7                | a | 73,0 ± 1,0                | a | 71,7 ± 1,5                 | a | 70,3 ± 1,8                      | a  | 69,7 ± 1,3                      | a  | 71,3 ± 0,9                       | a  |
|     | 6     | 73,0 ± 0,6 | a  | 74,0 ± 0,6 | a  | 70,0 ± 0,6 | a | 70,3 ± 0,3      | a  | 70,7 ± 2,4                | a | 73,3 ± 0,3                | a | 75,3 ± 0,7                 | a | 72,3 ± 1,2                      | a  | 71,7 ± 0,3                      | a  | 68,7 ± 3,8                       | a  |
|     | 12    | 75,0 ± 0,0 | c  | 75,3 ± 0,3 | c  | 70,0 ± 0,6 | a | 71,3 ± 0,3      | ab | 79,7 ± 0,9                | d | 80,0 ± 1,2                | d | 78,3 ± 0,3                 | d | 73,3 ± 0,3                      | bc | 73,0 ± 0,6                      | bc | 74,7 ± 0,3                       | bc |
|     | 24    | 71,7 ± 0,3 | bc | 73,7 ± 0,9 | cd | 68,3 ± 0,7 | a | 70,3 ± 0,3      | b  | 74,3 ± 0,3                | d | 76,0 ± 0,6                | d | 77,0 ± 1,2                 | d | 70,0 ± 0,0                      | b  | 70,7 ± 0,9                      | b  | 72,7 ± 0,3                       | bc |
|     | 48    | 68,3 ± 0,3 | a  | 67,0 ± 0,6 | a  | 67,7 ± 0,3 | a | 67,7 ± 0,3      | a  | 70,7 ± 0,7                | b | 72,7 ± 0,3                | b | 71,7 ± 0,3                 | b | 69,3 ± 0,9                      | ab | 70,7 ± 0,7                      | b  | 71,7 ± 0,3                       | b  |

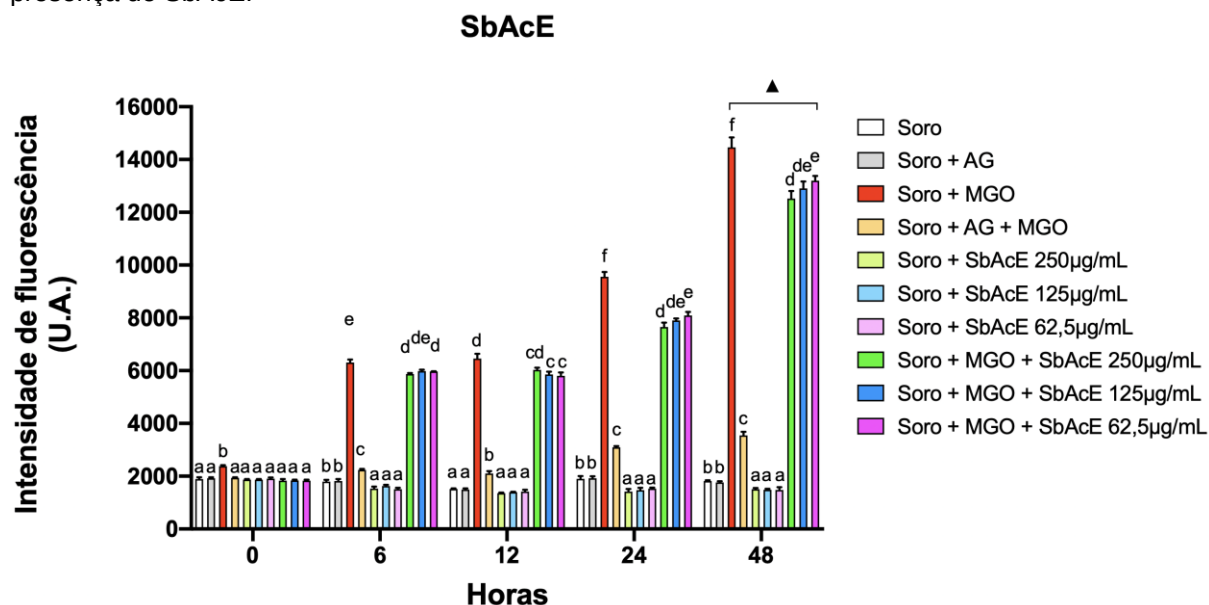
Os níveis de triglicerídeos, colesterol total e HDL-colesterol foram monitorados em sistema automatizado utilizando química seca (Vitros250, Ortho Clinical Diagnostics), em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de na presença fração acetato de etila do extrato bruto hidroetanólico de *Siolmatra brasiliensis*: SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), foram incubadas a 37°C por 48 horas. As tabelas apresentam os níveis de **A)** triglicerídeos e **B)** colesterol total e **C)** HDL-colesterol expressos em mg/dL como médias ± erro padrão da média (EPM) ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

Na figura 27 encontram-se os resultados relacionados à estimativa dos AGEs fluorescentes, monitorados nos tempos 0 (antes da incubação) e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubações de soro sanguíneo humano na ausência ou na presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), e na ausência ou na presença de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL).

Nas amostras soro + MGO, houve um aumento progressivo na intensidade de fluorescência dos AGEs, desde o tempo 0 até o tempo de 48 horas, sendo que a intensidade de fluorescência em 48 horas foi 764% maior em relação às amostras contendo somente soro. Tal como esperado, a AG mostrou-se efetiva na inibição da formação de AGEs fluorescentes, diminuindo significativamente a intensidade de fluorescência na amostra soro + MGO + AG, em relação ao soro + MGO, em todos os tempos de incubação.

A fração acetato de etila de *Siolmatra brasiliensis* (SbAcE), em todas as concentrações estudadas (250, 125 e 62,5 µg/mL), quando incubada na presença de soro + MGO, demonstrou ser capaz de inibir significativamente a formação de AGEs fluorescentes, a partir de 24 horas de incubação, com uma discreta relação concentração-dependente de inibição de formação de AGEs. No tempo de 48 horas, as diferentes concentrações de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) foram capazes de inibir a formação de AGEs fluorescentes no sistema-modelo soro + MGO, em aproximadamente 13%, 10% e 8%, respectivamente, quando comparados aos valores de AGEs fluorescentes) na condição soro + MGO.

**Figura 27.** Intensidade de fluorescência relativa aos AGEs em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE.



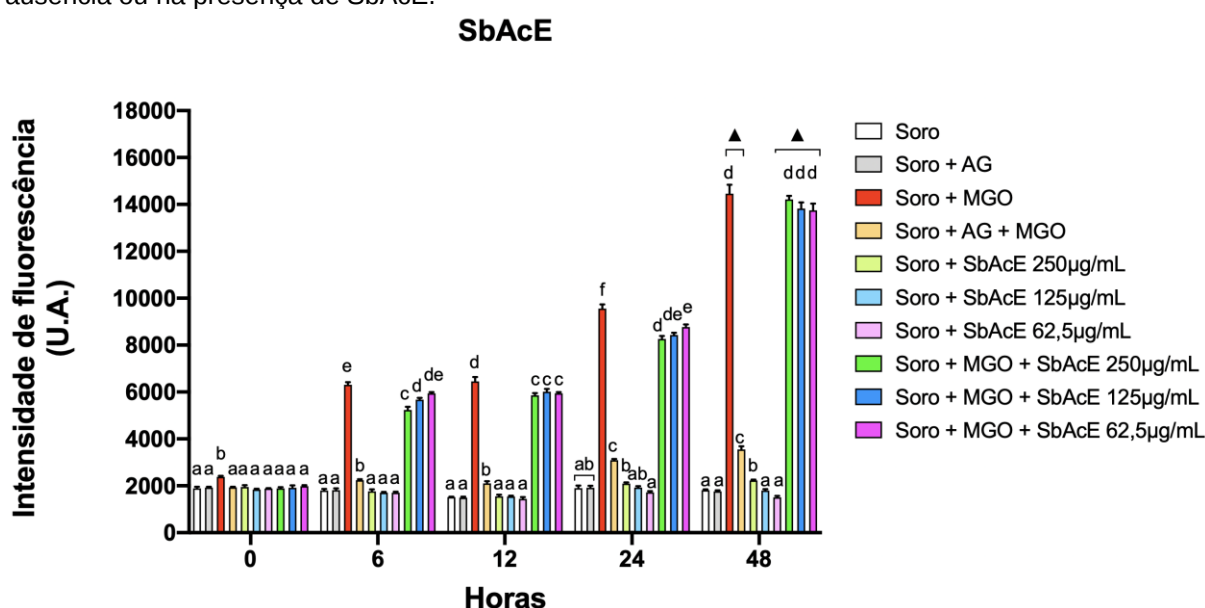
A formação de AGEs fluorescentes foi monitorado através de fluorescência em fluorímetro (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc) nos comprimentos de onda de excitação de  $\lambda 350\text{nm}$  e emissão de  $\lambda 440\text{nm}$ , em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença da fração acetato de etila do extrato bruto hidroetanólico de *Siolmatra brasiliensis*: SbAcE (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 40 dias. As amostras foram diluídas na proporção 1:25 com tampão PBS. Os valores de intensidade de fluorescência (U.A.) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

Na figura 28 estão apresentados os valores de fluorescência referentes à N'-formilquinurenina, monitorados nos tempos 0 (antes da incubação) e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubações de soro sanguíneo humano na ausência ou na presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), e na ausência ou na presença de SbAcE (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ).

Ao longo do período de incubação, foi possível observar um aumento progressivo da intensidade de fluorescência relativa a N'-formilquinurenina em amostras de soro + MGO, em relação a amostras contendo somente soro. Ao término da incubação (48 horas) amostras soro + MGO apresentam aumento de 7,9 vezes nos níveis de N'-formilquinurenina, em relação às amostras contendo somente soro. A AG apresenta efeito protetor sobre a oxidação de resíduos de triptofano, uma vez que diminuiu em 75% a intensidade de fluorescência de N'-formilquinurenina nas incubações de soro + MGO.

A presença de SbAcE nas amostras de soro + MGO + SbAcE, nas diferentes concentrações (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), inibiu discretamente a intensidade de fluorescência relativa a N'-formilquinurenina, de maneira concentração-dependente, até o tempo de 24 horas, sendo capaz de diminuir os níveis desse marcador em 13% (250  $\mu\text{g/mL}$ ), 11% (125  $\mu\text{g/mL}$ ) e 8% (62,5  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 48 horas de incubação, amostras soro + MGO + SbAcE não foi capaz de inibir a formação de N'-formilquinurenina nas incubações de soro + MGO, cujos valores de fluorescência foram semelhantes ao soro + MGO.

**Figura 28.** Intensidade de fluorescência relativa a N'-formilquinurenina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas in vitro em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE.



A formação de N'-formilquinurenina foi monitorado através de fluorescência em fluorímetro (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc) nos comprimentos de onda de excitação de  $\lambda 325\text{nm}$  e emissão de  $\lambda 344\text{nm}$ , em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença da fração acetato de etila do extrato bruto hidroetanólico de *Siolmatra brasiliensis*: SbAcE (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 40 dias. As amostras foram diluídas na proporção 1:25 com tampão PBS. Os valores de intensidade de fluorescência (U.A.) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo  $\blacktriangle$  indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

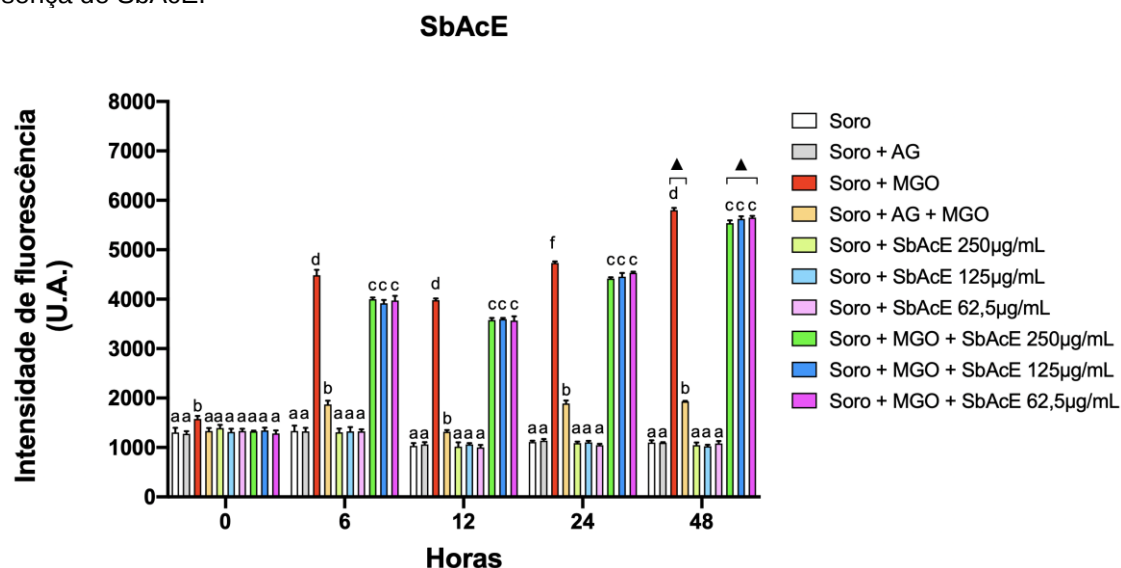
Na figura 29 são apresentados valores de fluorescência referentes à quinurenina, monitorados nos tempos 0 (antes da incubação) e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubações de soro sanguíneo humano na ausência ou na presença de

MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), e na ausência ou na presença de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL).

Amostras de soro + MGO apresentaram um aumento na intensidade de fluorescência desde o tempo 0 até o tempo de 48 horas; houve um aumento de 5 vezes na intensidade de fluorescência da quinurenina em amostras soro + MGO, após 48 horas de incubação, em relação às amostras contendo somente soro. A AG foi capaz de promover significativa inibição na formação de quinurenina nas amostras de soro + MGO, em todos os tempos analisados.

Amostras de soro + MGO + SbAcE, nas diferentes concentrações da fração (250, 125 e 62,5 µg/mL) não mostraram diferenças nos níveis de quinurenina no decorrer da incubação. No tempo de 48 horas, a presença de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) no sistema-modelo soro + MGO foi capaz de inibir discretamente a intensidade de fluorescência relativa à quinurenina.

**Figura 29.** Intensidade de fluorescência relativa a quinurenina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas in vitro em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE.



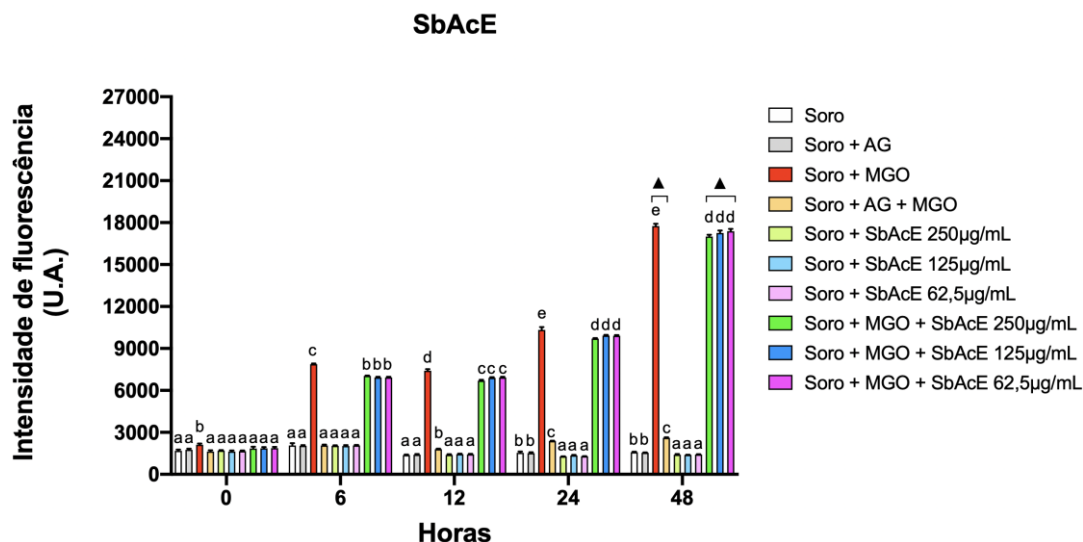
A formação de quinurenina foi monitorado através de fluorescência em fluorímetro (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc) nos comprimentos de onda de excitação de 360nm e emissão de 480nm, em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença da fração acetato de etila do extrato bruto hidroetanólico de *Siolmatra brasiliensis*: SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), foram incubadas a 37°C por 40 dias. As amostras foram diluídas na proporção 1:25 com tampão PBS. Os valores de intensidade de fluorescência (U.A.) estão expressos como médias ± erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

Na figura 30 estão os resultados referentes aos valores de fluorescência de ditirosina, monitorados nos tempos 0 (antes da incubação) e após 6, 12, 24 e 48 horas de incubações de soro sanguíneo humano na ausência ou na presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), e na ausência ou na presença de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL).

Desde antes do início da incubação (tempo 0) até o tempo de 48 horas, foi possível observar que as incubações contendo soro + MGO apresentaram maior intensidade de fluorescência relativa à ditirosina, em comparação às incubações contendo somente soro; no tempo de 48 horas, houve um aumento de 11 vezes nos níveis de ditirosina na condição soro + MGO. A AG foi capaz de inibir a formação de ditirosina em aproximadamente 85% nas incubações de soro + MGO.

SbAcE, em todas as concentrações estudadas, foi capaz de diminuir discretamente a formação de ditirosina no sistema-modelo soro + MGO, desde o tempo 0 até 48 horas de incubação. No tempo de 48 horas, foi possível observar que as incubações contendo soro + MGO + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) apresentaram valores de ditirosina que não diferiram entre si, bem como apresentaram uma discreta inibição na intensidade de fluorescência relativa à ditirosina, em comparação à condição soro + MGO.

**Figura 30.** Intensidade de fluorescência relativa a ditirosina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas in vitro em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE.



A formação de ditirosina foi monitorado através de fluorescência em fluorímetro (Synergy H1TM, BioTek Instruments Inc) nos comprimentos de onda de excitação de  $\lambda 330\text{nm}$  e emissão de  $\lambda 415\text{nm}$ , em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença da fração acetato de etila do extrato bruto hidroetanólico de *Siolmatra brasiliensis*: SbAcE (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ), foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 40 dias. As amostras foram diluídas na proporção 1:25 com tampão PBS. Os valores de intensidade de fluorescência (U.A.) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

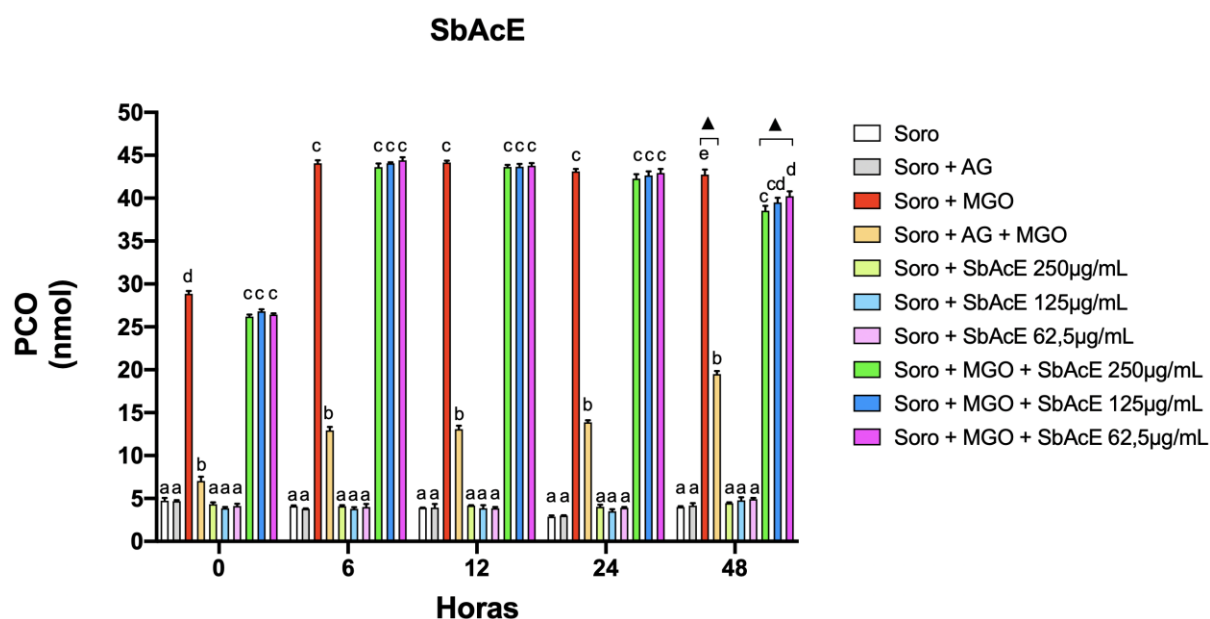
Na figura 31 são apresentados os valores relacionados os níveis de PCO em amostras de soro sanguíneo humano incubados na ausência ou presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), e na ausência ou na presença de SbAcE (250, 125 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ).

Já no tempo 0, foi possível observar um aumento significativo (6 vezes) nos níveis de PCO nas incubações soro + MGO, em relação às incubações contendo somente soro. Nas incubações contendo soro + MGO, este aumento nos valores de PCO foi progressivo, até o tempo de 24 horas, alcançando valores até 15 vezes maiores em comparação às incubações contendo somente soro, e a partir desse tempo ocorre estabilização nos níveis desse biomarcador. A adição de AG nas incubações contendo soro + MGO foi capaz de diminuir significativamente os níveis de PCO, desde o tempo 0 até 48 horas de incubação, sendo que no tempo de 48

horas, soro + AG + MGO apresentou diminuição de 54% nos níveis de PCO, em relação aos valores encontrados em soro + MGO.

Desde o tempo 0, incubações contendo soro + MGO + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) apresentaram discreta diminuição nos níveis de PCO, em relação às amostras de soro + MGO. Após 48 horas de incubação, incubações contendo soro + MGO + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) ainda apresentaram discreta diminuição nos níveis de PCO, sendo possível observar uma relação concentração-dependente, com inibições na formação de PCO de cerca de 10% (250 µg/mL), 8% (125 µg/mL) e 6% (62,5 µg/mL) quando comparados aos valores obtidos a partir da incubação soro + MGO.

**Figura 31.** Níveis de PCO em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas in vitro em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE.



Os níveis de PCO foram monitorados espectrofotometricamente (PowerWave XS2, BioTek Instruments Inc) no comprimento de onda de  $\lambda 370\text{nm}$ , em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença da fração acetato de etila do extrato bruto hidroetanólico de *Siolmatra brasiliensis*: SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), foram incubadas a 37°C por 40 dias. Os grupos carbonilas presentes nas proteínas das amostras reagem com DNPH, formando 2,4-dinitrofenilhidrazona, o qual é monitorado espectrofotometricamente. Os níveis de PCO (mmol/L) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da fluorescência; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

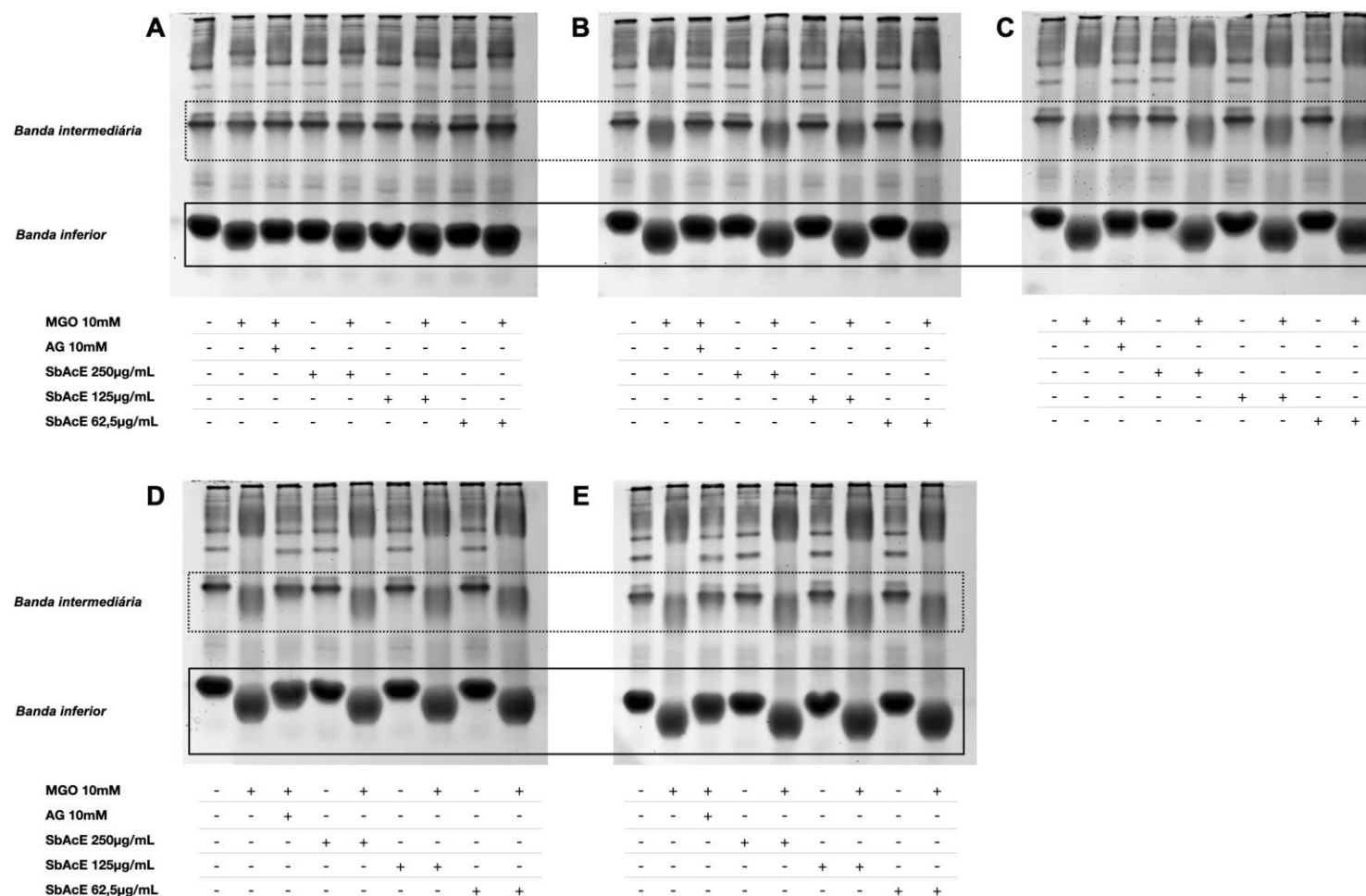
Na figura 32 encontram-se os resultados relacionados ao perfil de separação eletroforética de proteínas do soro sanguíneo humano das incubações conduzidas

na ausência ou presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM) e na ausência ou na presença da fração acetato de etila de *Siolmatra brasiliensis* (SbAcE 250, 125 e 62,5 µg/mL), em diferentes tempos, antes do início das incubações (Figura 32A), após 6 horas (Figura 32B), após 12 horas (Figura 32C), após 24 horas (Figura 32D) e após 24 horas (Figura 32E).

Com o decorrer do tempo de incubação, a condição soro + MGO demonstra alterações na corrida eletroforética, com ênfase na dispersão da banda intermediária (Figuras 31 B, C, D e E). A adição de AG no sistema-modelo soro + MGO demonstrou ser capaz de inibir as alterações na corrida eletroforética promovidas pelo MGO.

Amostras de soro acrescidas de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) não demonstraram alterações no perfil de separação eletroforética, apresentando perfil semelhante às amostras contendo somente soro, ao longo de todo o período experimental. Quando SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) foi adicionada ao sistema-modelo de soro + MGO, não foi observada inibição das alterações na corrida eletroforética promovidas pelo MGO.

**Figura 32.** Perfil de separação eletroforética de proteínas séricas em sistema-modelo de glicação in vitro de soro sanguíneo incubado com metilglioxal tratados com SbAcE.



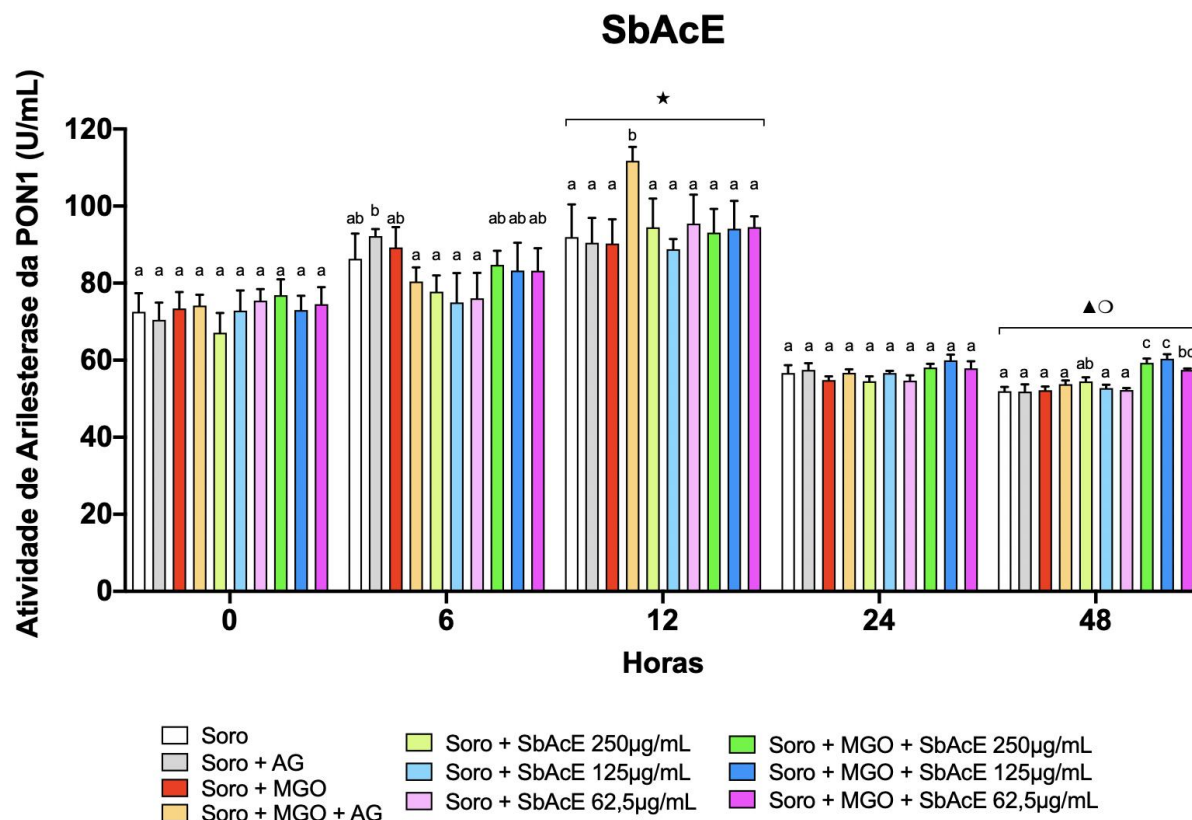
As figuras representam o perfil de separação de proteínas em eletroforese de gel de acrilamida/bisacrilamida, sob condições não-desnaturantes, de incubações de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL), em diferentes tempos, antes do início das incubações (A), após 6 horas (B), após 12 horas (C), após 24 horas (D) e após 48 horas de incubação (E). Abaixo de cada figura está a legenda de ausência (-) ou presença (+) de compostos e/ou de SbAcE.

Na figura 33 estão representados os valores relacionados à atividade arilesterase de PON 1 em amostras de soro sanguíneo humano incubados na ausência ou presença de MGO (10 mM), ausência ou presença de AG (10 mM), e na ausência ou na presença de SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL).

Antes do início das incubações (tempo 0), a adição de AG e/ou MGO no soro sanguíneo humano (soro + AG, soro + MGO, soro + AG + MGO) não alterou significativamente a atividade arilesterase de PON 1, em relação à incubação contendo somente soro. Após 12 horas, somente a incubação soro + MGO + AG apresentou aumento (23%) na atividade arilesterase de PON 1, em relação as demais condições (soro, soro + AG, soro + MGO). Após 48 horas, todas as incubações (soro, soro + AG, soro + MGO, soro + AG + MGO) apresentaram valores semelhantes de atividade de PON 1. Após 12 horas, a atividade arilesterase de PON 1 apresentou-se elevada nas condições soro, soro + AG, soro + MGO e soro + AG + MGO, em relação às respectivas incubações no tempo 0 e 48 horas. Por fim, após 24 e 48 horas de incubação, a atividade de arilesterase de PON 1 foi significativamente diminuída, em todas as condições anteriormente citadas, em relação ao tempo 0.

As incubações de soro sanguíneo na presença de SbAcE (soro + SbAcE; soro + MGO + SbAcE) nas diferentes concentrações da fração da planta (250, 125 e 62,5 µg/mL), tanto no tempo 0 quanto no tempo de 12 horas, não demonstraram diferenças significativas na atividade arilesterase de PON 1, em relação aos valores encontrados na incubação contendo somente soro. Após 48 horas, houve um discreto aumento na atividade arilesterase de PON 1 nas incubações contendo soro + MGO + SbAcE, nas diferentes concentrações. Semelhante ao observado em amostras contendo somente soro, após 12 horas de incubação as amostras de soro contendo SbAcE (soro + SbAcE; soro + MGO + SbAcE) apresentaram aumento na atividade arilesterase da PON 1, em relação ao tempo 0. Por fim, após 48 horas, as incubações soro + SbAcE e soro + MGO + SbAcE, nas diferentes concentrações da fração (250, 125 e 62,5 µg/mL), apresentam valores diminuídos de atividade arilesterase de PON 1, em relação ao tempo 0.

**Figura 33.** Atividade de arilesterase da PON 1 em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas in vitro em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE.



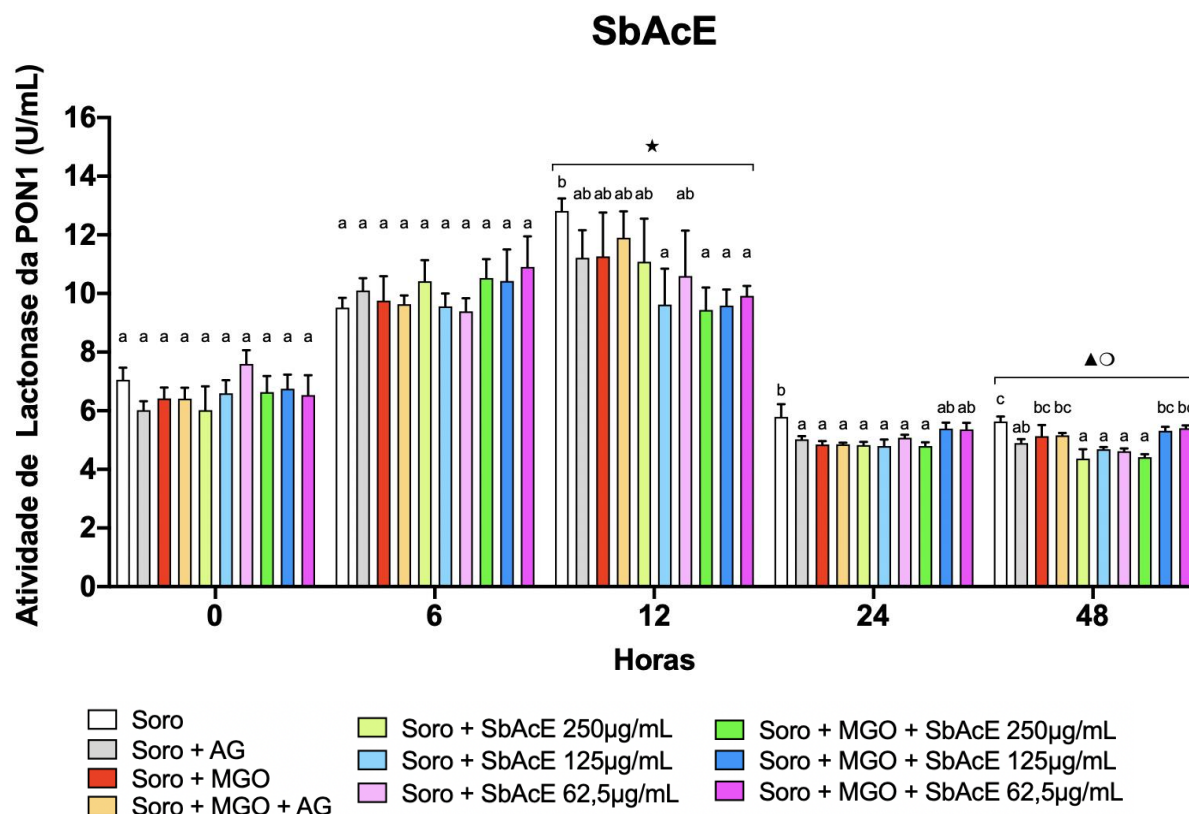
A atividade de arilesterase da PON1 foi monitorada espectrofotometricamente (PowerWave XS2, BioTek Instruments Inc) no comprimento de onda de  $\lambda 270\text{nm}$  a  $25^\circ\text{C}$  por 3 minutos, em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença da fração acetato de etila do extrato bruto hidroetanólico de *Siolmatra brasiliensis*: SbAcE (250, 125 e  $62,5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ), foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 40 dias. Às amostras foi adicionado o substrato fenilacetato  $2,96\text{mM}$ , o qual na presença de PON1 é hidrolisado, formando cromóforo, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente. Os valores da atividade enzimática da arilesterase da PON1 (UI) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da atividade enzimática; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 12 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ★ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 12 horas; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 12 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ○ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 12 e 48 horas; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

Na figura 34 estão representados os valores relacionados à atividade lactonase de PON 1 em amostras de soro sanguíneo humano incubados na ausência ou presença de MGO ( $10\text{ mM}$ ), ausência ou presença de AG ( $10\text{ mM}$ ), e na ausência ou na presença de SbAcE ( $250$ ,  $125$  e  $62,5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ).

No tempo 0, isto é, antes do início das incubações, amostras de soro sanguíneo humano incubadas na presença de AG e/ou MGO (soro + AG, soro + MGO, soro + AG + MGO) não apresentaram alterações significativas na atividade lactonase de PON 1, em relação à incubação contendo somente soro. Após 12 horas, as incubações contendo soro, soro + AG, soro + MGO e soro + AG + MGO não apresentaram diferenças entre si quanto à atividade lactonase de PON 1, porém todas as incubações neste tempo apresentaram aumentos na atividade da enzima, em relação aos respectivos valores obtidos das incubações no tempo 0. Após 48 horas, incubações de soro + MGO e soro + AG + MGO não diferiram significativamente nos valores de atividade lactonase de PON 1, em relação à incubação contendo somente soro, porém todas as incubações (soro, soro + AG, soro + MGO, soro + AG + MGO) apresentaram atividade de PON 1 com valores inferiores em relação às suas respectivas incubações no tempo 0.

Antes do início das incubações (tempo 0), amostras de soro + SbAcE e soro + MGO + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) não apresentaram diferenças na atividade lactonase de PON 1, seja na comparação entre si ou na comparação com a condição soro sozinho. Após 12 horas de incubação, foi possível observar um aumento na atividade lactonase de PON 1, em relação às suas respectivas incubações no tempo 0, da seguinte maneira: aumento de 84% para a condição soro + SbAcE, e aumento de 51,8% para as demais incubações. Ao término da incubação (48 horas), amostras de soro + SbAcE (250, 125 e 62,5 µg/mL) não apresentaram diferenças entre si nos valores de atividade lactonase da PON 1, porém ela foi inferior aos valores encontrados na condição soro sozinho. Ainda após 48 horas de incubação, a atividade lactonase da PON 1 das amostras contendo soro + MGO + SbAcE 125 µg/mL e soro + MGO + SbAcE 62,5 µg/mL não diferiram entre si, bem como não diferiram em relação à amostra soro sozinho.

**Figura 34.** Atividade de lactonase da PON 1 em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas in vitro em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal, na ausência ou na presença de SbAcE.



A atividade de lactonase da PON1 foi monitorada espectrofotometricamente (PowerWave XS2, BioTek Instruments Inc) no comprimento de onda de  $\lambda 270\text{nm}$  a  $25^\circ\text{C}$  por 3 minutos, em amostras de soro sanguíneo humano na presença ou ausência de metilglioxal (MGO), e/ou aminoguanidina (AG), e na presença da fração acetato de etila do extrato bruto hidroetanólico de *Siolmatra brasiliensis*: SbAcE (250, 125 e  $62,5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ), foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 40 dias. Às amostras foi adicionado o substrato dihidrocoumarina  $100\text{mM}$ , o qual na presença de PON1 é hidrolisado, formando cromóforo, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente. Os valores da atividade enzimática da lactonase da PON1 (UI) estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM), ( $n = 3$ ). Os valores em cada período de tempo foram avaliados através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, letras distintas indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos na hora de monitoramento da atividade enzimática; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 12 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ★ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 12 horas; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 12 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ○ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 12 e 48 horas; os valores dos respectivos grupos entre os períodos de tempo 0 e 48 horas foi avaliado através do teste *t-student*, o símbolo ▲ indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 0 e 48 horas.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação das alterações glico-oxidativas em sistema-modelo de glicação *in vitro* com glicose

Nos sistemas-modelo de glicação *in vitro*, carboidratos redutores reagem de forma não enzimática com grupos amino das proteínas, gerando as bases de Schiff, que então sofrem rearranjos e formam os produtos de Amadori, os quais irão sofrer processos de desidratação e rearranjos, e assim, formam os AGEs (ABBAS et al., 2015). Durante o processo de glicação proteica pode ocorrer modificações na estrutura das proteínas promovendo a perda da funcionalidade da proteína, o que pode favorecer danos funcionais em diversos tipos de tecidos (RABBANI; THORNALLEY, 2014).

A formação de AGEs pode ser favorecida devido a processos oxidativos. Os carboidratos redutores podem ser auto-oxidados e contribuir no estabelecimento de uma condição glico-oxidativa (CHETYRKIN et al., 2011). Os produtos de Amadori produzidos durante o processo de glicação, na presença de oxigênio molecular e metais de transição, podem favorecer a geração de radical superóxido, o qual através da reação de Fenton, irá gerar o radical hidroxila (ABBAS et al., 2015).

Neste estudo, foi possível observar a temporalidade dos efeitos da presença de glicose em elevadas concentrações, em amostras de soro sanguíneo (figura 9), com a ocorrência de eventos de glicação, uma vez que houve um aumento progressivo na intensidade de fluorescência relativa aos AGEs em relação ao tempo. Este perfil de resposta também pode ser observado em outros trabalhos que realizaram a incubação de albumina sérica bovina com glicose (PALERMO, 2017; MOTTA et al., 2018; FRANCO, 2018; DOS SANTOS et al., 2019).

O aumento na formação de AGEs pode estar relacionado a modificação na estrutura das proteínas, o que é demonstrado na figura 10, a progressão nas modificações estruturais nas bandas relativas às frações de proteínas séricas, no decorrer das incubações de soro sanguíneo na presença de glicose. Resultados semelhantes foram observados por FRANCO (2018), que utilizou o sistema-modelo de glicação de albumina sérica bovina com glicose *in vitro*, e ao promover a separação de proteínas em gel de eletroforese do tipo SDS-PAGE, foi possível observar a progressão as modificações estruturais da albumina ao longo do tempo.

O biomarcador PCO é utilizado para avaliar as modificações glico-oxidativas em proteínas. Neste estudo, foi possível observar aumento dos níveis de PCO em soro sanguíneo incubado na presença de glicose (figura 11). FRANCO (2018), utilizando sistema-modelo de glicação de albumina com glicose ou com frutose *in vitro*, observou que os níveis de PCO também aumentavam no decorrer dos dias de incubação da proteína na presença desses monossacarídeos.

Os resultados referentes aos níveis de TBARS (figura 12) sugerem que esta análise não é aplicável para este sistema-modelo de glicação *in vitro*, ou devem ser realizados ajustes, seja no sistema-modelo com mudanças no promotor das alterações glico-oxidativas, seja na substituição da metodologia de determinação de produtos de peroxidação lipídica, como por exemplo, o uso de HPLC. Uma vez que no dia 0, as amostras de soro sanguíneo acrescidas de glicose, porém ainda sem incubações, já apresentaram níveis 18 vezes maiores de TBARS, em relação aos valores em amostras de soro não acrescidas de glicose.

O processo de glicação de biomoléculas pode afetar a estrutura e função de diversas proteínas plasmáticas, sendo a albumina a mais estudada (RONDEAU et al., 2010). As enzimas antioxidantes formam um sistema importante para detoxificação de radicais livres, e modificações na função dessas enzimas devido à glicação podem levar a um acúmulo de radicais livres e consequentemente favorecer a exacerbação de eventos glico-oxidativos (BAKALA et al., 2012)

Bakala e colaboradores (2012) demonstraram que a incubação da enzima CAT por 48 horas na ausência de agentes promotores de glico-oxidação (metilglioxal ou frutose) foi suficiente para reduzir a atividade da enzima em 20%. A adição de metilglioxal não modificou a atividade da enzima, quando comparada com a atividade na ausência desta dicarbonila. Já a adição de frutose foi capaz de reduzir a atividade da CAT em 53%, em relação à enzima na ausência do monossacarídeo, no período de 5 horas. Em nosso estudo, a atividade da CAT (figura 13), no dia 0 e na condição soro + glicose, encontra-se elevada, quando comparada à amostra contendo somente soro, o que pode ser interpretado como uma possível interferência analítica devido a grande quantidade de glicose acrescida no soro. Aldeídos reagem com o reagente Purpald, formando um heterociclo bicíclico, quando oxidado altera a cor da solução de límpida para púrpura ou magenta, interferindo no sinal analítico (JOHANSSON E BORG, 1988).

A enzima antioxidante PON 1 encontra-se associada à lipoproteína HDL; que possui capacidade de proteger HDL, LDL e o endotélio vascular de agressões oxidativas e inflamatórias (CERVELLATI et al., 2019). Novamente, desde do dia 0 (figura 14) a atividade da PON 1 foi maior nas amostras de soro + glicose, em relação ao soro não acrescido de glicose.

Tal como esperado para todos os outros marcadores de estresse glico-oxidativo e atividades das enzimas antioxidantes que monitoramos no presente estudo, o resultado esperado era que todos os níveis de metabólitos e atividades de enzimas fossem semelhantes no dia 0 para todas as condições estudadas, uma vez que a amostra de soro sanguíneo ficou muito pouco tempo em contato com a glicose para que modificações glico-oxidativas ocorressem.

Tal como para TBARS e CAT, a análise da atividade de PON 1 parece não ser possível de ser monitorada neste sistema-modelo de glicação *in vitro*. Talvez seja necessário reduzir a concentração de glicose a ser acrescida no soro, ou então realizar a mudança do agente promotor da glico-oxidação, para que seja possível avaliar as atividades da PON 1 e da CAT.

## **5.2 Avaliação das alterações glico-oxidativas em sistema-modelo de glicação *in vitro* com metilglioxal (experimento 1)**

Nos sistemas-modelo *in vitro* de modificações glico-oxidativas com metilglioxal (MGO), por ser um composto dicarbonílico altamente reativo, o MGO pode reagir com diversas macromoléculas, dentre elas proteínas. Desta forma, o MGO pode interagir com resíduos de aminoácidos presentes na estrutura das proteínas, modificando a estrutura destas proteínas e promover a formação de diversos AGEs (TAGHAVI et al., 2017; OTT et al., 2014; LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010). Dentre os AGEs fluorescentes produzidos após a reação de resíduos de aminoácidos com MGO, o principal é a arg-pirimidina.

Nesta parte do estudo é possível observar o efeito da temporalidade da incubação, e também do efeito das diferentes concentrações de MGO (5, 10 e 20mM) no sistema-modelo *in vitro* de modificações glico-oxidativas utilizando soro sanguíneo humano, onde é possível notar que com o avançar do tempo de incubação houve aumento na intensidade de fluorescência que apresenta característica concentração e tempo dependente (figura 15). Tais achados podem ser corroborados por Sadowska-Bartosz e colaboradores (2014), onde os autores

realizaram a incubação de BSA com MGO em diferentes concentrações (2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM) e monitoraram a formação de AGEs fluorescentes por 24 horas, e observaram aumento na intensidade de fluorescência ao longo do tempo.

O emprego da aminoguanidina (AG), agente antiglicação protótipo que possui capacidade de sequestrar MGO (SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2020), demonstrou ser efetiva no sistema-modelo *in vitro* de modificações glico-oxidativas com MGO, nas diferentes concentrações de MGO (5, 10 e 20 mM), principalmente nas concentrações de 5 e 10 mM. Lucenford e Gugliucci (2005), e Wu e Yen (2005) demonstraram que AG (10 mM) foi capaz de diminuir a intensidade de fluorescência dos AGEs em sistema-modelo de glicação *in vitro* utilizando BSA e MGO em incubações conduzidas por 6 e 9 dias, respectivamente.

Trabalhos têm demonstrado a possibilidade de avaliar alterações na estrutura das proteínas promovidas pela glicação, através da separação das proteínas em gel de eletroforese (LUCENFORD; GUGLIUCCI, 2005; WU; YEN, 2005; DOS SANTOS et al., 2019; MOTTA et al., 2019). Neste estudo foi possível observar alterações no padrão de separação de proteínas em amostras de soro sanguíneo humano (Figura 16). Trabalhos desenvolvidos por Wu e Yen (2005) e Lucenford e Gugliucci (2005) também demonstraram alterações no perfil de separação eletroforética de proteínas em sistema-modelo de glicação *in vitro* com BSA e MGO em gel de eletroforese do tipo SDS-PAGE. Os autores observaram que o MGO é capaz de reagir com resíduos de lisina e arginina em proteínas, assim levando ao aumento no peso molecular e formação de *cross-links* proteicos, culminando em mudanças no perfil de separação eletroforética de BSA, sugerindo que o MGO promove alterações na estrutura proteica.

### **5.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos das alterações glico-oxidativas em sistema-modelo de glicação *in vitro* com metilglioxal na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub>, naringenina (experimento 2), e SbAcE (experimento 3).**

Nos sistemas-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro*, dicarbonilas reativas, como o metilglioxal, podem reagir com diversas macromoléculas, fazendo com que estas percam sua funcionalidade favorecendo assim o desenvolvimento das complicações diabéticas. Um dos biomarcadores bioquímicos, formado através de processo de glicação amplamente utilizado na avaliação clínica é a hemoglobina

glicada, biomarcador que reflete os níveis médios de glicemia nas 8-12 semanas precedentes (TAGHAVI et al., 2017; OTT et al., 2014; LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010).

Neste estudo foi possível visualizar a redução dos níveis de glicose (Tabela 1) nas amostras contendo somente soro com o decorrer do tempo das incubações. Uma explicação para esse achado é que a glicose presente no soro pode estar interagindo com proteínas e formar as bases de Schiff, produtos de Amadori e AGEs, participando assim de eventos glicativos, desta forma tendo seus níveis diminuídos com o decorrer do tempo (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2014). Amostras de soro incubadas na presença de MGO apresentaram aumento nos níveis de glicose; isto pode ser devido ao MGO, que, ao apresentar reatividade 20.000 vezes maior em relação a glicose (HAN et al., 2007), pode atacar mais efetivamente a matriz proteica presente no soro, o que poderá poupar a glicose de reagir com as proteínas.

Ainda neste estudo em relação aos biomarcadores bioquímicos, proteína total (Tabela 2 e 9A) e albumina (Tabela 3 e 9B), foi possível observar que a presença de MGO nas incubações não modificou os níveis dos biomarcadores, mantendo-os dentro dos valores de referência utilizados na prática clínica (proteínas totais: 6 a 8 g/dL; albumina: 3,5 a 5,5 g/dL).

Em relação a atividade enzimática de ALT (Tabela 4 e 10), foi possível observar que a adição de MGO nas amostras de soro sanguíneo humano foi capaz de reduzir a atividade de ALT, desde o tempo 0. Tal diminuição pode ter ocorrido devido a alta reatividade do MGO, que pode estar interagindo com esta enzima, inibindo sua atividade. Corroborando com os nossos achados, Beránek e colaboradores (2001) realizaram a incubação de ALT com diferentes tipos de açúcares redutores (D-glicose, D-ribose, D-frutose e D-L-gliceraldeído) e observaram que estes açúcares redutores são capazes de inibir a atividade enzimática da ALT significativamente, desde o tempo de 2 horas (D-ribose e D-L-gliceraldeído).

Quando avaliado o perfil lipídico das amostras de soro sanguíneo incubadas na presença de MGO, foi possível notar que os valores obtidos para os parâmetros triglicerídeos (Tabela 5 e 11A) e colesterol total (Tabela 6 e 11B) se mantiveram dentro dos valores de referência (triglicerídeos < 150 mg/dL; colesterol total < 190 mg/dL).

Os valores de HDL-colesterol apresentados na tabela 7 e 11C indicam que a incubação pode promover aumento nos níveis de HDL-colesterol, após 12 horas. Heins e colaboradores (1995) relataram que pode haver um aumento significativo nos níveis de HDL-colesterol quando amostras de soro sanguíneo humano são armazenadas em temperatura ambiente (25°C) por até 7 dias.

Quando da adição de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e NAR em amostras de soro + MGO em relação aos níveis de glicose (tabela 1), parecem ter promovido alguma interferência na metodologia de análise desse analito por parte de substâncias geradas no meio de incubação quando compostos presentes em SbExt, SbCHCl<sub>3</sub>, e a própria NAR entram em contato com o MGO. A interferência observada nas concentrações de glicose nas amostras de soro contendo SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e NAR somente foram observadas quando na presença de MGO. Após 48 horas de incubação, amostras de soro + MGO + SbExt (500 e 250 µg/mL) apresentaram concentrações de glicose inferiores a 10 mg/dL, o que respalda a possibilidade de interferência analítica, principalmente para SbExt.

Neste estudo foi possível observar que a adição de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e NAR, bem como SbAcE, não promoveram alterações nos níveis dos biomarcadores bioquímicos em relação aos valores de referência utilizados na avaliação clínica.

Ainda neste estudo, em específico no experimento 2, é possível observar que para os parâmetros de proteínas totais (tabela 2), albumina (tabela 3), triglicerídeos (tabela 5) e colesterol (tabela 6), após 48 horas de incubação é possível notar um aumento nos níveis destes biomarcadores. Este aumento nas concentrações destes biomarcadores após 48 horas pode estar relacionado ao processo de incubação, uma vez que as amostras foram incubadas a 37°C pelo período de 48 horas, o que pode ter contribuído para evaporação de água das amostras, culminando em discreta concentração dos marcadores (VETRI et al., 2007).

#### **5.4 Estimativa dos AGEs fluorescentes e análise de modificações estruturais em proteínas em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* com metilglioxal na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub>, naringenina (experimento 2), e SbAcE (experimento 3).**

A adição de MGO em sistema-modelo de modificação glico-oxidativa *in vitro*, permite avaliar o processo de glicação em estágio mais avançado, quando as dicarbonilas reativas podem promover alterações em resíduos de proteínas de

diversas macromoléculas, e então formar diversos AGEs, sendo a arg-pirimidina o principal AGE fluorescente formado (TAGHAVI et al., 2017; OTT et al., 2014; RABBANI; THORNALLEY, 2015; RABBANI; THORNALLEY, 2012).

A formação de AGEs (figuras 17 e 27) antes do início das incubações em amostras soro+ MGO pode ser devido a alta reatividade do MGO. Em um trabalho que realizou incubação de BSA com MGO em diferentes concentrações, incluindo 10 mM, demonstrou que, desde o tempo 0, foi possível observar uma maior intensidade de fluorescência de AGEs, em relação à amostra contendo somente BSA, e com o avançar do tempo de incubação (24 horas) foi possível observar aumento progressivo na formação de AGEs fluorescentes (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2014)

O emprego de SbExt e SbAcE (respectivamente, figuras 17A e 27) em amostras soro+MGO, demonstraram serem capazes de inibir os efeitos glicoxidativos do MGO no soro sanguíneo humano. Este possível potencial anti-AGE de SbExt e SbAcE pode ser devido a presença de diversos compostos presentes em SbExt e SbAcE, como flavonoides, saponinas, derivados fenólicos, dentre outros (DOS SANTOS et al., 2019). Os dados obtidos neste estudo corroboram com dos Santos e colaboradores (2019), no qual foram realizadas incubações de BSA com glicose na presença de SbExt e SbACE, e foi possível observar inibição na formação de AGEs fluorescentes de maneira concentração-dependente, nos dias 10, 20 e 30 de incubação.

A adição de SbCHCl<sub>3</sub> (figura 17B) em amostras de soro + MGO foi capaz de diminuir a formação de AGEs fluorescentes de forma discreta. Este resultado diferem dos achados do estudo de dos Santos e colaboradores (2019), onde SbCHCl<sub>3</sub> se mostrou com atividade anti-AGE significativa, o que pode ser explicado pelas diferenças nos sistemas-modelo de glicação *in vitro* utilizados.

Dos Santos e colaboradores (2019) identificaram algumas substâncias em SbCHCl<sub>3</sub>, dentre elas a naringenina, um flavonóide tipo flavonona que apresenta atividade antioxidante e capacidade de realizar captura de MGO (LIU et al., 2020; ZHU et al., 2019). A adição de NAR (figura 17C) em amostra de soro + MGO foi capaz de inibir a formação de AGEs fluorescentes. Estes dados corroboram com Liu e colaboradores (2020), onde os autores demonstraram que a naringenina foi capaz de diminuir a formação de AGEs fluorescentes em amostras de BSA incubadas com MGO. Porém, o espectro de absorbância da amostra soro + NAR 100 µM, desde o

tempo 0 até 6 horas, no comprimento de onda 350 nm (isto é, comprimento de onda de excitação dos AGEs), nos mostra que soro + NAR 100  $\mu$ M apresenta valor de absorbância superior ao observado em soro + MGO, o mesmo se repete para as maiores concentrações de naringenina (400 e 200  $\mu$ M). Este achado nos faz sugerir que nas incubações de soro + NAR, possa estar acontecendo uma diminuição na excitação dos AGEs fluorescentes, consequentemente impedindo que os AGEs fluorescentes formados emitam fluorescência (440 nm), o que pode implicar em um resultado falsamente positivo relacionado à capacidade de NAR promover inibição na formação de AGEs. Para as maiores concentrações de naringenina, em soro + NAR 200 $\mu$ M esta característica ocorre até o tempo 24 horas, em soro + NAR 400  $\mu$ M esta característica se estende até as 48 horas (ver anexos – espectro de absorbância NAR).

### **5.5 Estimativa dos produtos de oxidação de resíduos de triptofano e tirosina em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* com metilglioxal na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub>, naringenina (experimento 2), e SbAcE (experimento 3).**

Nos sistemas-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* com metilglioxal, a glicação de macromoléculas é favorecida, porém processos oxidativos também podem ocorrer, incluindo a oxidação de resíduos de aminoácidos em proteínas, tais como lisina, triptofano, cisteína e metionina, os quais são mais susceptíveis a oxidação (LUNA; ESTÉVES, 2018).

Nas figuras 18, 19 e 20 (experimento 2) e 28, 29 e 30 (experimento 3) o sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* (soro + MGO) apresenta maior intensidade de fluorescência relativa aos produtos de oxidação de triptofano e tirosina, em relação às amostras de soro, durante todo o período experimental, demonstrando que o MGO é capaz de exacerbar a formação de N'-formilquinurenina e quinurenina (produtos de oxidação de triptofano) e ditirosina (produto de oxidação de tirosina). Estudo de Sadowska-Bartosz e colaboradores (2014) corrobora com os achados deste trabalho, pois observaram que o MGO, em diferentes concentrações (2,5, 5, 10, 50 e 100 mM) em incubações contendo BSA, foi capaz de promover aumento na intensidade de fluorescência de N'-formilquinurenina, quinurenina e ditirosina, no período de 24 horas.

SbExt (figura 18A, 19A e 20A) e SbAcE (figura 28, 29 e 30), nas diferentes concentrações estudadas no sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro*, demonstrou ser capaz de diminuir discretamente a intensidade de fluorescência de N'-formilquinurenina, quinurenina e ditirosina, assim apresentando efeito protetor na oxidação de triptofano (figura 18A – N'-formilquinurenina, figura 19A – quinurenina) e na oxidação de tirosina (figura 20A – ditirosina), isso pode ter ocorrido devido a presença de flavonóides, compostos fenólicos, saponinas, ou outros compostos com propriedades anti-oxidantes presentes em SbExt ou SbAcE (DOS SANTOS et al., 2019). Dos Santos e colaboradores (2019) demonstraram que SbExt e SbAcE, em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* de BSA com glicose, foram capazes de diminuir a formação de produtos de oxidação de triptofano e tirosina.

SbCHCl<sub>3</sub> (250, 125 e 62,5 µg/mL) no sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro*, não foi capaz de inibir a formação de produtos de oxidação de triptofano (figura 18B – N'-formilquinurenina, figura 19B – quinurenina) e de oxidação de tirosina (figura 20B – ditirosina). Estes resultados diferem dos achados de dos Santos e colaboradores (2019), onde os autores observaram efeito inibitório da fração clorofórmica de *Siolmatra brasiliensis* na formação de N'-formilquinurenina, quinurenina e ditirosina em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* de BSA com glicose após 30 dias de incubação. Esta divergência de resultados pode ter ocorrido devido às diferenças entre os sistemas-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro*. No sistema-modelo com glicose, é possível observar o efeito anti-AGE de substâncias/compostos na fase inicial da glicação proteica, onde açúcares redutores interagem com resíduos de aminoácidos livres, levando a produção das bases de Schiff e produtos de Amadori. No sistema-modelo com MGO, é possível observar a ação anti-AGE de substâncias/compostos na fase intermediária da glicação proteica, onde compostos dicarbonílicos promovem a formação dos AGEs (KHAN et al., 2020).

A formação de N'-formilquinurenina, quinurenina e ditirosina no sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* na presença de NAR apresentou-se menor, em relação ao sistema-modelo sem o flavonóide. A naringenina possui atividade antioxidante (ANNADURAI et al., 2012), o que pode contribuir para a inibição dos processos de oxidação desses resíduos de aminoácidos, diminuindo a formação dos produtos de oxidação de triptofano (N'-formilquinurenina, quinurenina)

e tirosina (ditirosina). Por outro lado, ao analisar os espectros de absorção de naringenina (ver anexos – espectro de absorbância NAR), é possível observar que, em amostras soro + NAR 100  $\mu$ M, desde o tempo 0 até 12 horas de incubação, é possível observar que os valores de absorbância desta amostra nos comprimentos de onda de excitação de N'-formilquinurenina e ditirosina (325 e 330 nm, respectivamente) se apresentam superiores, quando comparados aos valores de absorbância da amostra soro + MGO. O mesmo ocorre para o comprimento de onda de excitação de quinurenina (360 nm), desde o tempo 0 até 6 horas. Assim, uma vez que os valores de absorbância são elevados nos comprimentos de onda de excitação dos produtos de oxidação dos resíduos de aminoácidos nas amostras contendo NAR, pode estar ocorrendo menor excitação de N'-formilquinurenina, quinurenina e ditirosina, e conseqüentemente menor emissão é detectada para essas moléculas, o que pode então nos indicar que NAR esteja interferindo na metodologia analítica destes produtos de oxidação.

### **5.6 Determinação dos níveis de PCO em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* com metilglioxal na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub>, naringenina (experimento 2), e SbAcE (experimento 3).**

Os níveis de PCO podem ser monitorados com a finalidade de avaliar o grau das modificações glico-oxidativas que estão sendo promovidas em proteínas. O MGO foi capaz de aumentar significativamente os níveis de PCO nas incubações com soro sanguíneo humano. Meeprom e colaboradores (2015), incubaram BSA com MGO por 2 semanas e demonstraram aumento nos níveis de PCO. Em outro estudo, Arguirova e Breiphol (2002) incubaram proteínas de lente de bezerro na presença de MGO, e após 2 semanas observaram aumento considerável nos níveis de PCO.

Neste estudo foi possível observar que as preparações de *Siolmatra brasiliensis* SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e SbAcE, em todas as concentrações estudadas, apresentaram capacidade em diminuir os níveis de PCO neste sistema modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro*, o que pode ser devido a presença de uma diversidade de compostos, dentre eles diferentes flavonóides, presentes em SbExt, SbCHCl<sub>3</sub> e SbAcE, conforme descrito por dos Santos e colaboradores (2019). Rai e colaboradores (2019) demonstraram que flavonóides presentes na folha da *Polyalthia longifolia* foram capazes de diminuir os níveis de PCO em amostras de

BSA incubadas na presença de frutose por 15 dias. Entretanto, as menores concentrações de SbExt e SbCHCl<sub>3</sub> mostraram ser mais efetivas em relação as maiores concentrações, o que pode ser devido a grande diversidade de compostos presentes em SbExt e SbCHCl<sub>3</sub>, e dentre estes compostos pode haver substâncias pró-oxidantes.

A adição de naringenina nas incubações de soro + MGO contribuiu para diminuir os níveis de PCO. Khan e colaboradores (2020) realizaram a incubação de BSA com MGO na presença de naringenina por 24 horas, e observaram que a naringenina foi capaz de diminuir a geração de PCO, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo (figura 21).

### **5.7 Determinação de modificações estruturais em proteínas em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* com metilglioxal na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub>, naringenina (experimento 2), e SbAcE (experimento 3).**

A separação das proteínas em gel de eletroforese tem sido utilizada para avaliar possíveis alterações na estrutura de proteínas promovidas pelo estresse glico-oxidativo (LUCENFORD; GUGLIUCCI, 2005; WU; YEN, 2005; DOS SANTOS et al., 2019; MOTTA et al., 2019).

Nas figuras 22, 23 e 24, é possível observar discreta alteração no padrão de separação de proteínas em amostras de soro + MGO, antes do início das incubações em relação às amostras contendo somente soro. Isso se deve a alta reatividade do MGO (TAGHAVI et al., 2017). Trabalhos anteriores utilizando o sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* utilizando BSA incubada com MGO demonstraram resultados semelhantes, nos quais ocorre alteração no perfil de separação eletroforética de BSA, com aparecimento de “dispersão” da banda de BSA, o que indica a formação de *cross-linking* proteico, consequentemente alteração da estrutura proteica da BSA (WU; YEN, 2005; LUCENFORD; GUGLIUCCI, 2005).

A presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub>, NAR e SbAcE em suas diferentes concentrações, nas amostras de soro + MGO, não alterou o perfil da separação de proteínas em gel, quando comparados à amostra contendo soro + MGO, sugerindo ausência de efeito protetor dessas preparações nas alterações estruturais monitoradas via eletroforese. Wu e Yen (2005) incubaram BSA com MGO na presença de naringenina por 9 dias, e realizaram separação eletroforética de

proteínas sob condições desnaturantes, e observaram discreto efeito inibitório da naringenina sobre as modificações da estrutura de BSA. Este resultado contradiz os nossos achados, mas essas alterações podem ser explicadas pelas diferenças entre as matrizes utilizadas nas incubações para condução dos sistemas-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro*. Uma vez que, o soro sanguíneo humano é uma matriz complexa, a qual é composta por cerca de 60% albumina, porém outras proteínas de mesmo peso molecular e cargas semelhantes, o que pode contribuir para explicar os resultados que diferiram de Wu e Yen (2005).

### **5.8 Determinação atividade enzimática de PON 1 (arilesterase e lactonase) em sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* com metilglioal na presença de SbExt, SbCHCl<sub>3</sub>, naringenina (experimento 2), e SbAcE (experimento 3).**

A PON 1 é uma enzima associada predominantemente a HDL-colesterol, e capaz de impedir a oxidação de LDL, que pode favorecer ao desenvolvimento de aterosclerose, demonstrando ser um importante biomarcador no contexto cardiovascular (MACKNESS; MACKNESS, 2015). A PON 1 possui diversas atividades fisiológicas, dentre elas a atividade arilesterase e lactonase. A diminuição da atividade arilesterase da PON 1 pode estar relacionado ao desenvolvimento de danos oxidativos e peroxidação lipídica (CERVELLATI et al., 2015). A atividade lactonase da PON 1 promove a hidrólise das lactonas, as quais são os substratos naturais da PON 1, esta atividade enzimática é capaz de promover a hidrólise de uma diversidade de fármacos, dentre eles podemos destacar as estatinas (MACKNESS; MACKNESS, 2015).

No experimento 2, foi possível observar que após 12 horas que todas as amostras incubadas apresentaram redução da atividade enzimática arilesterase da PON 1, e não houve alteração na atividade enzimática lactonase da PON 1, este resultado difere do observado no estudo realizado por Gugliucci (2014), no qual utilizou realizou a incubação de soro sanguíneo humano a 37°C por 48 horas e observou aumento da atividade arilesterase e lactonase da PON 1 até 24 horas de incubação em relação ao tempo inicial, e que corrobora com os resultados obtidos no experimento 3. A diferença obtida no experimento 2 em relação ao obtido por Gugliucci (2014), pode ser devido a PON 1 possuir polimorfismo, o qual é capaz de promover alterações na atividade enzimática, pois específicos polimorfismos

demonstram preferência por determinados substratos (MACKNESS; MACKNESS, 2015).

Após 48 horas de incubação, no experimento 2, houve aumento das atividades enzimáticas arilesterase e lactonase da PON 1 em relação ao tempo 12 horas, o que pode ser resultado do processo de incubação, no qual há perda de água, conseqüentemente há aumento da concentração de enzimas presentes nas amostras, favorecendo ao aumento da atividade enzimática (VETRI et al., 2007). Já no experimento 3, as atividades arilesterase e lactonase da PON 1 apresentaram-se menores em relação ao tempo inicial da incubação, isso pode estar relacionado ao aumento de PON 1 livre que favorece a uma menor atividade enzimática, por exemplo: indivíduos diabéticos apresentam aumento de PON 1 livre e conseqüente menor atividade enzimática, além disso, o polimorfismo da PON 1 pode alterar a sua atividade enzimática (GUGLIUCCI; MENINI, 2015).

## 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  $\text{SbCHCl}_3$  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,  $\text{SbCHCl}_3$  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 undelying 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 glycatative stress and restores sRAGE levels in diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 406-417, 2016.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 9ª 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.; ALTWAIJRY, 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 advance 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 glycoxidation 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 glycoxidation 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/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 glycoxidation 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.

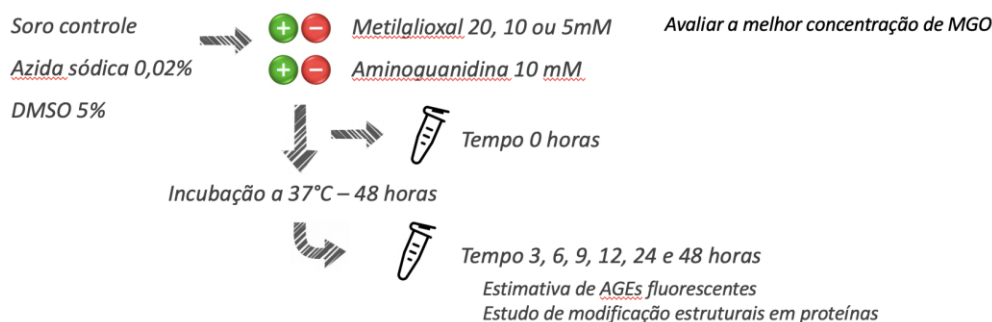
## Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com glicose

### Sistema-modelo de modificação glico-oxidativas *in vitro*

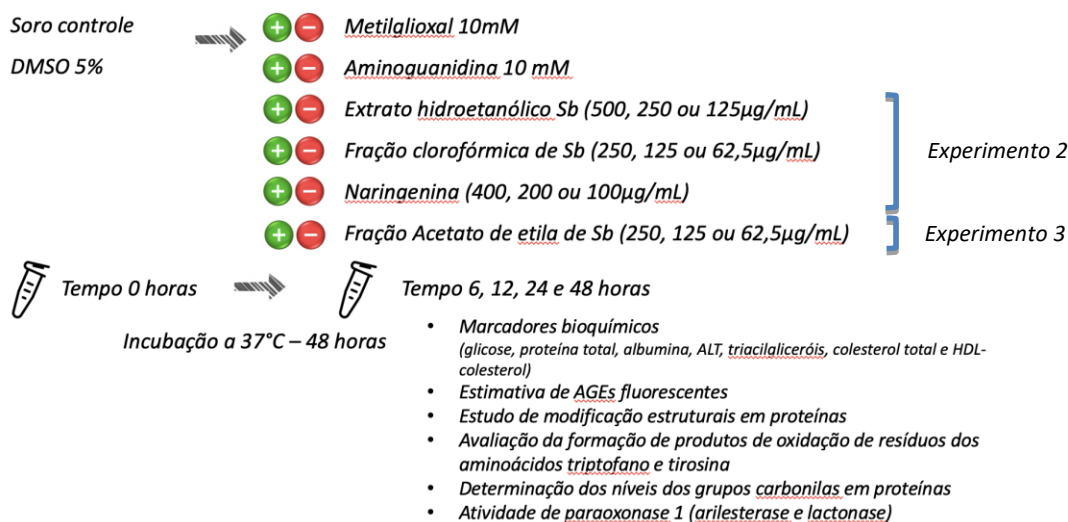


## Sistema-modelo de modificações glico-oxidativas *in vitro* em soro sanguíneo humano incubado com metilglioxal

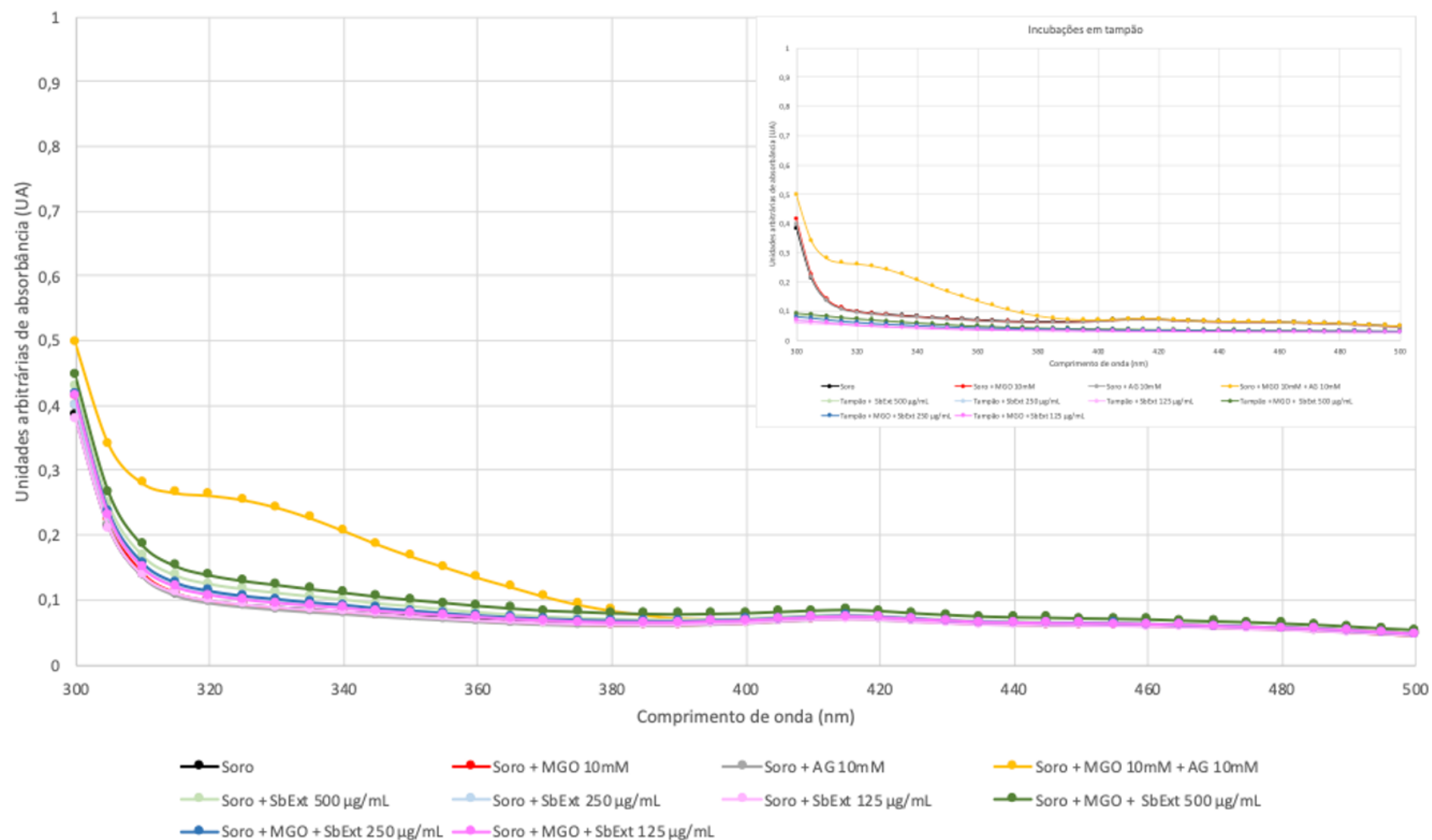
### Sistema-modelo de modificação glico-oxidativas *in vitro*



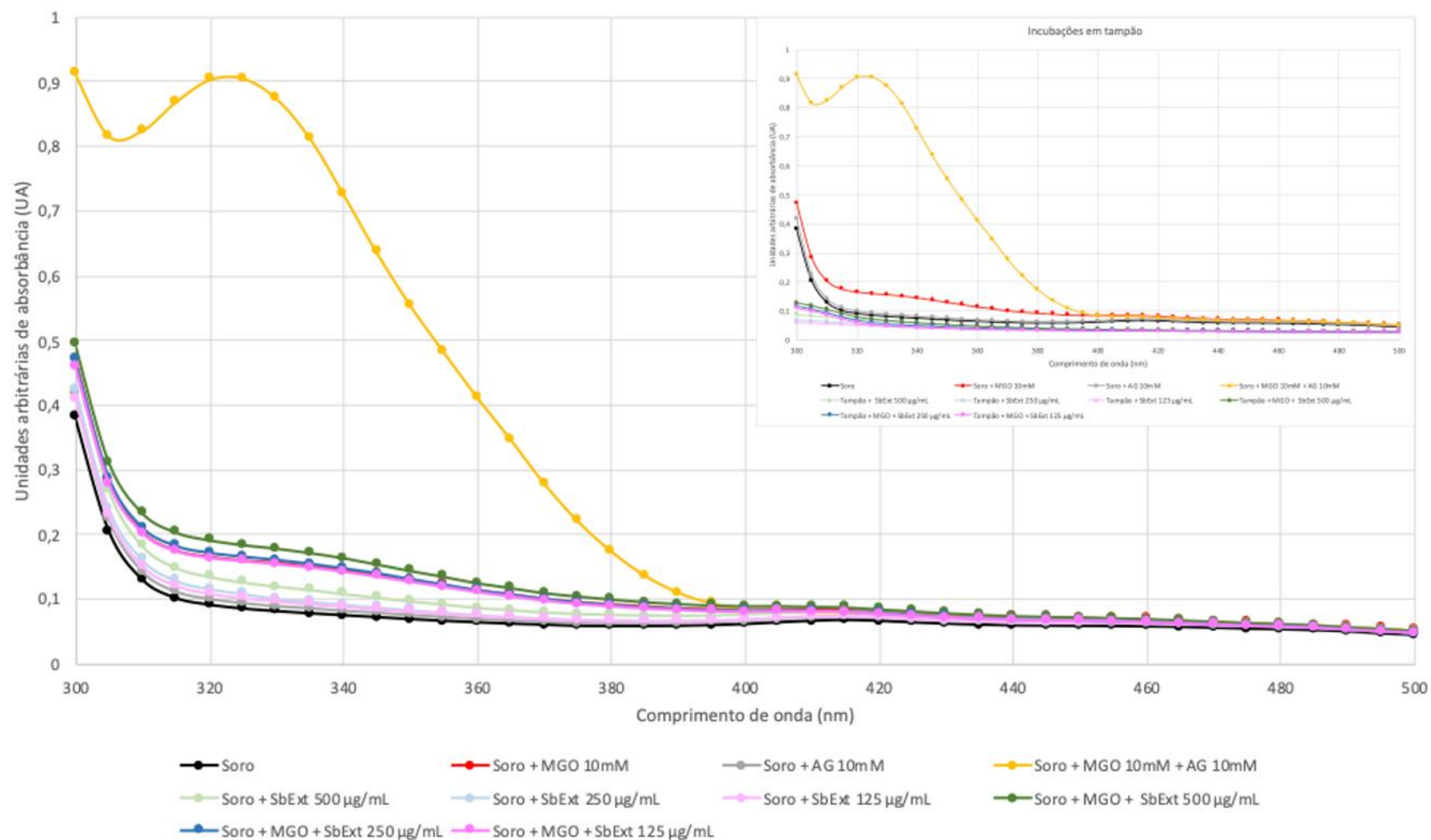
### Sistema-modelo de modificação glico-oxidativas *in vitro*



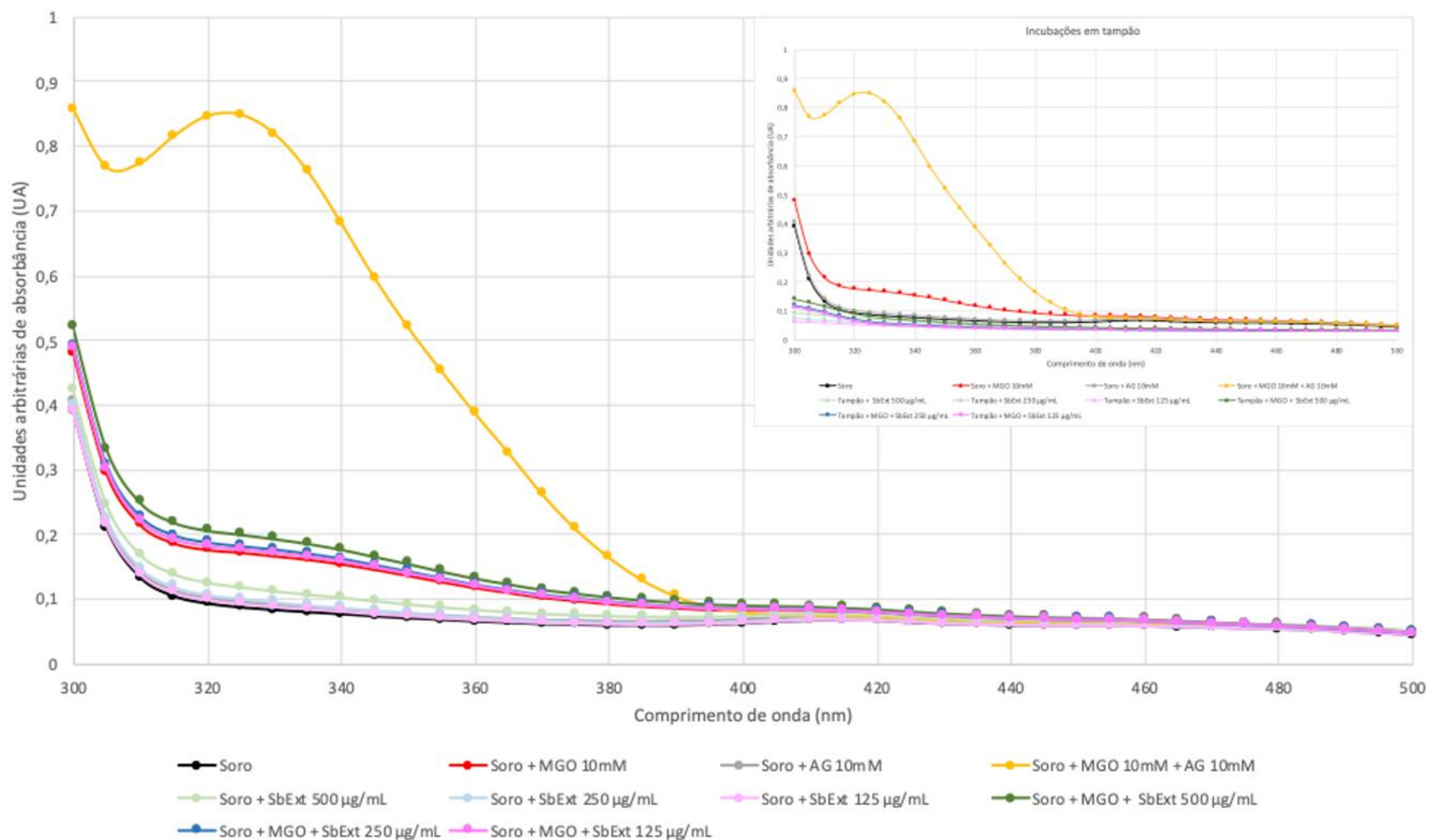
### Espectro de absorvância de incubações na presença de SbExt - 0 Horas



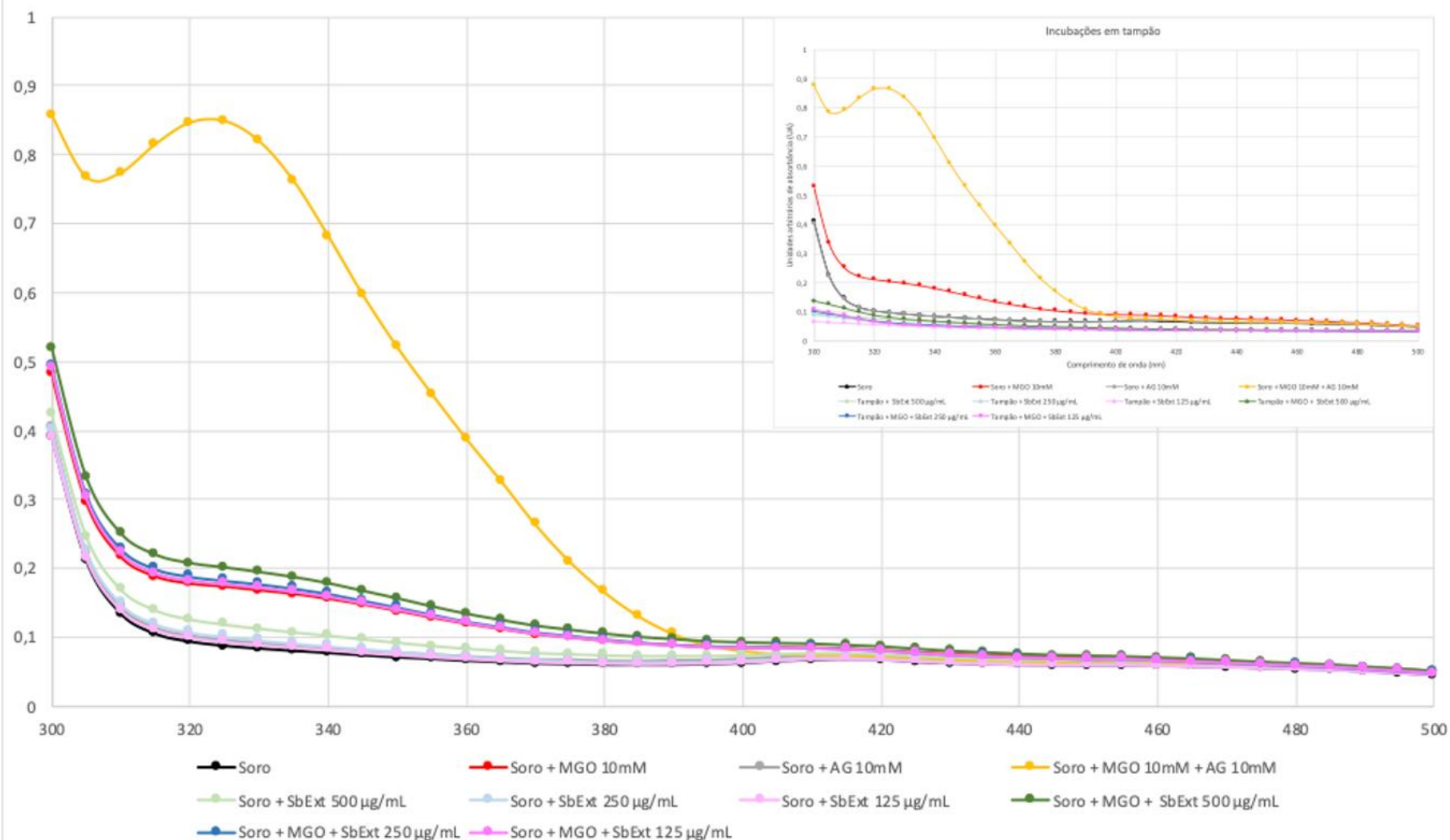
Espectro de absorvância de incubações na presença de SbExt - 6 Horas



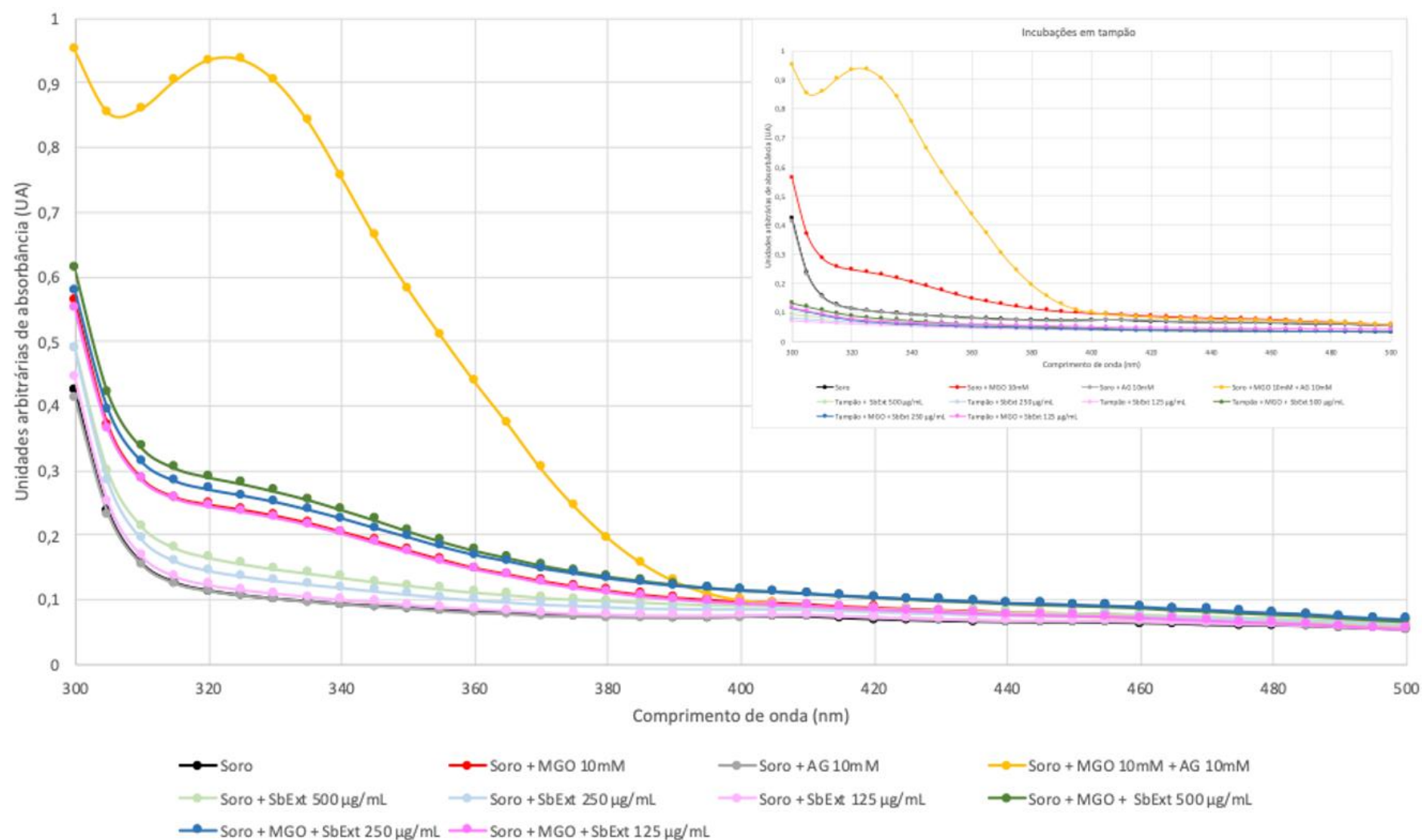
Espectro de absorvância de incubações na presença de SbExt - 12 Horas



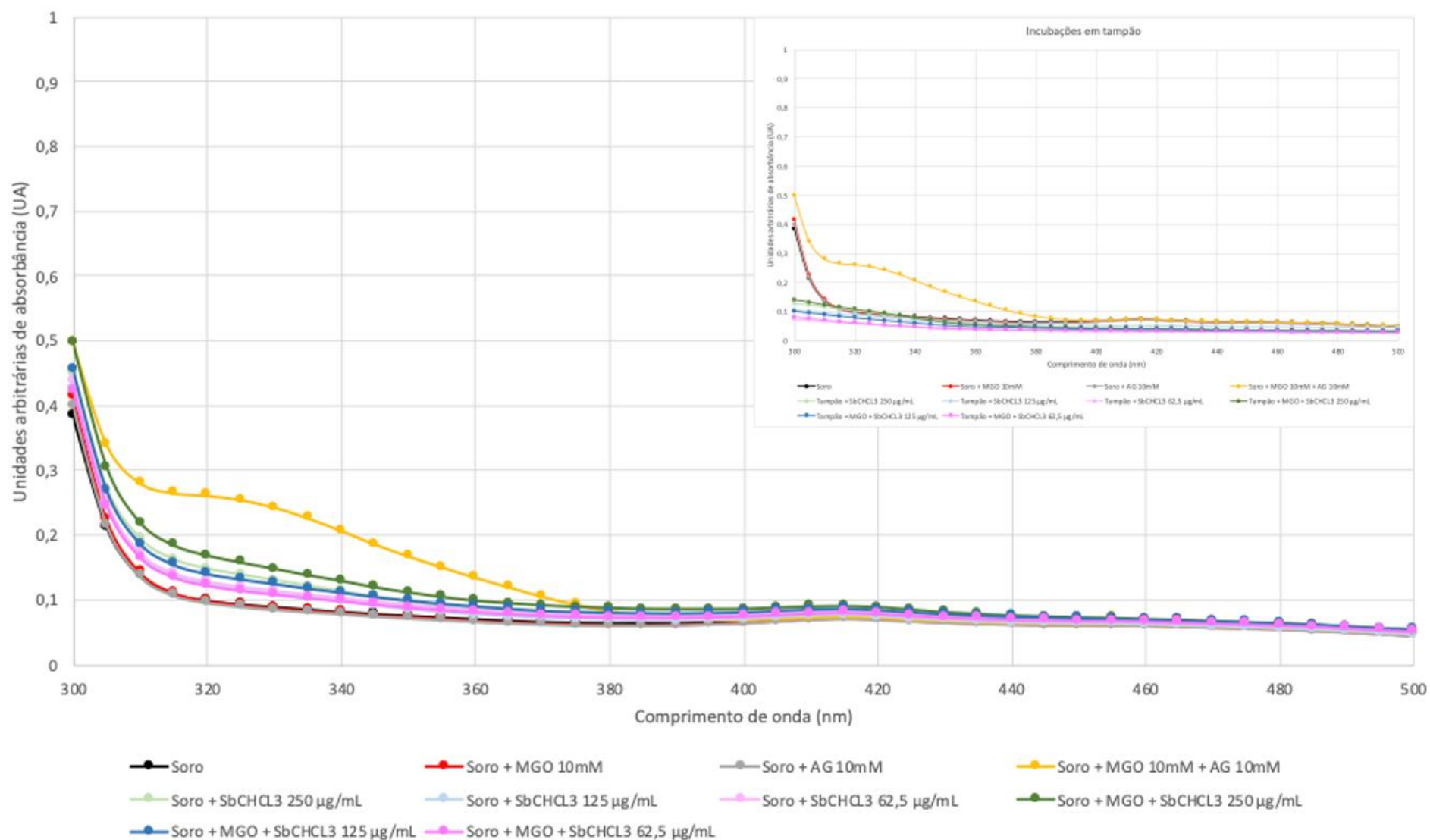
Espectro de absorvância de incubações na presença de SbExt - 24 Horas



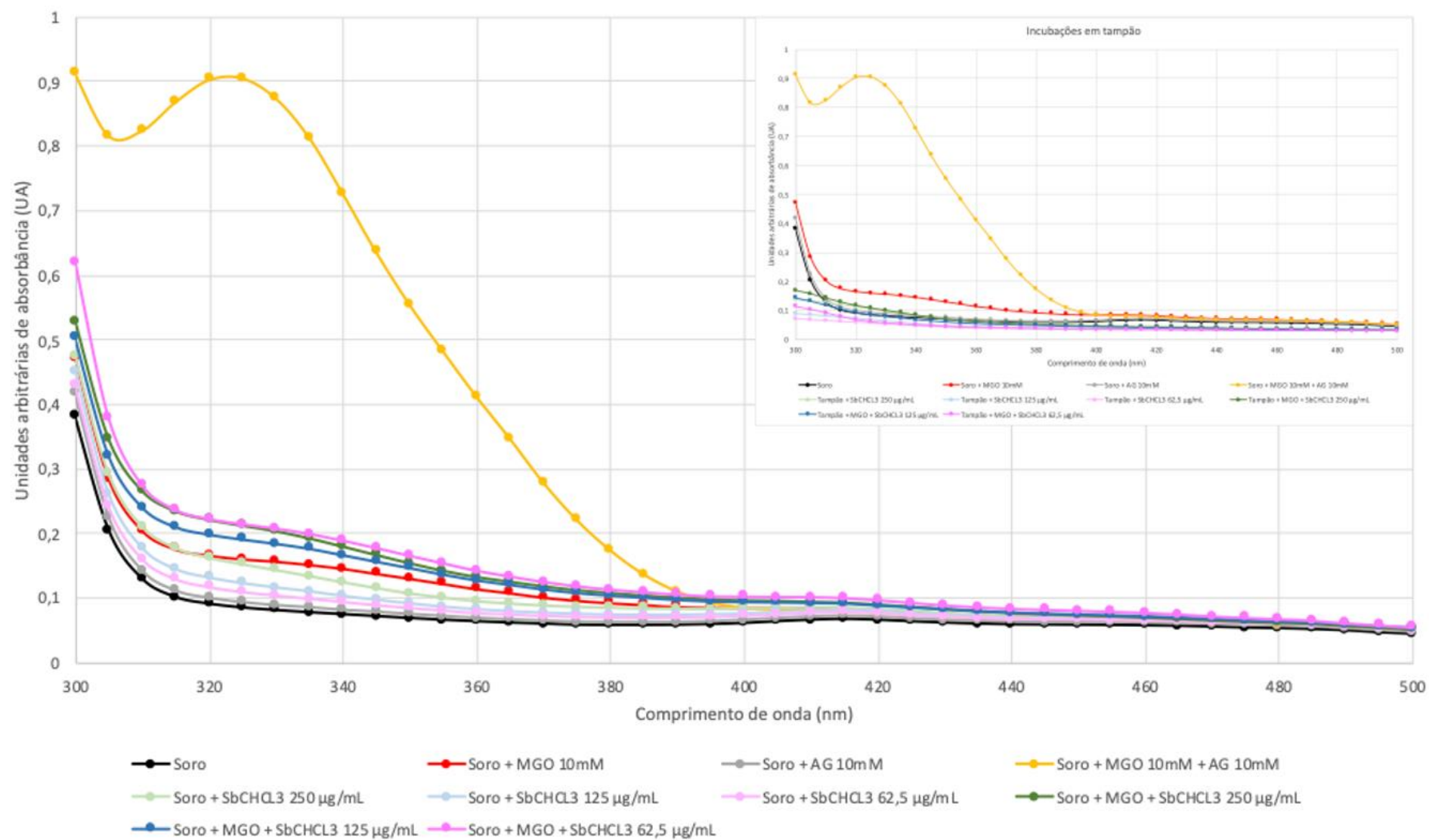
### Espectro de absorvância de incubações na presença de SbExt - 48 Horas



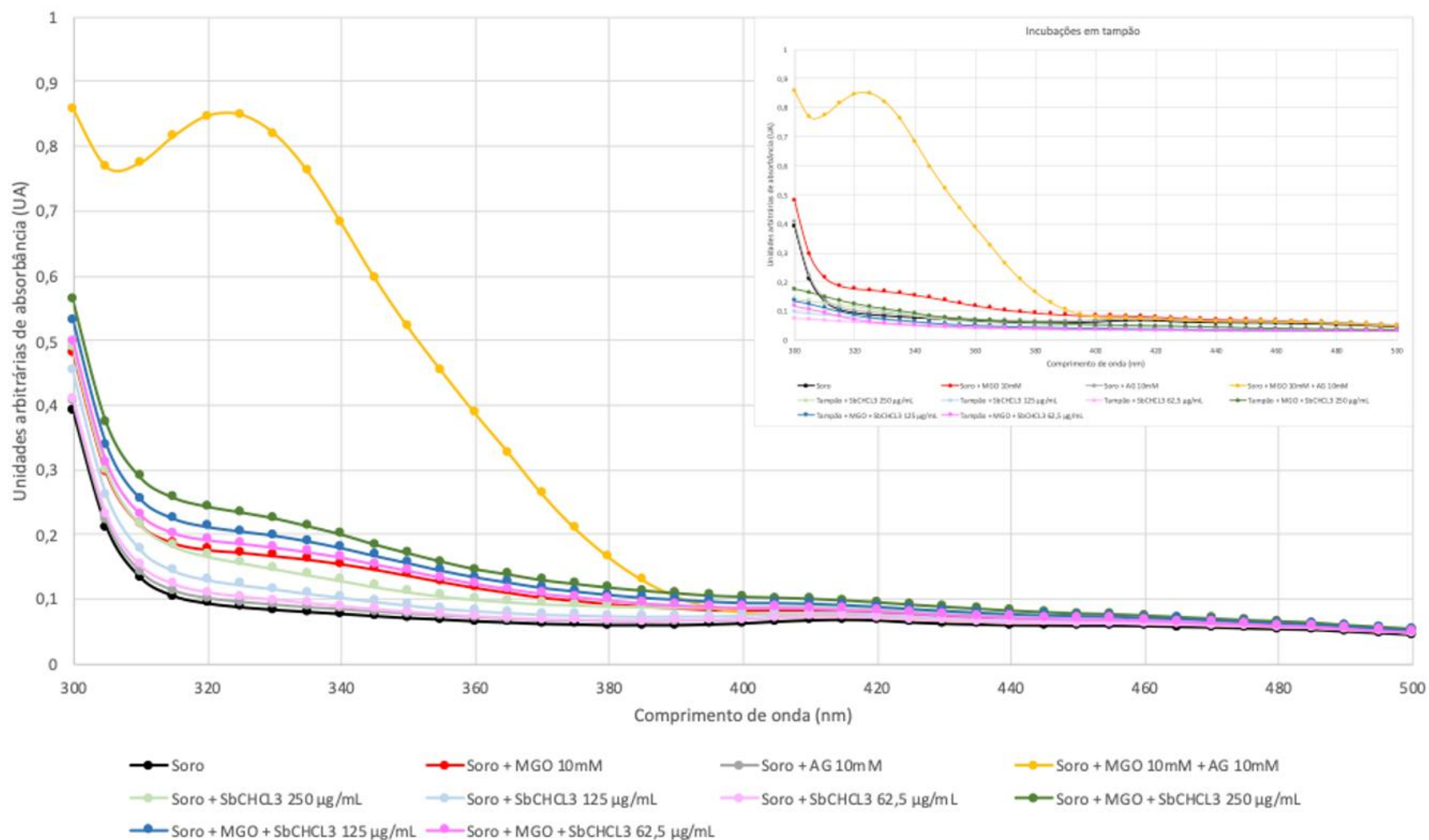
### Espectro de absorvância de incubações na presença de $\text{SbCHCl}_3$ - 0 Horas



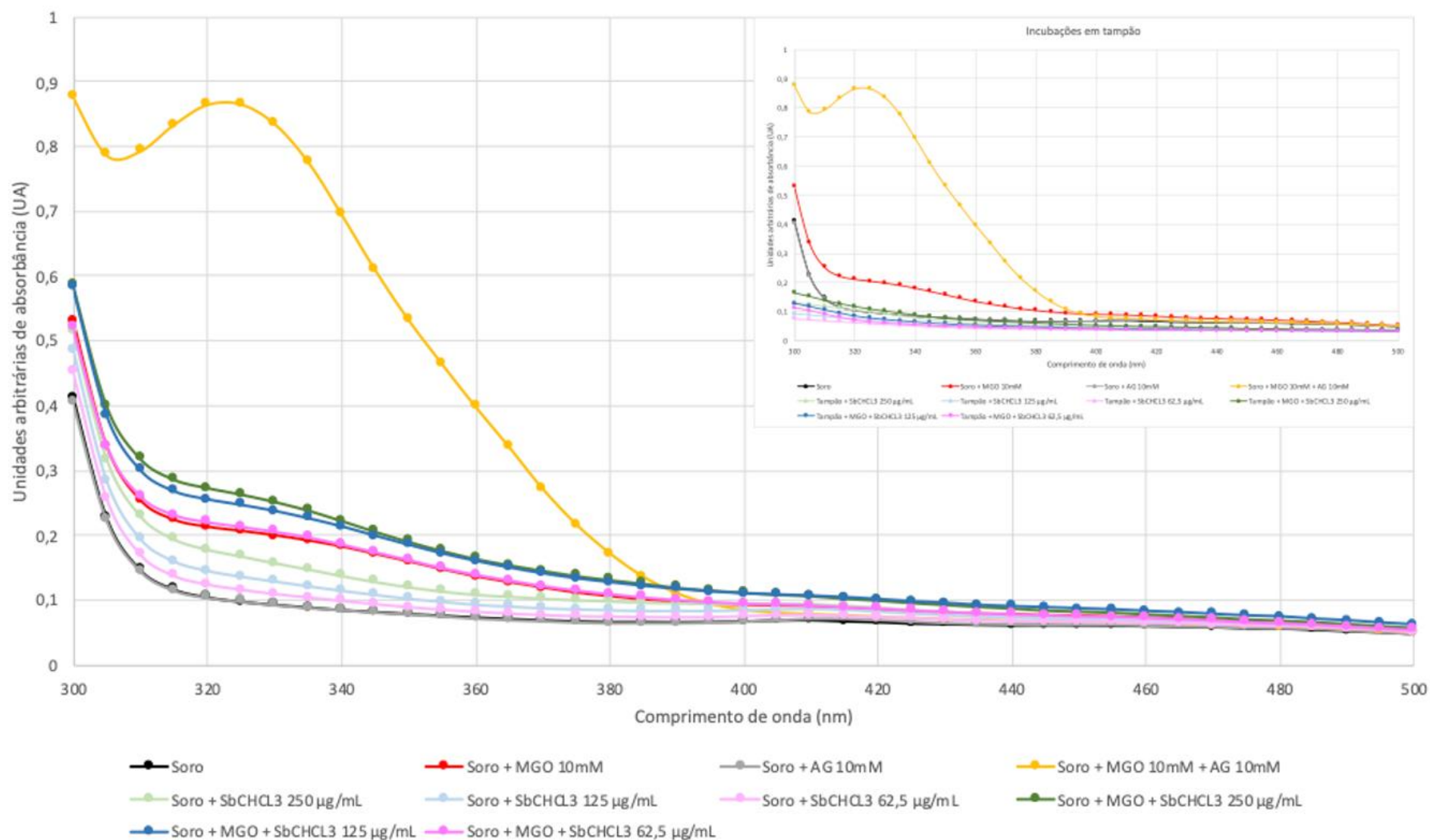
### Espectro de absorvância de incubações na presença de $\text{SbCHCl}_3$ - 6 Horas



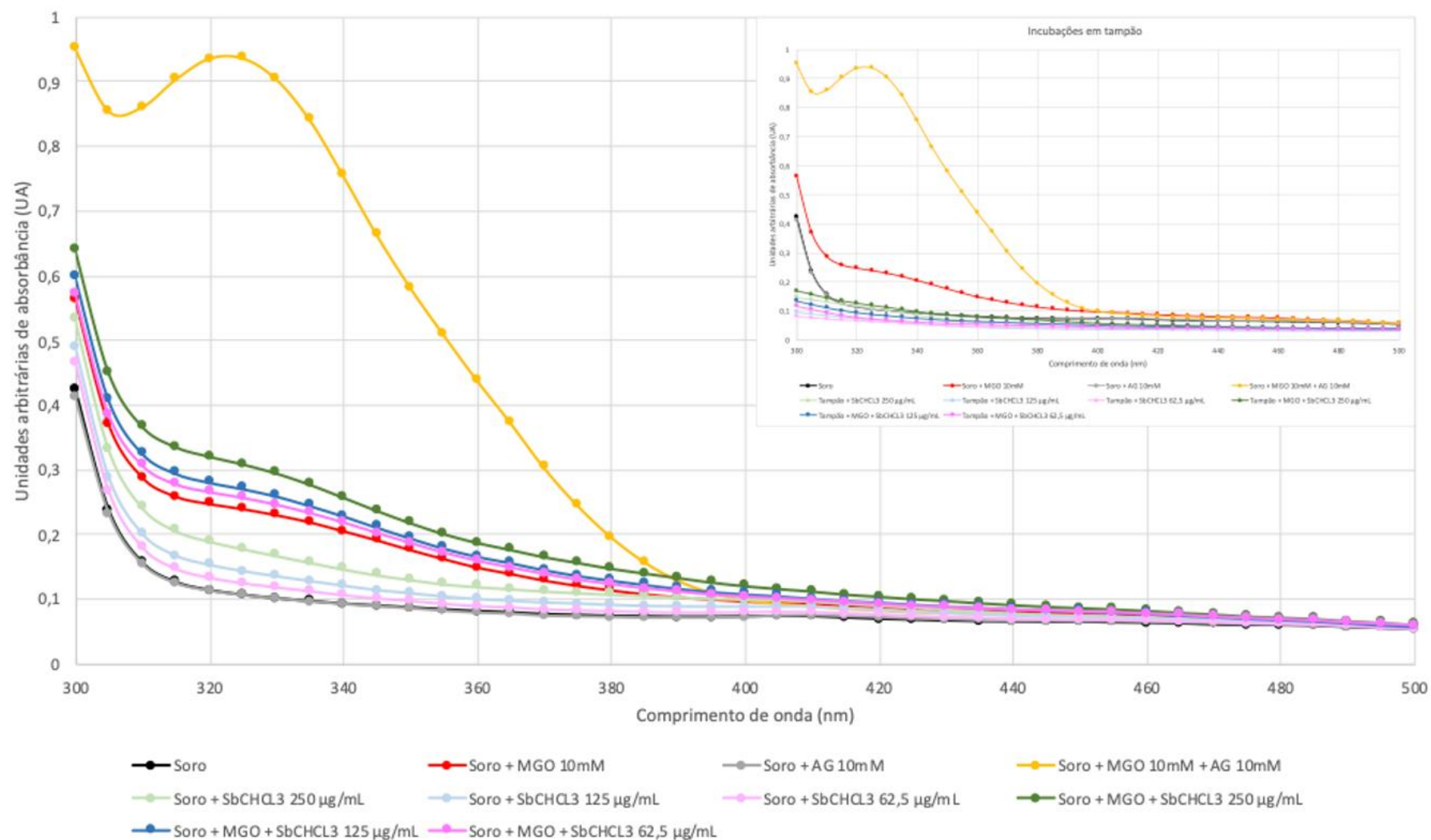
### Espectro de absorvância de incubações na presença de $\text{SbCHCl}_3$ - 12 Horas



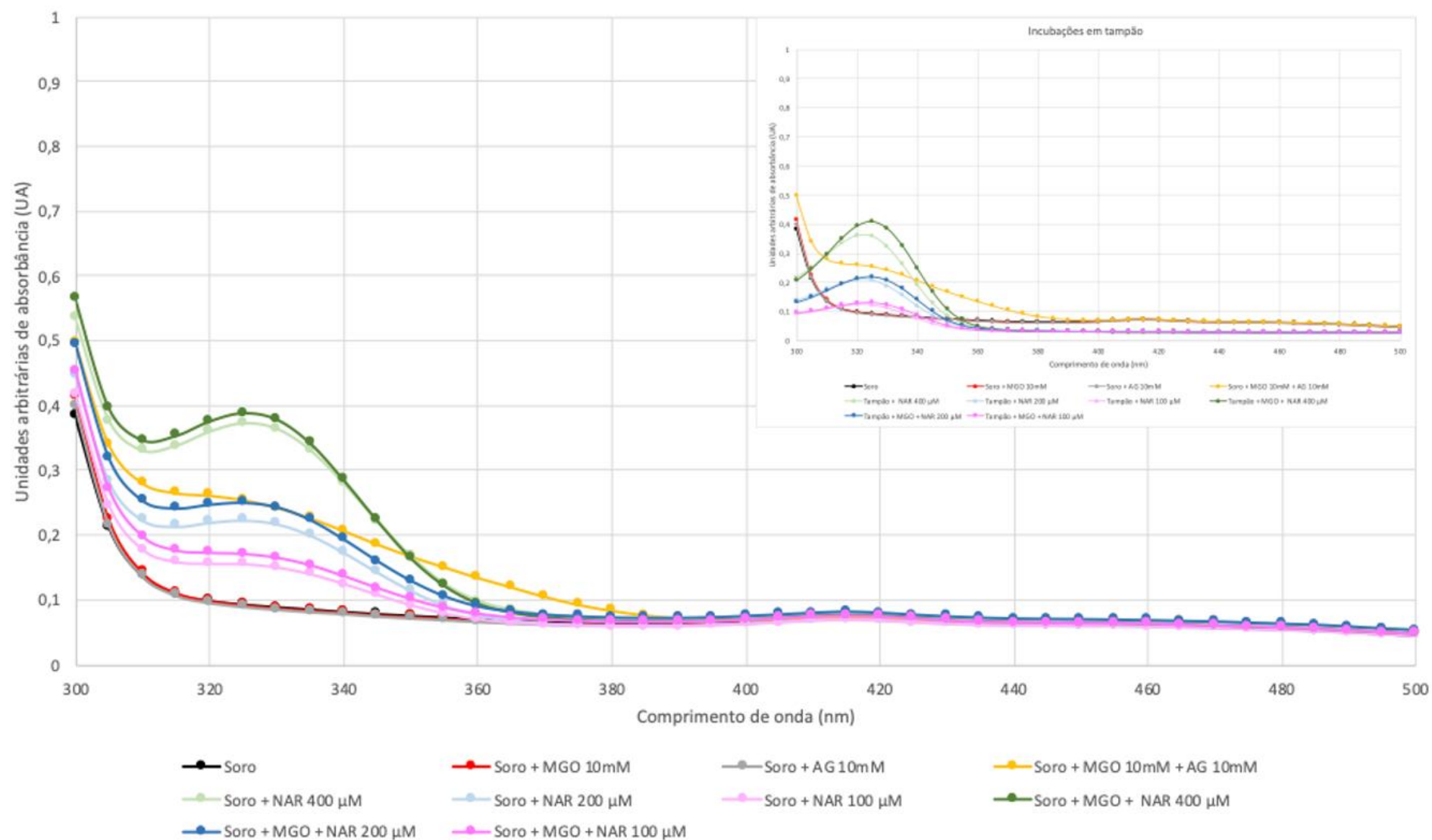
### Espectro de absorvância de incubações na presença de $\text{SbCHCl}_3$ - 24 Horas



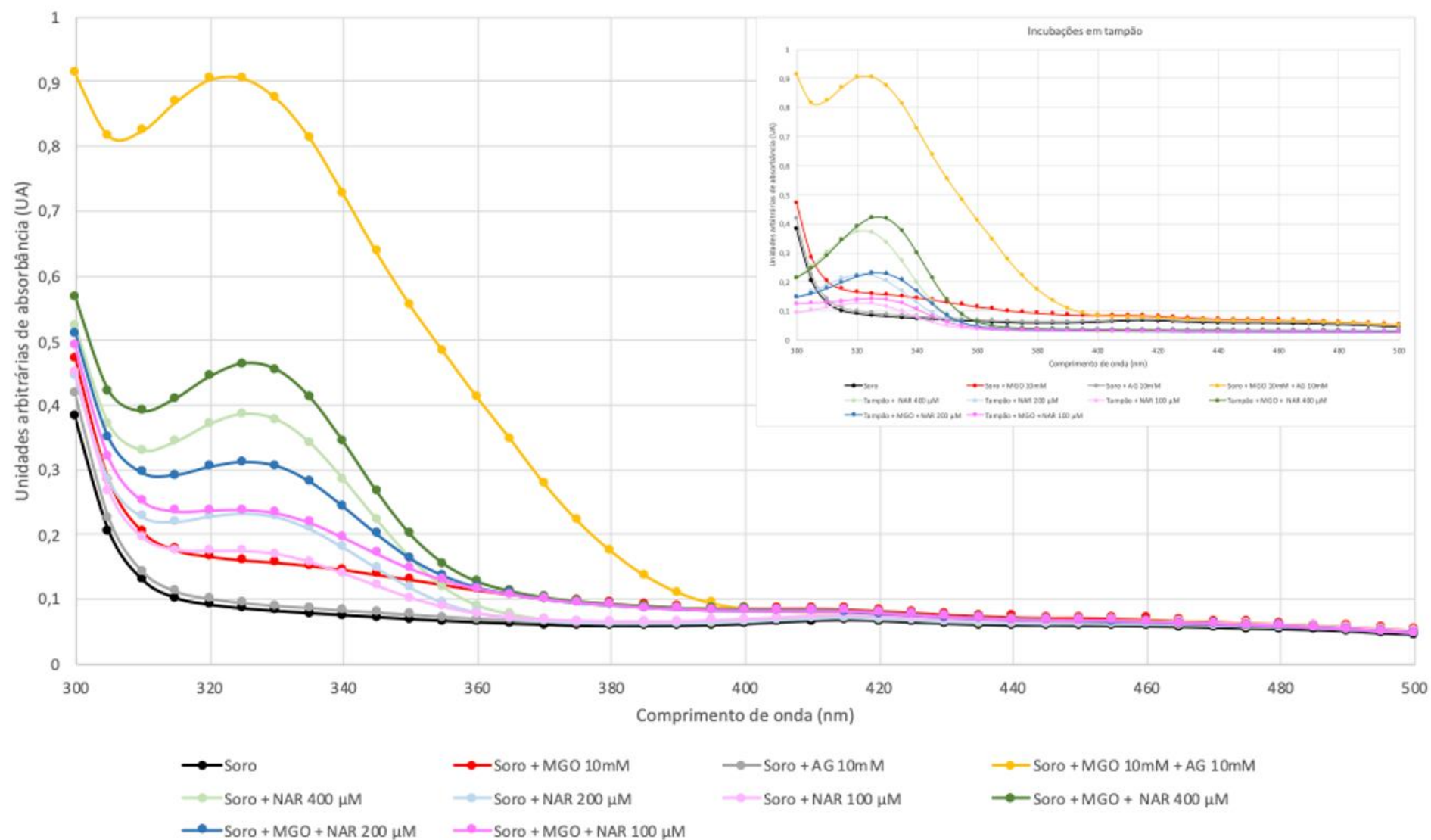
### Espectro de absorvância de incubações na presença de $\text{SbCHCl}_3$ - 48 Horas



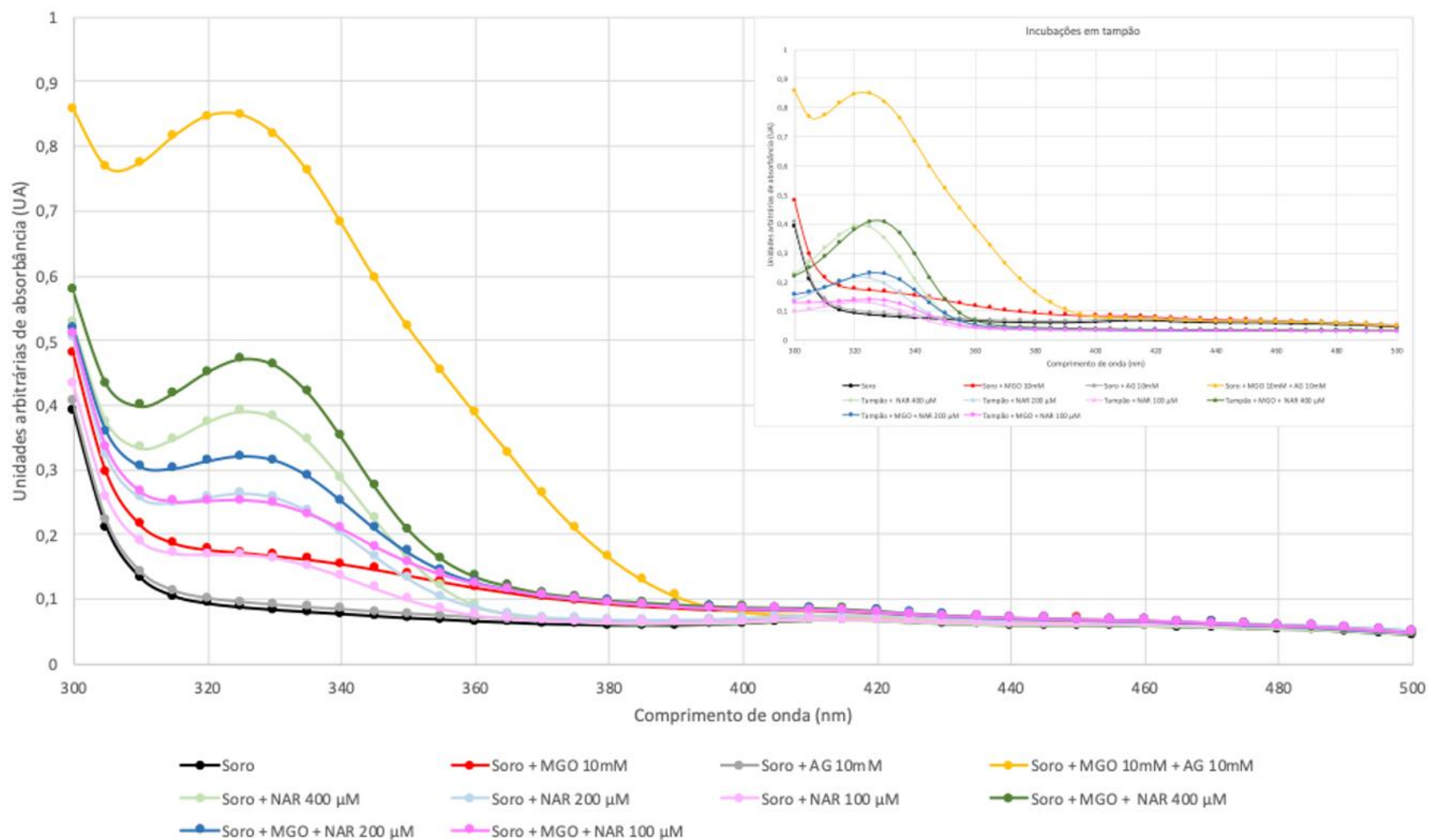
### Espectro de absorvância de incubações na presença de NAR - 0 Horas



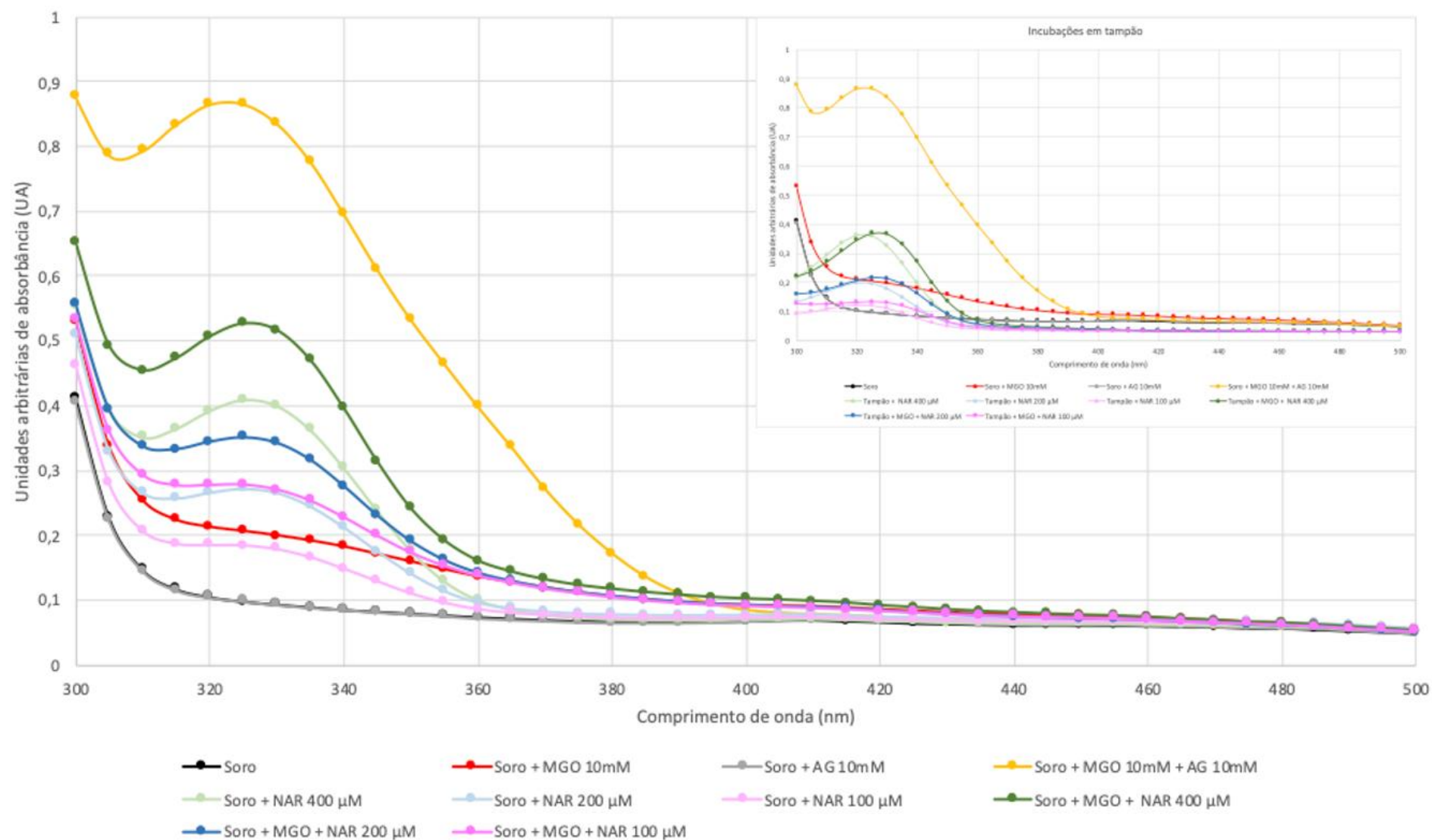
Espectro de absorvância de incubações na presença de NAR - 6 Horas



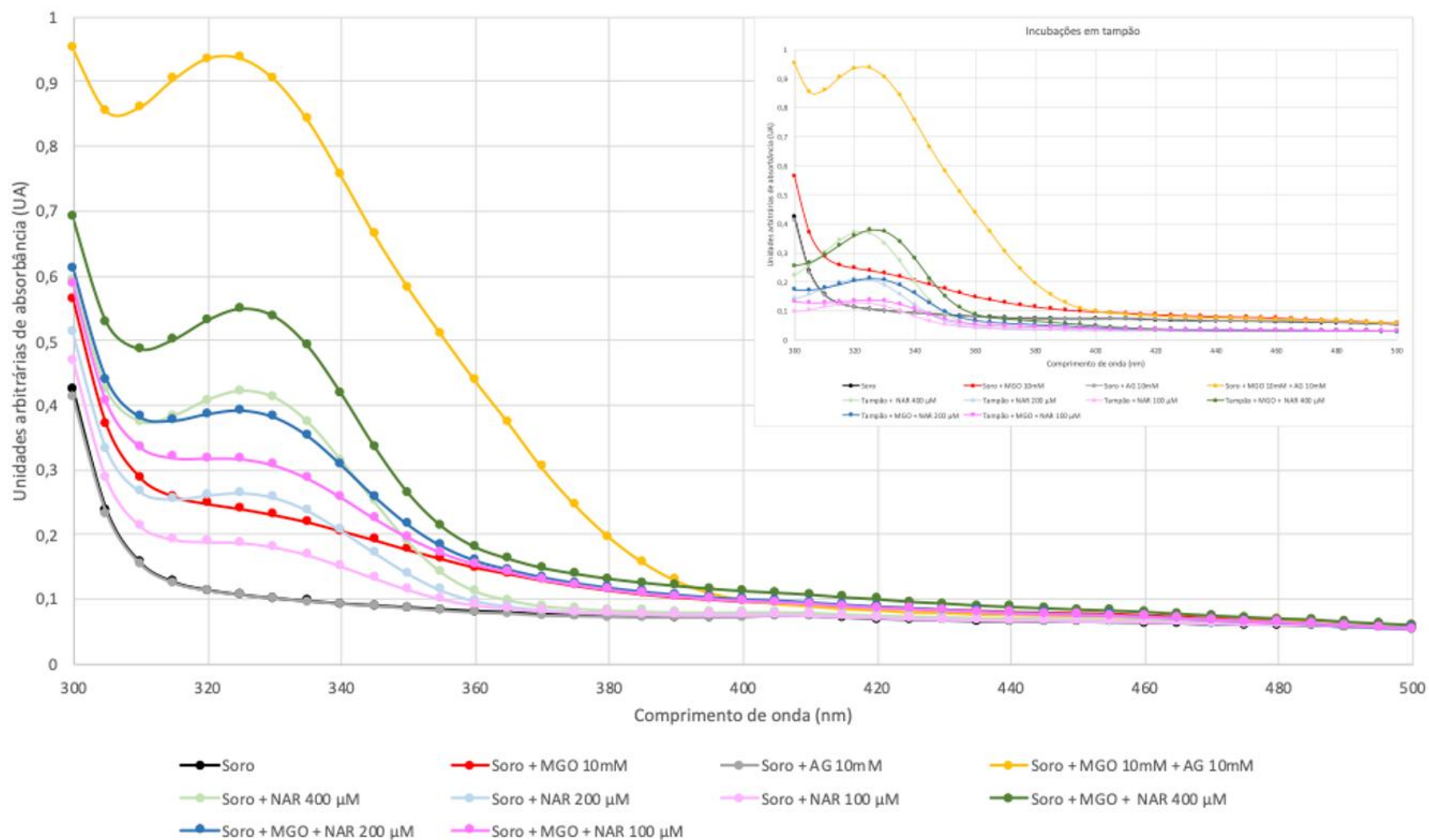
### Espectro de absorvância de incubações na presença de NAR - 12 Horas



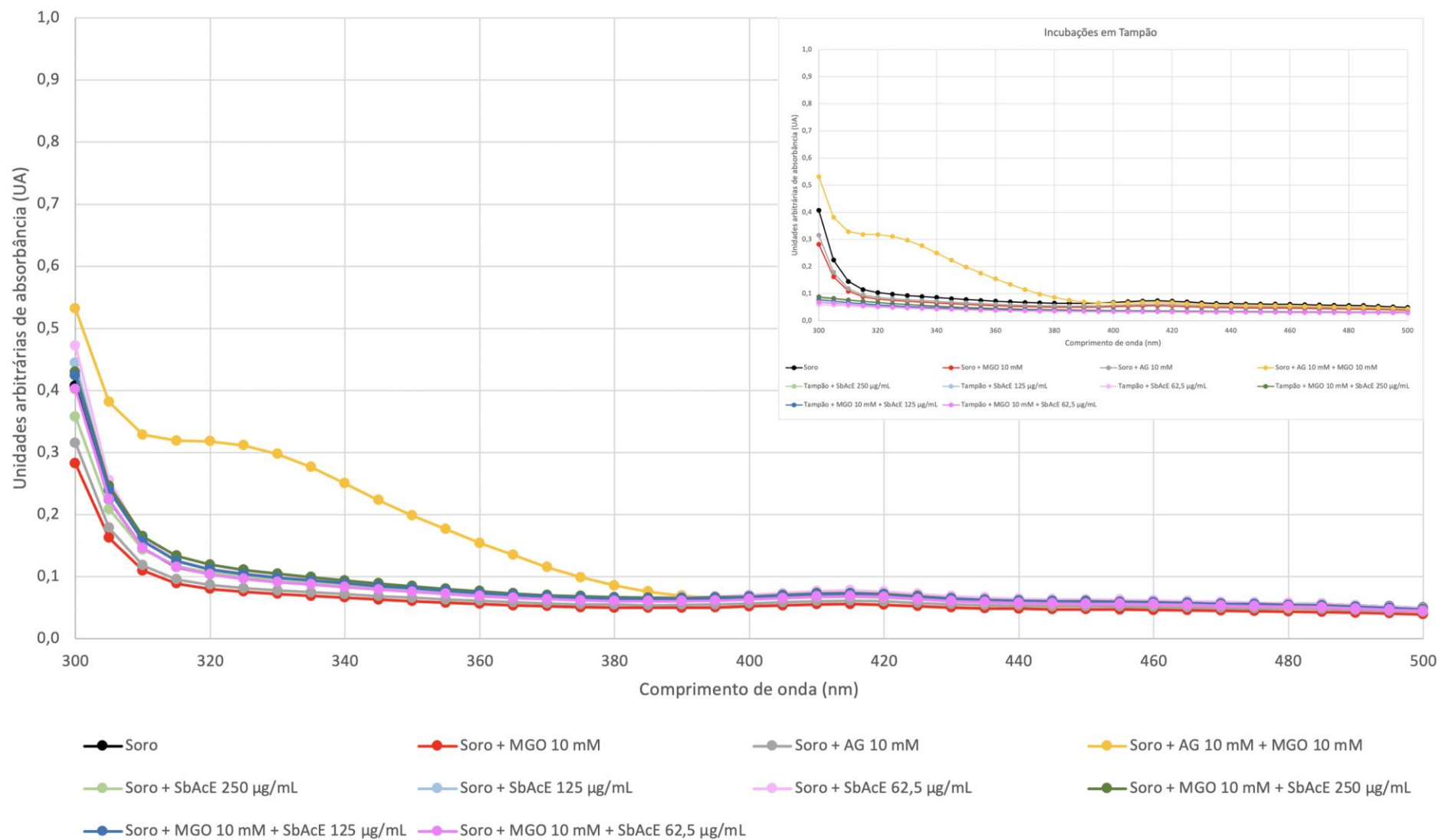
### Espectro de absorvância de incubações na presença de NAR - 24 Horas



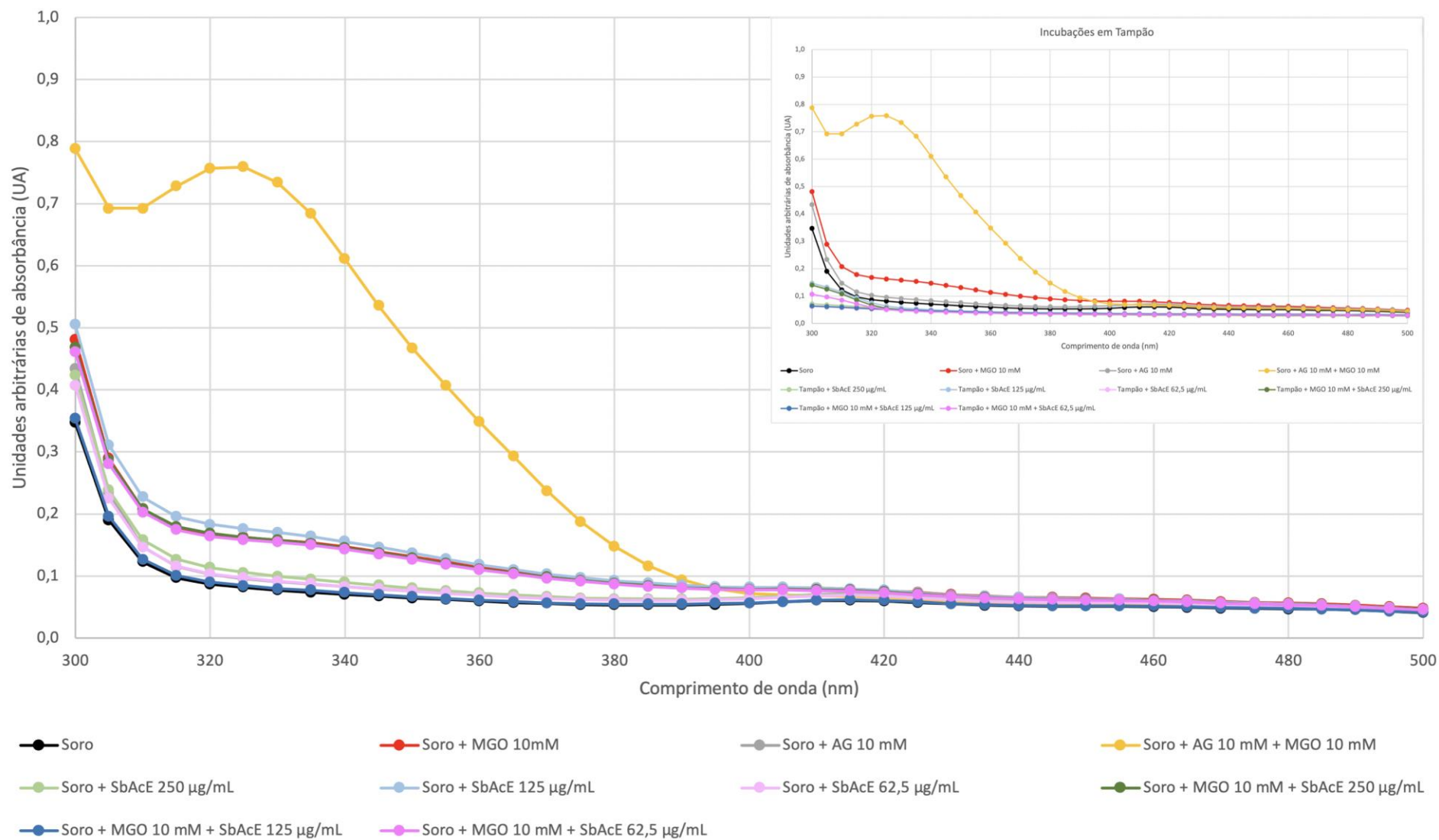
### Espectro de absorvância de incubações na presença de NAR - 48 Horas



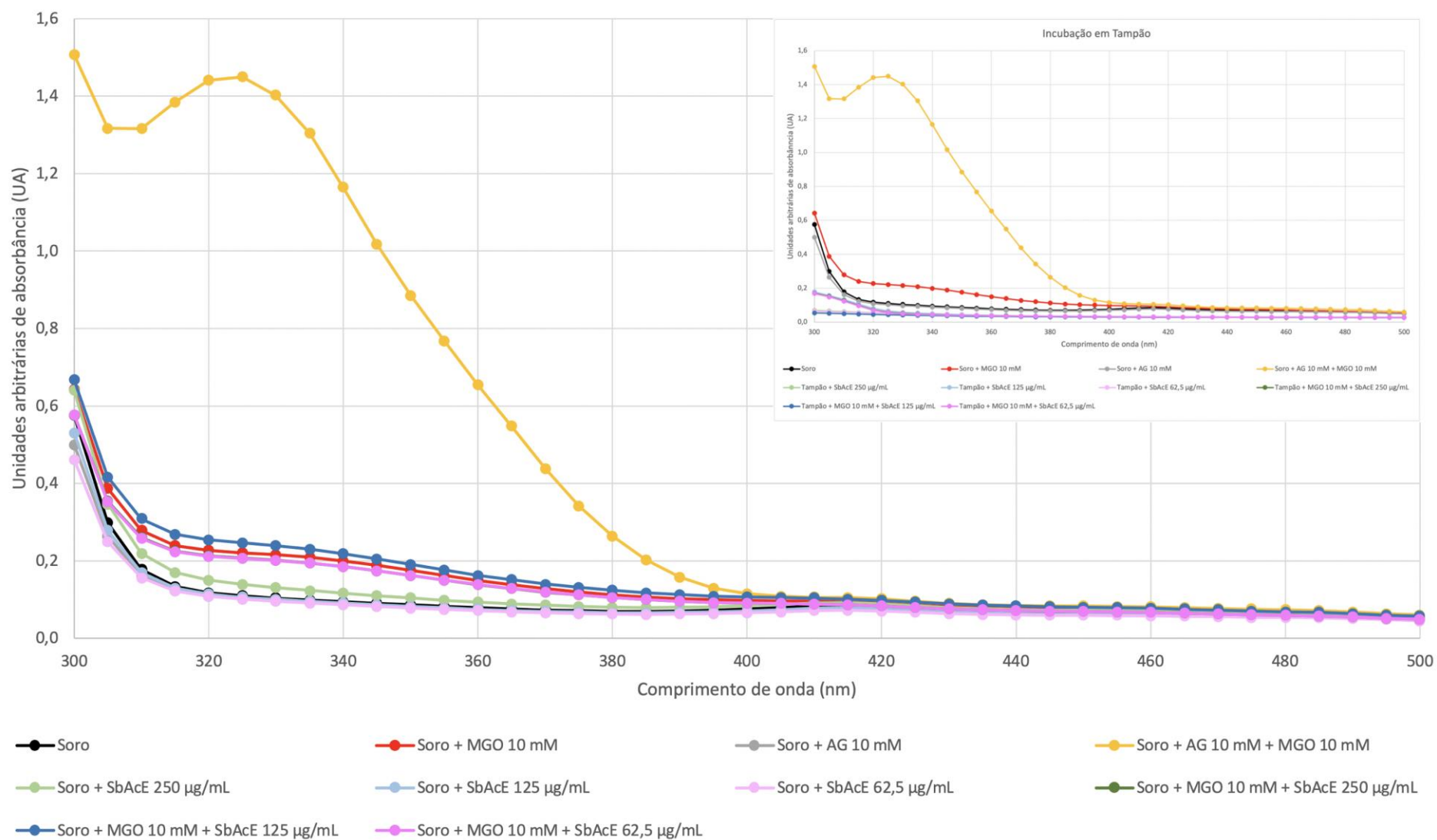
### Espectro de absorvância de incubações na presença de SbAcE - 0 Horas



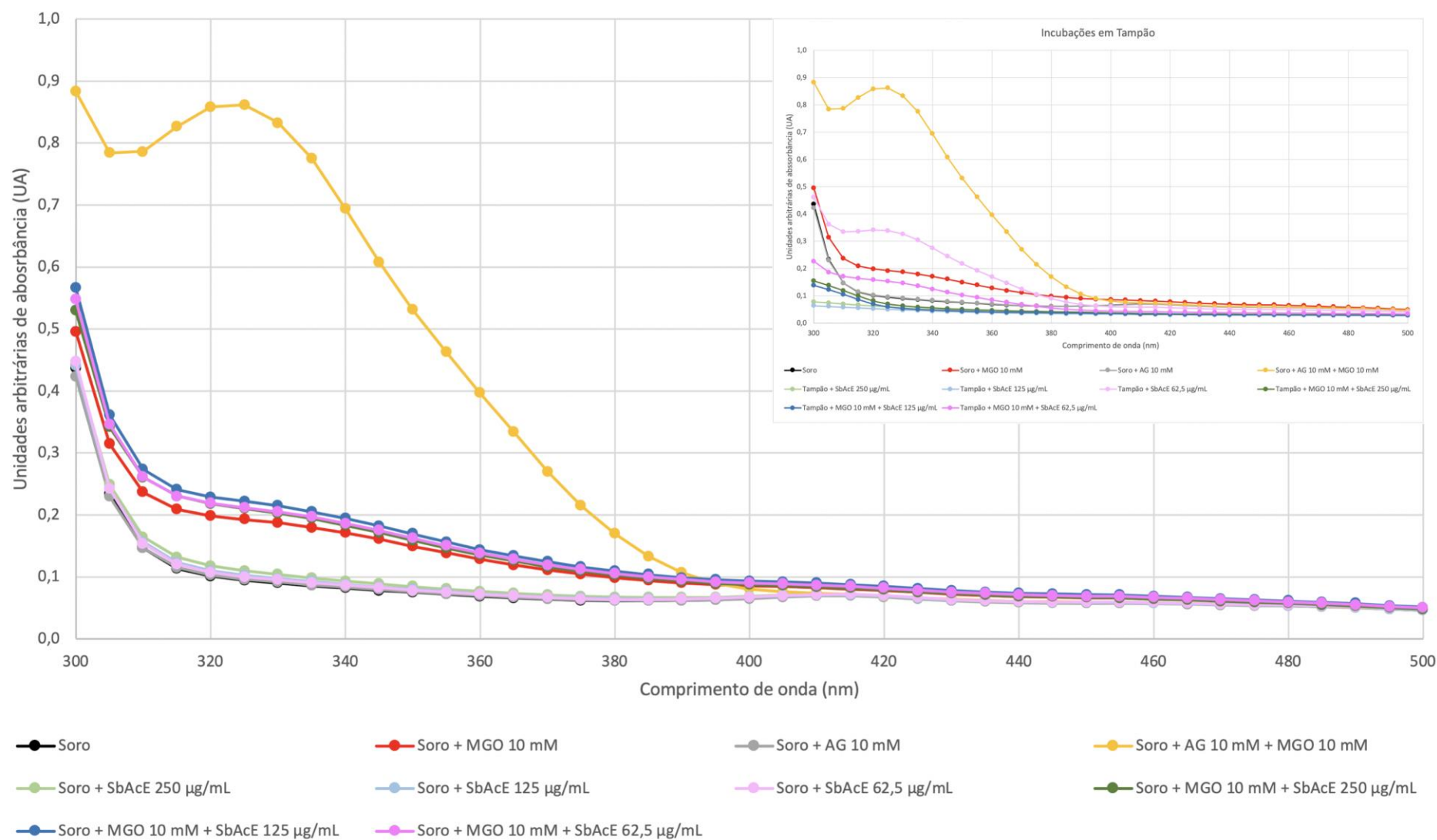
### Espectro de absorvância de incubações na presença de SbAcE - 6 Horas



### Espectro de absorvância de incubações na presença de SbAcE - 12 Horas



### Espectro de absorvância de incubações na presença de SbAcE - 24 Horas



### Espectro de absorvância de incubações na presença de SbAcE - 48 Horas

