



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação em Farmácia

FELIPE NUNES CARDOSO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGLICAÇÃO E ANTIOXIDANTE *IN*
VITRO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Cissus*
verticillata (L.) NICOLSON & C.E. JARVIS**

Araraquara, SP

2022

FELIPE NUNES CARDOSO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGLICAÇÃO E ANTIOXIDANTE *IN*
VITRO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Cissus*
verticillata (L.) NICOLSON & C.E. JARVIS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara, SP

2022

C268a Cardoso, Felipe Nunes
Avaliação do potencial antiglicação e antioxidante in vitro do extrato
hidroetanólico das folhas de *Cissus verticillata* (L.) NICOLSON & C.E
JARVIS/ Felipe Nunes Cardoso. – Araraquara, 2023.
82 f.: il.

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

Orientadora: Amanda Martins Baviera.

1. Diabetes Mellitus. 2. Estresse glico-oxidativo. 3. Glicação proteica.
4. Insulina vegetal. I. Baviera, Amanda Martins, orient. II. Título.

Agradecimentos

Agradeço à Deus por me conferir a determinação e a prudência necessárias para conclusão de meus objetivos.

Agradeço aos meus Pais, às minhas Avós, à minha Irmã e ao meu Tio por todo sacrifício dado em função da minha formação e da minha manutenção em uma cidade distante, algo de extrema importância para realização de um grande marco pessoal.

Agradeço à Professora Amanda Martins Baviera pelo convite de ingresso ao Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas, um local onde pude desenvolver e aprimorar habilidades fundamentais para um Farmacêutico, bem como por toda a ajuda com situações que foram além das paredes do laboratório.

Agradeço aos alunos que compõe e compuseram o Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas, em especial Bruno Pereira Motta, Anderson Kiyoshi Kaga, Renata Pires de Assis, Ingrid Delbone Figueiredo e Juliana Oriel de Oliveira, pelos mais variados auxílios e ensinamentos que garantiram a concretização deste trabalho.

Agradeço aos professores André Gonzaga dos Santos e Luis Vitor Silva do Sacramento pelo apoio material e científico que foi direcionado para condução das técnicas envolvidas no preparo e na análise dos extratos vegetais, e pela possibilidade de interagir com o Winner Duque Rodrigues, a Bárbara Paes Miglioli da Mata e o Caio Humberto Perego, alunos e funcionários comprometidos que me acompanharam durante a execução de muitas atividades.

Agradeço aos professores Fernando Lucas Primo e Fernando Rogério Pavan, bem como à técnica Danielli dos Santos Baeta por possibilitarem a utilização, respectivamente, do rotaevaporador Heidolph®, do espectrofluorímetro de placas BioTek® e do liofilizador Christ®, equipamentos que foram de grande ajuda em diferentes etapas da parte experimental que compõe este trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenadoria de Permanência Estudantil (COPE) da UNESP pelo apoio financeiro disponibilizado durante grande parte do desenvolvimento deste trabalho.

A todos vocês, muito obrigado!

Resumo

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica que, não sendo controlada, tem a hiperglicemia crônica como principal característica. Essa condição favorece o estabelecimento do estresse glico-oxidativo, com exacerbação nos eventos de glicação proteica e formação de produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation end products*, AGEs) e espécies reativas de oxigênio (EROs), que promovem danos às biomoléculas. A realização de estudos com compostos bioativos naturais capazes de inibirem a glicação proteica e a formação dos AGEs e EROs vem sendo uma tendência atual, devido ao interesse dos indivíduos diabéticos por novas opções terapêuticas para o controle do DM. *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis é uma espécie vegetal usada popularmente no tratamento dos sintomas do DM. A fim de verificar o potencial antioxidante e antiglicação de preparações dessa espécie vegetal e da tiramina, um de seus metabólitos bioativos, foram conduzidos ensaios *in vitro* de captura de EROs e um sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*. Dois extratos hidroetanólicos (70%) de folhas de *Cissus verticillata*, EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2), foram obtidos por maceração. As análises cromatográficas dos extratos não possibilitaram confirmar a ausência ou presença de tiramina, porém indicaram diferenças entre as composições químicas de EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2). Nos ensaios de captura do radical peróxido (ROO[•]), ânion radical superóxido (O₂^{•-}) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), verificou-se a seguinte ordem de atividade antioxidante: EHE-Cv (1) > EHE-Cv (2) > tiramina. Por exibir o maior potencial antioxidante, somente EHE-Cv (1) foi utilizado nos estudos de verificação do potencial antiglicação *in vitro*, via realização de incubações de albumina sérica bovina com glicose (37°C durante 30 dias) na presença de EHE-Cv (1) nas concentrações de 62,5, 125 e 250 µg/mL. Com base nos resultados obtidos com as análises de AGEs fluorescentes, biomarcadores da oxidação de resíduos de aminoácidos, níveis de proteínas carboniladas e verificação da formação de ligações cruzadas em proteínas, observou-se que EHE-Cv (1) apresentou significativo potencial antiglicação *in vitro*, com perfil de resposta dependente de concentração. Esses dados reforçam as propriedades antidiabéticas da *Cissus verticillata* e contribuem para novas perspectivas acerca de uma possível eficácia contra o estresse glico-oxidativo.

Palavras-chave: diabetes mellitus; estresse glico-oxidativo; glicação proteica; insulina vegetal.

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease that, if not controlled, has as main feature the chronic hyperglycemia. This condition favors the establishment of glycoxidative stress, with exacerbation of protein glycation events and formation of advanced glycation end products (AGEs) and reactive oxygen species (ROS), which promote damage to biomolecules. Performing studies with natural bioactives able to inhibit protein glycation and the formation of AGEs and ROS has been a current trend, due to the interest of diabetic individuals in new therapeutic options for the control of DM. *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis is a plant species of the Vitaceae family, popularly used to treat the symptoms of DM. In order to verify the antioxidant and antiglycation potentials of preparations of this plant species and of tyramine, one of its bioactive metabolites, *in vitro* capture assays for ROS and an *in vitro* model system of protein glycation were performed. Two hydroethanolic extracts (70%) from leaves of *Cissus verticillata*, EHE-Cv (1) and EHE-Cv (2), were obtained by maceration. Chromatographic analysis of the extracts did not confirm the absence or presence of tyramine, but indicated differences between the chemical compositions of EHE-Cv (1) and EHE-Cv (2). With the peroxy radical ($\text{ROO}^\bullet$), superoxide radical anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) capture assays, the following order of antioxidant activity was observed: EHE-Cv (1) > EHE-Cv (2) > tyramine. As it exhibits the greatest antioxidant potential, only EHE-Cv (1) was used in studies to verify the *in vitro* antiglycation potential, via incubations of bovine serum albumin with glucose (37°C during 30 days) in the presence of EHE-Cv (1) at concentrations of 62.5, 125, 250 $\mu\text{g/mL}$. Based on the results obtained with the analysis of fluorescent AGEs, biomarkers of amino acid residues oxidation, levels of carbonyl proteins and verification of the formation of cross-links in proteins, it was observed that EHE-Cv (1) showed significant *in vitro* antiglycation potential in a concentration-dependent response profile. These data reinforce the antidiabetic properties of *Cissus verticillata* and open new perspectives on its possible efficacy against glyco-oxidative stress.

Keywords: diabetes mellitus; glycoxidative stress; protein glycation; vegetal insulin.

Lista de Figuras

Figura 01 – Vias de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) <i>in vivo</i>	18
Figura 02 – Vias de sinalização celular induzidas pela interação AGE/RAGE	19
Figura 03 – Material vegetal após as etapas de secagem (A) e moagem (B) de folhas de <i>Cissus verticillata</i>	27
Figura 04 – Etapas de maceração da droga vegetal de <i>Cissus verticillata</i> (A), obtenção da solução extrativa (B), remoção do solvente orgânico (etanol) via rotaevaporação (C) e remoção do solvente aquoso (água) via liofilização (D)	29
Figura 05 – Representação da estrutura molecular da crocina	32
Figura 06 – Esquema da geração do ânion superóxido em presença de um antioxidante	33
Figura 07 – Representação da oxidação do TNB à DTNB pelo H ₂ O ₂	34
Figura 08 – Cromatogramas obtidos por CLAE-UV de tiramina, EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2)	44
Figura 09 – Esquema de reações envolvidas no clareamento da crocina com a termólise do AAPH	46
Figura 10 – Representações entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com quercetina, trolox, EHE-Cv (1), EHE-Cv (2) e tiramina	47
Figura 11 – Inibição (captura) do O ₂ ^{•-} por quercetina, trolox, EHE-Cv (1), EHE-Cv (2) e tiramina	51
Figura 12 – Inibição (captura) do H ₂ O ₂ pela catalase (CAT)	53
Figura 13 – Efeitos das diferentes concentrações de EHE-Cv (1) na formação de AGEs fluorescentes em condições de incubação de BSA na ausência de glicose ...	55
Figura 14 – Efeitos das diferentes concentrações de EHE-Cv (1) na formação de AGEs fluorescentes em condições de incubação de BSA na presença de glicose ...	56

Figura 15 – Efeitos das diferentes concentrações de EHE-Cv (1) na formação de ditirosina (A), N'-formilquinurenina (B) e quinurenina (C) em condições de incubação de BSA na presença de glicose	56
Figura 16 – Efeitos das diferentes concentrações de EHE-Cv (1) nos níveis de proteínas carboniladas em sistema-modelo <i>in vitro</i> de glicação proteica	59
Figura 17 – Efeitos das diferentes concentrações de EHE-Cv (1) na formação de <i>cross-link</i> proteico em sistema-modelo <i>in vitro</i> de glicação proteica	61

Lista de Quadros

Quadro 01 – Constituição das distintas condições de incubação conduzidas no sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* 36

Quadro 02 – Cromatoplasmas após eluição de acetato de etila: tolueno: ácido fórmico e revelação com anisaldeído sulfúrico (A) e ninidrina SR (B), e sob incidência de luz ultravioleta de 254 nm (C) 42

Lista de Tabelas

Tabela 01 – Equação de competição cinética entre padrões e amostra	48
Tabela 02 – Comparação entre as capacidades de captura do radical ROO [•] em equivalentes à quercetina e trolox	48
Tabela 03 – Comparação entre valores de coeficiente angular e CE ₅₀ , para o ensaio de clareamento da crocina	49
Tabela 04 – Análise densitométrica das bandas referentes ao <i>cross-link</i> proteico nas amostras após 30 dias de incubação	61

Lista de Abreviaturas e Siglas

AAPH – 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina)

AG – Aminoguanidina

AGEs – Produtos finais de glicação avançada (do inglês *advanced glycation end Products*)

BSA – Albumina sérica bovina (do inglês *bovine serum albumin*)

CAT – Catalase

CCD – Cromatografia em camada delgada

CLAE-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta

DM – Diabetes mellitus

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina

DTNB – Ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico

EHE-Cv (1) – Extrato bruto hidroetanólico de folhas de *Cissus verticillata* coletadas em 26 de outubro de 2020

EHE-Cv (2) – Extrato bruto hidroetanólico de folhas de *Cissus verticillata* coletadas em 03 de dezembro de 2020

EROs – Espécies reativas de oxigênio

Gli – Glicose

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

HO• – Radical hidroxil

HSA – Albumina sérica humana (do inglês *human serum albumin*)

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NBT – Azul de nitrotetrazólio

O₂ – Oxigênio molecular

O₂^{•-} – Ânion radical superóxido

PAGE – Poliacrilamida

PCO – Proteínas carboniladas

PMS – Metassulfato de fenazina

RAGE – Receptor de produtos finais de glicação avançada (do inglês *receptor for advanced glycation end products*)

ROO[•] – Radical peroxil

SDS – Dodecil-sulfato de sódio

TCA – Ácido tricloroacético

TNB – Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

Sumário

Agradecimentos	04
Resumo	05
Abstract	06
Lista de Figuras	07
Lista de Quadros	09
Lista de Tabelas	10
Lista de Abreviaturas e Siglas	11
Sumário	13
1. Introdução	15
1.1. Diabetes mellitus	15
1.2. Glicação proteica e produtos finais de glicação avançada	16
1.3. Espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo	19
1.4. Antioxidantes e seu potencial na terapia complementar ao DM	21
1.5. <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C.E.	23
2. Objetivos	26
3. Materiais e métodos	27
3.1. Obtenção do material vegetal e preparação do extrato	27
3.2. Análise de metabólitos secundários	29
3.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)	30
3.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de espectro de absorbância no ultravioleta (CLAE-UV)	30
3.3. Avaliação do potencial antioxidante <i>in vitro</i>	31

3.3.1. Ensaio do clareamento (<i>bleaching</i>) da crocina (captura do radical ROO [•])	31
3.3.2. Ensaio de captura do ânion radical superóxido (O ₂ ^{•-})	32
3.3.3. Ensaio de captura do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	34
3.4. Sistema-modelo de glicação proteica <i>in vitro</i>	35
3.4.1. Determinação da formação de AGEs fluorescentes	37
3.4.2. Determinação da formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos	38
3.4.3. Quantificação dos níveis de proteínas carboniladas	38
3.4.4. Modificação da BSA via formação de ligações cruzadas (<i>cross-link</i> proteico)	39
3.4.5. Análise estatística	40
4. Resultados e discussão	41
4.1. Rendimento de EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2)	41
4.2. Perfis cromatográficos de EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2)	41
4.3. Avaliação da atividade antioxidante	45
4.4. Efeitos de EHE-Cv (1) nas mudanças em biomarcadores de glico-oxidação em sistema-modelo <i>in vitro</i> de glicação proteica	53
5. Conclusão	63
6. Referências	63
Anexos	75

1. Introdução

1.1. Diabetes mellitus

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica caracterizada pela deficiência na produção e secreção de insulina pelas células beta pancreáticas e/ou pela resistência insulínica em tecidos alvo (LYONS e JENKINS, 1997). No ano de 2021, o DM foi diagnosticado em 536,6 milhões de indivíduos com idade entre 20 e 79 anos em todo o mundo, gerando um total de 966 bilhões de dólares em gastos na área da saúde devido às suas complicações e ao fato de não possuir uma cura, o que leva ao emprego de tratamentos que duram por toda vida dos indivíduos portadores da doença (AGUIAR et al., 2008; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021). Estima-se que, caso o DM mantenha a mesma prevalência global atualmente registrada, no ano de 2045 aproximadamente 783,2 milhões de adultos serão diagnosticados com a doença, onde o Brasil contribuiria com uma prevalência de 23,2 milhões, o que equivaleria a cerca de 10% da população do país (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021).

De acordo com aspectos etiológicos, o DM é classificado principalmente em dois tipos: DM tipo 1, associado à ocorrência de uma reação autoimune de natureza poligênica, a qual resulta na destruição das células beta pancreáticas, culminando em absoluta deficiência de insulina, e DM tipo 2, caracterizado pela combinação entre resistência tecidual à insulina e progressiva perda da função das células beta do pâncreas (disfunção pancreática) (EIZIRIK, PASQUALI e CNOP, 2020). Há também o DM gestacional, detectado pela primeira vez na mulher durante a gravidez, no qual há a produção de hormônios hiperglicemiantes e enzimas que degradam a insulina por parte da placenta, o que repercute em aumento compensatório na produção do hormônio, bem como há um quadro de resistência à insulina. Existem também outros tipos específicos de DM, os quais são marcados por manifestações clínicas variadas, podendo ter relação com defeitos genéticos na função das células beta pancreáticas e/ou na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, infecções, uso de medicamentos ou agentes químicos, entre outros fatores (RODACKI et al., 2022; ZAJDENVERG et al., 2022).

Dentre as principais manifestações do DM, destacam-se as elevadas concentrações de glicose no sangue (hiperglicemia), no fluido intersticial e em células de diversos tecidos que conseguem captar a glicose independentemente da ação da insulina, incluindo rins, nervos, endotélio e retina (LYONS e JENKINS, 1997). Em quadros descontrolados do DM, a hiperglicemia torna-se crônica, resultando no estabelecimento e manutenção do estresse glico-oxidativo, o qual contribui para o surgimento das complicações microvasculares (retinopatia, neuropatia e nefropatia diabéticas) e macrovasculares (doenças coronarianas e vasculares periféricas) do diabetes (GREGG, SATTAR e ALI, 2016; MONNIER, SELL e GENUTH, 2005).

1.2. Glicação proteica e produtos finais de glicação avançada

Parte dos prejuízos associados ao estresse glico-oxidativo está atrelada ao processo de glicação de biomoléculas, especialmente a glicação proteica, uma reação não enzimática que ocorre entre os grupos amino primários de proteínas e os grupos carbonilas de carboidratos redutores. A glicação proteica foi primeiramente descrita por Louis Camille Maillard em 1912 e, por isso, também acaba sendo conhecida como reação de Maillard (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009; TORRES et al., 2018).

De maneira resumida, a glicação proteica é composta por três principais etapas: (i) a formação de uma base de Schiff instável e sua rápida conversão em produtos de Amadori, (ii) a formação de intermediários dicarbonílicos reativos e, por fim, (iii) a formação dos AGEs (do inglês advanced glycation end products) (EMEL'YANOV, 2017; PENNACHI, 2011). A glicação proteica inicia-se com uma reação reversível de adição nucleofílica que envolve grupos amino primários de proteínas e grupos carbonilas de carboidratos redutores, culminando na formação de estruturas instáveis, as bases de Schiff (aldimina) (NEGRE-SALVAYRE et al., 2009; PENNACHI, 2011); após uma sequência de rearranjos, tais estruturas são convertidas nos produtos de Amadori (cetoamina), os quais são relativamente mais estáveis (CHAUDHURI et al., 2018).

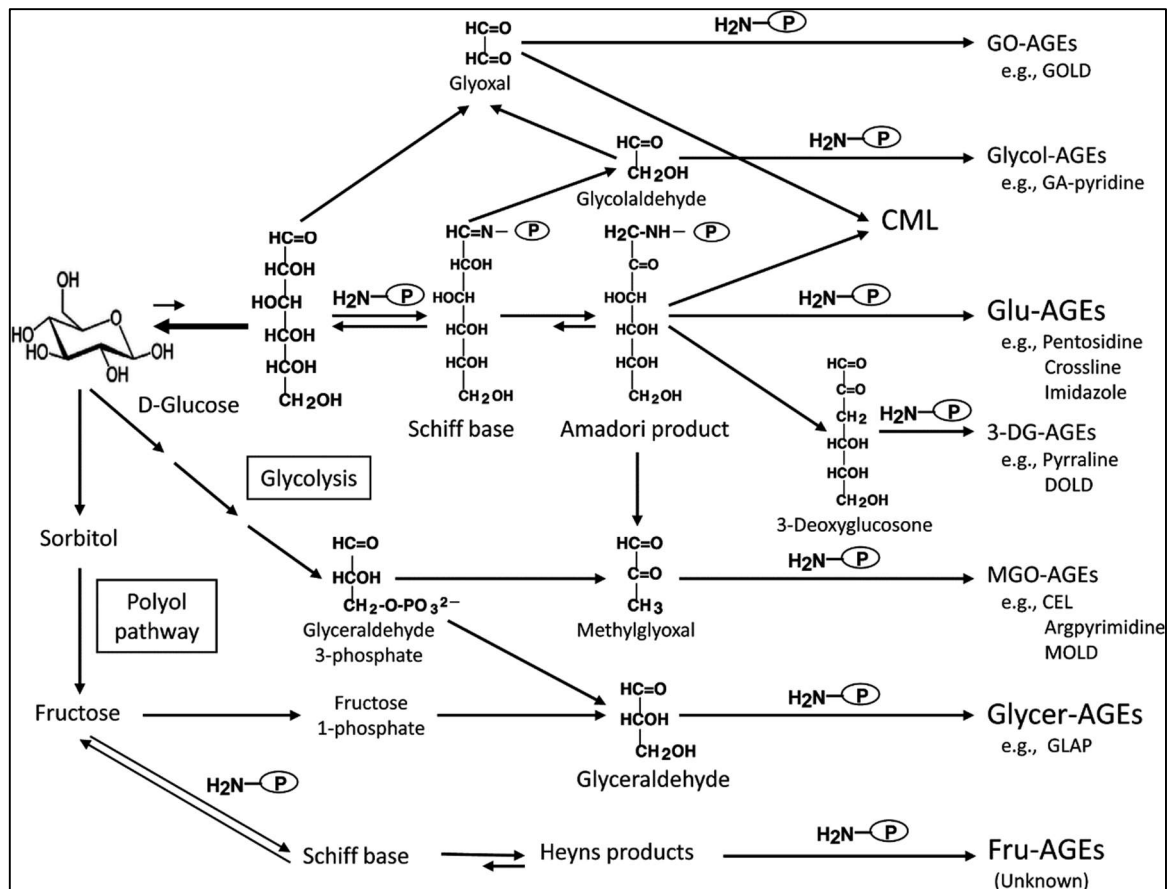
A frutosamina, também denominada de 1-amino-1deoxifrutose ou isoglucosamina, é um exemplo de produto de Amadori e possui uma significativa relevância clínica. A frutosamina é um cetoamina estável gerada a partir da glicação

não-enzimática de proteínas séricas, usualmente a albumina, mas também inclui a glicação de globulinas e lipoproteínas. As proteínas séricas, especialmente a albumina, têm maior velocidade de *turnover* (cerca de 14 - 20 dias) em relação aos eritrócitos e suas proteínas; por esse motivo, os níveis circulantes de frutossamina (bem como de albumina glicada) refletem os níveis médios de glicemia nas 2 - 3 semanas precedentes, tornando-a um marcador de estados hiperglicêmicos recentes (LIMA, 2018).

Além da frutossamina, outro parâmetro laboratorial importante que tem relação com glicação proteica é a hemoglobina glicada (HbA1c). A HbA1c foi a primeira proteína glicada (cetoamina) descoberta por Kunkel e Wallenius na década de 1950 (KUNKEL e WALLENIUS, 1955). A HbA1c é formada quando uma molécula de glicose se liga a um resíduo de valina na região *N*-terminal de cada cadeia beta da hemoglobina A (HbA). A extensão da glicação da hemoglobina é influenciada pelos níveis glicêmicos e pela vida média dos eritrócitos; uma vez que a vida média dos eritrócitos é de aproximadamente 120 dias, os níveis circulantes de HbA1c refletem os níveis médios de glicemia nas 8 - 12 semanas precedentes. A análise de HbA1c tem sido indicada para o apoio ao monitoramento da eficácia terapêutica no controle da glicemia em indivíduos diabéticos, uma vez que existe uma íntima associação entre a hiperglicemia crônica, os níveis de HbA1c e o risco de desenvolvimento das complicações do DM. (ANDRIOLO e VIEIRA, 2008; LIMA, 2018; SUMITA e ANDRIOLO, 2006).

Os produtos de Amadori podem sofrer uma diversidade de rearranjos irreversíveis (fissão oxidativa, fragmentação retro-aldol, desidratação, hidrólise não oxidativa), gerando compostos dicarbonílicos, incluindo glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona. Os compostos dicarbonílicos são altamente reativos; com frequência são denominados como propagadores das lesões glico-oxidativas (CHAUDHURI et al., 2018). Eles também podem ser gerados como subprodutos da auto-oxidação da glicose, da via glicolítica, da lipoperoxidação ou da via dos polióis (OTT et al., 2014). Os compostos dicarbonílicos podem reagir com diversas outras biomoléculas, especialmente com determinados resíduos de aminoácidos em proteínas (lisina, arginina, cisteína), resultando na formação dos produtos finais de glicação avançada, os AGEs (Figura 01) (EMEL'YANOV, 2017; PENNACHI, 2011; VISTOLI et al., 2013).

Figura 01. Vias de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) *in vivo*.



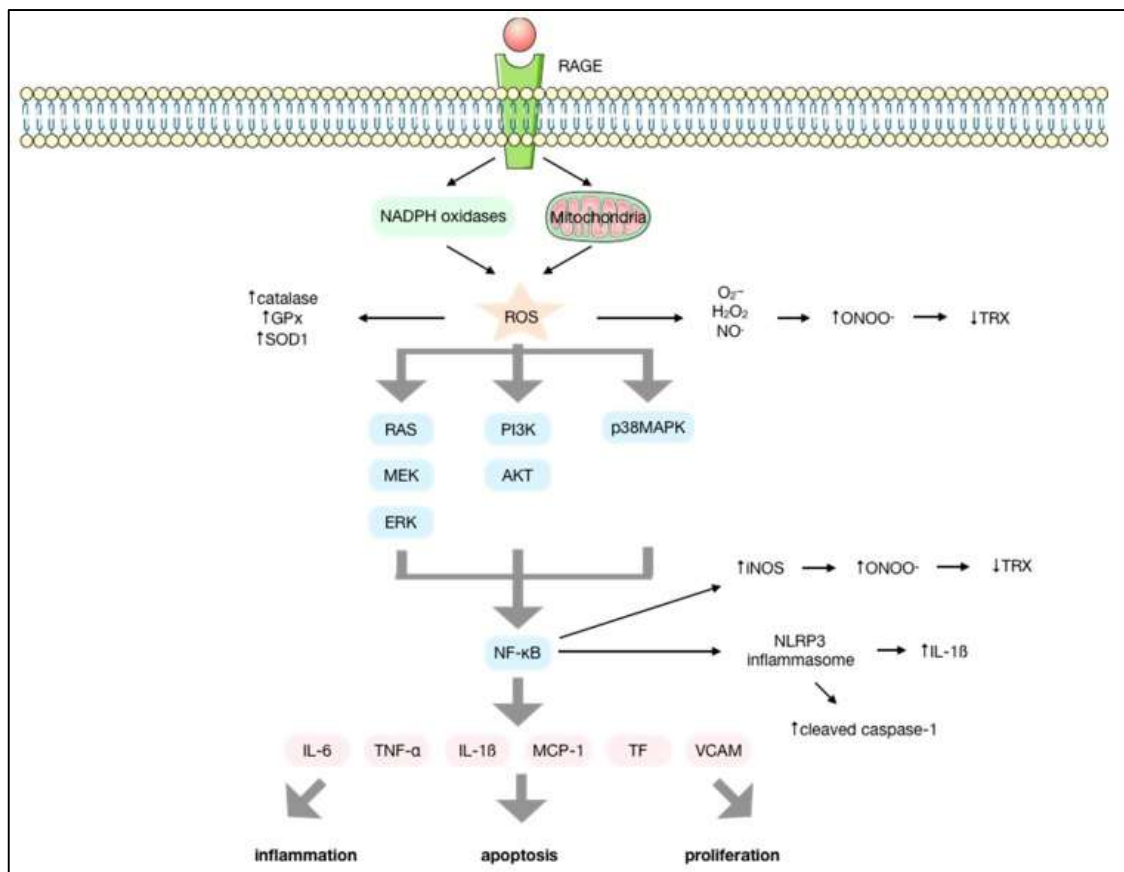
Fonte: TAKEUCHI et al. (2015).

Em condições fisiológicas normais, os AGEs são gerados em velocidade lenta, afetando principalmente biomoléculas de meia-vida longa (uma circunstância relevante para o processo de envelhecimento). Entretanto, em quadros descontrolados de DM, a persistente condição de hiperglicemia favorece a aceleração na formação de AGEs (BARBOSA, OLIVEIRA e SEARA, 2008; VISTOLI et al., 2013).

A glicação proteica é responsável pela promoção de alterações estruturais em proteínas que repercutem negativamente em suas funções celulares. Essas alterações na estrutura e função das proteínas são decorrentes de diferentes eventos que contribuem para o estabelecimento das complicações do DM, como, por exemplo, aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e formação de ligações covalentes cruzadas intra- e inter-proteínas (*cross-linking* proteico) (NEMET,

STRAUCH e MONNIER, 2011). As complicações relacionadas aos AGEs também podem ser promovidas pela interação dessas moléculas com um receptor específico (RAGE, do inglês *receptor for AGEs*). A interação AGE/RAGE encontra-se envolvida com o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e com a exacerbação na produção de EROs, fatores que induzem vias de sinalização celular relacionadas ao desenvolvimento de quadros de inflamação, morte celular e/ou câncer (Figura 02) (CEPAS et al., 2020; CHAUDHURI et al., 2018; WAGHELA et al. 2021).

Figura 02. Vias de sinalização celular induzidas pela interação AGE/RAGE.



Fonte: CEPAS et al. (2020).

1.3. Espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo

Quando íons ou moléculas contendo átomos de oxigênio passam a apresentá-lo na forma de radical, ou seja, com um elétron desemparelhado em sua órbita externa,

os mesmos começam a ser denominados como EROs. Pelo fato de possuírem grande instabilidade e reatividade em função do elétron não pareado, as EROs podem desempenhar certa toxicidade, pois tendem a ligar esse elétron não pareado com outros que estejam presentes nas estruturas de biomoléculas, incluindo lipídeos, proteínas e DNA, ocasionando danos oxidativos que podem contribuir com diversos efeitos deletérios nas células. As EROs podem ser formadas a partir de processos celulares enzimáticos e não enzimáticos, a fim de exercerem determinadas funções, como a regulação da expressão de genes específicos suscetíveis a sinais derivados de reações de oxirredução, a síntese de moléculas fisiologicamente ativas (p. ex. isoprostanos) e a defesa contra microrganismos assegurada pelo processo de fagocitose exercido por neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (RIBEIRO et al., 2005; SIES e JONES, 2020; VELLOSA, BARBOSA e OLIVEIRA, 2007). Além disso, as EROs são comumente classificadas como: espécies radicalares, representadas pelo radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical peroxil ($\text{ROO}^\bullet$) e radical alcóxila ($\text{RO}^\bullet$); e espécies não radicalares, onde se destacam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HClO) (SIES e JONES, 2020; SMITH, MARKS e LIEBERMAN, 2007).

O estresse oxidativo é definido como sendo o desequilíbrio entre a exacerbada formação das EROs e a menor capacidade endógena de eliminá-las por meio de sistemas antioxidantes, como por exemplo a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) que elimina $\text{O}_2^{\bullet-}$, e catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) que eliminam H_2O_2 , ou o potencial das vitaminas C e E, que são antioxidantes não enzimáticos (PISOSCHI et al., 2021; SMITH, MARKS e LIEBERMAN, 2007).

O estresse oxidativo está associado com o aumento nas taxas de glicação de biomoléculas e subsequente aumento na geração de AGEs, os quais se ligam ao receptor RAGE e exacerbam a produção de EROs. No entanto, a hiperglicemia crônica também favorece o estabelecimento do estresse oxidativo através da superprodução mitocondrial de EROs em células que possuem transportadores que captam glicose independentemente da ação da insulina (como é o caso das células do endotélio vascular, células renais, células de retina e células pancreáticas) (CEPAS et al., 2020; NAVALE e PARANJAPE, 2016; PISOSCHI et al., 2021).

Determinados metabólitos oriundos de reações oxidativas em biomoléculas causadas pelo excesso das EROs podem ser utilizados como marcadores do estresse oxidativo. Um exemplo de biomarcador de lesão oxidativa são os produtos de lipoperoxidação. Radicais hidroxil ($\text{HO}^\bullet$), hidroperoxil ($\text{HOO}^\bullet$) e peroxil ($\text{ROO}^\bullet$) podem abstrair um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado (LH), gerando H_2O e radical lipídico ($\text{L}^\bullet$). O radical $\text{L}^\bullet$ atua como propagador da peroxidação lipídica; reage com O_2 para formar radical lipoperoxil ($\text{LOO}^\bullet$), o qual pode abstrair hidrogênio de outro lipídeo LH, obtendo-se como produtos finais $\text{L}^\bullet$ e peróxido lipídico (LOOH). Rearranjos de LOOH podem resultar em sua degradação, gerando os produtos finais da lipoperoxidação, incluindo malondialdeído e 4-hidroxi-2-nonenal, os quais são frequentemente utilizados como marcadores da peroxidação lipídica (AYALA, MUÑOZ e ARGÜELLES, 2014).

Outro importante biomarcador de lesão oxidativa são os produtos de oxidação de proteínas. O radical $\text{HO}^\bullet$ também é capaz de reagir com praticamente todos os resíduos de aminoácidos em proteínas. Os radicais $\text{ROO}^\bullet$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ também possuem reatividade com determinados resíduos de aminoácidos. Derivados carbonilados podem ser gerados pela oxidação direta de resíduos de aminoácidos, incluindo 2-pirrolidona, semialdeído glutâmico, semialdeído aminoadípico, ácido 2-amino-3-cetobutírico, dentre outros, os quais conjuntamente podem ser denominados de grupos carbonil em proteínas. Em conjunto, os grupos carbonil passam a compor o que se define como “proteínas carboniladas” (PCO), as quais podem ser monitoradas via reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (COLOMBO et al., 2015).

1.4. Antioxidantes e seu potencial na terapia complementar ao DM

O avanço dos estudos acerca dos mecanismos responsáveis pela promoção de danos oxidativos devido à hiperglicemia sustenta evidências acerca do uso de antioxidantes como um suplemento às terapias farmacológicas para o DM. Os antioxidantes podem agir via diminuição do estresse oxidativo, e dessa forma podem ser efetivos na atenuação ou até mesmo na prevenção das complicações do DM, uma doença reconhecida por sua patogenicidade multifatorial (DIL, RANJKESH e GOODARZI, 2019; ROCHA et al., 2006; VARVAROVSKA et al., 2004).

É crescente o interesse da população pelo uso de produtos naturais, especialmente como uma opção complementar ao tratamento de doenças e suas complicações, principalmente as doenças crônicas, como é o caso do DM. Ademais, a associação de fármacos antidiabéticos clássicos (p. ex. insulina, metformina e glibenclamida) com preparações vegetais mostra-se como sendo benéfica quando realizada de forma racional e com acompanhamento (GUTIERRES et al., 2019; ROXO et al., 2019; FIGUEIREDO et al., 2020), especialmente no contexto do fenômeno conhecido como “memória metabólica” (TESTA et al., 2017).

A “memória metabólica” é o conceito dado ao conjunto de consequências deletérias relacionadas ao inexistente ou insuficiente controle metabólico, ou até mesmo aos episódios transitórios de hiperglicemia no DM, os quais têm associação com o estabelecimento das complicações da doença (sobretudo as doenças coronarianas e vasculares periféricas que podem evoluir para eventuais quadros de falência cardíaca) e com a piora da capacidade de acionamento dos sistemas endógenos reparativos ou de defesa contra essas agressões. Nesse cenário, os eventos oxidativos e glicativos sobre biomoléculas ainda persistem, o que repercute na manutenção das complicações do DM (BEREZIN, 2016).

Muitos antioxidantes podem ser encontrados em produtos naturais, tendo em vista que diversas plantas sintetizam metabólitos secundários dotados da capacidade de sequestrar radicais livres, onde é possível citar os carotenoides, os flavonoides, os compostos fenólicos e as vitaminas C e E que, por sua vez, mostram-se como constituintes de várias partes dos respectivos organismos vegetais, as quais podem ser utilizadas na produção de preparações destinadas ao uso medicinal (DALLAQUA e DAMASCENO, 2011; PEREIRA e CARDOSO, 2012; SOUSA et al., 2007).

O Brasil destaca-se por sua rica e diversificada flora, distribuída em 6 biomas, onde se faz presente muitas espécies vegetais que representam uma fonte substancial de compostos com propriedades farmacológicas, como flavonoides, compostos fenólicos e vitaminas (ANSARALI et al., 2016; SALGADO, MANSI e GAGLIARDI, 2009). Assim, crescem as evidências do importante papel de compostos com propriedades antioxidantes encontrados em diversas plantas medicinais na prevenção e/ou tratamento de doenças crônicas que possuem como característica a presença do estresse oxidativo. Esses antioxidantes possuem capacidade de

eliminação ou neutralização de EROs, podendo assim promover diversos benefícios no combate ao estresse oxidativo associado a determinadas patologias, incluindo doenças cardiovasculares, DM e obesidade, bem como doenças neurodegenerativas e determinados tipos de câncer (ZHANG et al., 2015).

Portanto, a prospecção do potencial farmacológico de espécies vegetais brasileiras é fundamental na busca por novas opções terapêuticas para o tratamento de doenças. Além disso, a utilização de sistemas-modelo *in vitro* que mimetizam as alterações observadas em condições patológicas aplicada aos produtos naturais é uma estratégia extremamente interessante em termos de prospecção tecnológica, contribuindo no direcionamento das pesquisas pré-clínicas e clínicas, pois, permite o *screening* de preparações vegetais e/ou compostos bioativos naturais com potencial aplicação terapêutica (SADOWSKA-BARTOSZ e BARTOSZ, 2015; CAGAN, 2016).

1.5. *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E.

Cissus verticillata (L.) Nicolson & C.E. Jarvis (heterotípico *Cissus sicyoides* L.) é uma espécie vegetal da família Vitaceae encontrada majoritariamente na região amazônica. É conhecida popularmente como insulina vegetal, cortina de princesa, anil-trepador, bejuco-caro, cipó-puca e uva brava. Destaca-se por possuir diversas propriedades terapêuticas, sendo tradicionalmente utilizada no tratamento dos sintomas do reumatismo, epilepsia, hipertensão, artrite e DM (PEPATO et al., 2003; SALAZAR et al., 2019; SALGADO, MANSI e GAGLIARDI, 2009). Ao desenvolver uma pesquisa de campo na Comunidade de Ponta de Urumajó, localizada na Bacia do Rio Caeté (mesorregião nordeste do Estado do Pará), esta caracterizada por apresentar um Índice de Condição de Vida e Moradia de 0,724 (sendo 0,707 o valor mínimo considerado aceitável), Moraes e colaboradores (2020) obtiveram relatos do uso do decocto de folhas de *Cissus verticillata* para o tratamento de alguns sintomas do DM, sendo essa uma prática amplamente difundida por parte população local que, apesar de desconhecer os perigos de potenciais efeitos tóxicos e reações adversas, possuía uma tradição embasada em experiências empíricas.

No que diz respeito a seu potencial antidiabético, um estudo do nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas demonstrou que ratos

diabéticos (indução com estreptozotocina) tratados durante 30 dias com o decocto de folhas de *Cissus verticillata* (150 g de folhas / 1 L de água destilada) apresentaram melhorias em diversos parâmetros alterados neste modelo experimental de DM, incluindo diminuição nos níveis de glicose no plasma e na urina (PEPATO et al., 2003). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Viana et al. (2004), onde, após quatro dias de administração oral de 200 mg/kg de extrato aquoso de *Cissus verticillata*, ratos diabéticos (indução com aloxana) apresentaram diminuição nos níveis plasmáticos de glicose e de triglicerídeos.

Ademais, ao serem tratados durante oito semanas com administrações orais diárias de 300 mg/kg da fração etanólica do extrato aquoso de folhas de *Cissus verticillata*, camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica, com o intuito de induzir um quadro de obesidade, mantiveram um ganho de peso corporal similar ao registrado pelo grupo de animais alimentados com uma dieta normolipídica, o que foi acompanhado por reduções tanto na glicemia quanto nos níveis de lipoproteína de baixa densidade transportadora de colesterol, triglicerídeos e HbA1c (KIM et al., 2021b).

Por sua vez, estudo de Kim et al. (2021a) também descreveu que a presença de 50 µg/mL da fração etanólica do extrato aquoso de folhas de *Cissus verticillata* conseguiu inibir a fragmentação de DNA e a morte celular em culturas de células HT22 (linhagem de neurônios da região hipocampal de camundongo), quando essas foram incubadas com 1 mM de H₂O₂ durante 1 hora, respostas as quais foram atreladas ao fato de que um menor estresse oxidativo garantiu uma diminuição da expressão de Bax (proteína pro-apoptótica) e um concomitante aumento da expressão de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica).

Devido à sua utilização na medicina tradicional, *Cissus verticillata* teve sua toxicidade *in vivo* avaliada no tratamento de ratos e ratas Wistar com extrato hidroalcoólico de suas folhas, tanto em abordagem aguda (40,5 mg/kg durante 14 dias) quanto crônica (4,5, 13,5 e 40,5 mg/kg durante 3 meses). Não ocorreram alterações comportamentais significativas nos animais (machos ou fêmeas) que receberam o extrato de *Cissus verticillata*. Foram apenas observadas alterações discretas em certos parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos machos tratados com a dose de 13,5 mg/kg, como aumentos nos níveis séricos de albumina e aumento nos

eritrócitos e na hemoglobina, sendo esses revertidos com a descontinuidade do tratamento. Dessa forma, o estudo sugere que a preparação de folhas de *Cissus verticillata* possui uma baixa toxicidade em animais (DINIZ et al., 2018).

Segundo a literatura, *Cissus verticillata* é caracterizada por apresentar uma vasta quantidade de compostos bioativos, onde é possível citar a ocorrência de terpenos, esteroides, taninos e flavonoides (GOMES, 2012; SALAZAR et al., 2019). Dentre esses compostos bioativos destaca-se a tiramina, uma monoamina derivada do aminoácido tirosina presente em diversos tipos de alimentos, em especial aqueles que passaram por algum processo de fermentação. Em estudo de Lino (2008), observou-se que a tiramina, além de estimular a captação de glicose em tecidos sensíveis à insulina (cardiomiócitos e músculo esquelético, por exemplo), também foi capaz de reverter os quadros de hiperglicemia, hipoinsulinemia e glicosúria, em ratos diabéticos (indução com estreptozotocina) tratados durante 5 dias com 2 e 4 mg/kg de tiramina.

Morin e colaboradores (2002) observaram que, em culturas celulares de adipócitos e de músculos estriados esquelético e cardíaco, incubações com 0,3 mM (no caso do músculo estriado cardíaco) e 1 mM (no caso dos adipócitos e músculo estriado esquelético) de tiramina promoveram estímulo à captação de glicose, um resultando que corrobora os achados *in vivo*, uma vez que o tratamento agudo com tiramina (administração intraperitoneal de 4 mg/kg de tiramina) em ratos diabéticos 15 minutos antes da sobrecarga oral de glicose (2 g/kg) foi capaz de promover significativa diminuição na glicemia, em comparação aos animais que receberam sobrecarga de glicose e tratados somente com veículo (administração intraperitoneal de 0,9% de NaCl).

2. Objetivos

Avaliar o potencial antioxidante e antiglicação de extratos hidroetanólicos de folhas de *Cissus verticillata* e do metabólito tiramina, por meio de ensaios *in vitro* de captura de EROs e sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*, os quais mimetizam as modificações ocorridas durante o estresse glico-oxidativo *in vivo*.

3. Materiais e métodos

3.1. Obtenção do material vegetal e preparação dos extratos

As folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis (depósito no Herbário ISA tomo 10936; Cadastro SisGen nº A109280, Anexo 01) oriundas do Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Câmpus de Araraquara (21°48'58.1" S, 48°12'04.2" W) foram coletadas em dois períodos distintos: 26 de outubro de 2020 [coleta (1)] e 03 de dezembro de 2020 [coleta (2)], sendo selecionadas mediante aspectos visuais.

As folhas coletadas foram submetidas à secagem durante 5 dias em estufa digital (MTB CIENTÍFICA, Piracicaba, SP), com o emprego de circulação de ar e temperatura de 40 °C. Em seguida, as drogas vegetais secas e íntegras foram pulverizadas em micro-moinho de facas (TECNAL®, tipo Willye, modelo R-TE-648, Piracicaba, SP) e, posteriormente, submetidas à extração por maceração e remaceração com a mistura de solventes etanol: água destilada 70:30 (v/v) atuando como líquido extrator (Figura 03).

Figura 03. Material vegetal após as etapas de secagem (A) e moagem (B) de folhas de *Cissus verticillata*.



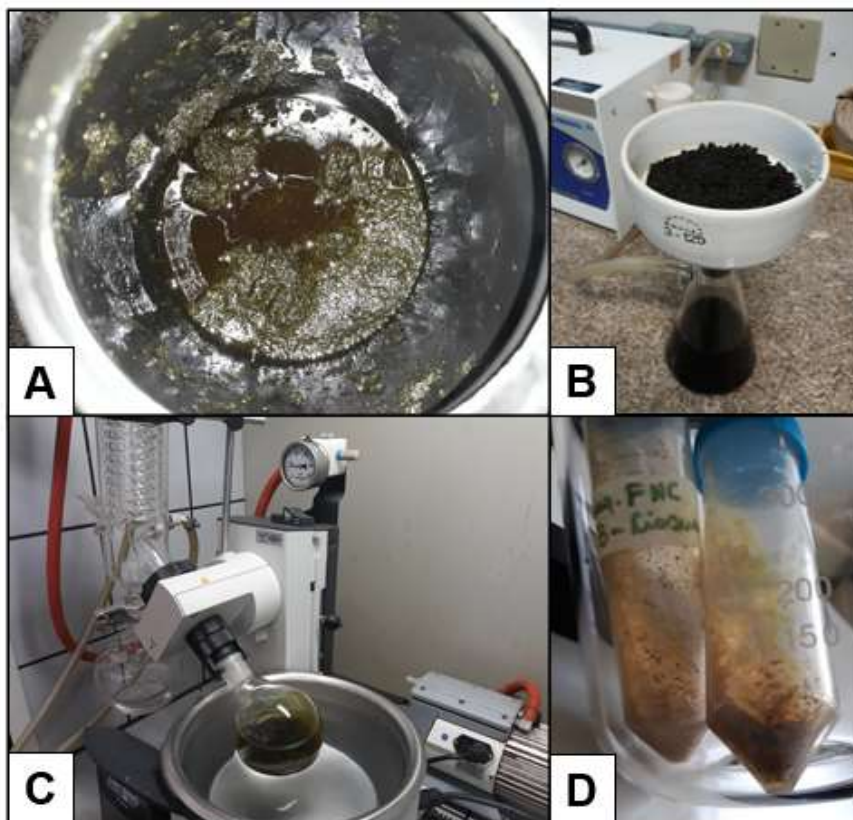
Fonte: Autoria própria.

Após 6 dias de extração (com uma renovação do líquido extrator no terceiro dia), as soluções extrativas resultantes correspondentes a cada um dos materiais vegetais foram reunidas e, posteriormente, submetidas à etapa de remoção do etanol (porção orgânica do líquido extrator) com o uso de um rotaevaporador (Heidolph® Hei-VAP Value, modelo HB/G3). Em seguida, houve a etapa de remoção da água, através de processo de liofilização utilizando o liofilizador Christ®, modelo Alpha 2-4 LD Plus (Figura 04). Dessa forma, garantiu-se a produção de dois extratos brutos hidroetanólicos de folhas de *Cissus verticillata*, livres de solventes, denominados EHE-Cv (1) (coleta em 26 de outubro de 2020) e EHE-Cv (2) (coleta em 03 de dezembro de 2020).

O rendimento de cada extração foi determinado mediante a aplicação da seguinte fórmula:

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

Figura 04. Etapas de maceração da droga vegetal de *Cissus verticillata* (A), obtenção da solução extrativa (B), remoção do solvente orgânico (etanol) via rotaevaporação (C) e remoção do solvente aquoso (água) via liofilização (D).



Fonte: Autoria própria.

3.2. Análise de metabólitos secundários

A composição química de EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2) foi investigada através de seus perfis cromatográficos obtidos com as técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção do espectro de absorvância no ultravioleta em 254 nm (CLAE-UV), sendo priorizada a busca pela provável presença de tiramina.

3.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Na CCD, os extratos foram solubilizados a 10 mg/mL em etanol. Cloridrato de tiramina (Sigma-Aldrich, grau de pureza $\geq 98\%$, CAS: 60-19-5) foi solubilizado a 1 mg/mL em água. Em seguida, 20 μ L das soluções foram aplicados sobre cromatoplasmas de sílica gel 60G (0,22 μ m, F254, Macherey-Nagel®), as quais foram acondicionadas em câmaras de saturação com acetato de etila: tolueno: ácido fórmico (5,6:2,4:2,0 v/v - $\epsilon_0 = 4,80$).

A eluição foi feita no modo ascendente e unidirecional. Em seguida, as placas foram secas em capela de exaustão e submetidas à revelação com nebulizações de anisaldeído sulfúrico e de ninidrina SR, acompanhadas de aquecimento em chapa a 100 °C. As bandas foram analisadas sobre luz visível e luz ultravioleta à 254 nm. A identificação das substâncias foi realizada por meio das bandas formadas e seus respectivos fatores de retenção (R_f), e feita comparação com os dados da literatura científica.

3.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de espectro de absorbância no ultravioleta (CLAE-UV)

Para a condução da CLAE-UV, foram consideradas as metodologias de Bhardwaj et al. (2009) e de Gianotti et al. (2008), com modificações. Alíquotas de 10 mg dos extratos passaram por um pré-tratamento, onde foi realizada a extração em fase sólida em cartucho de sílica C18 (55 μ m, 70 Å, 500 mg/6 mL, Strata®) com 10 mL de metanol: água (95:5 v/v), sendo as amostras resultantes secas, ressolubilizadas a 2 mg/mL em solução de HCl 0,1M, filtradas em membranas de PTFE hidrofílico (0,22 μ m, 13 mm, LAC Artigos para Laboratórios) e acondicionadas em vials. Por sua vez, uma solução de 1 mg/mL de cloridrato de tiramina foi preparada utilizando HCl 0,1 M e acondicionada em um vial.

Todas as soluções foram injetadas, separadamente, no cromatógrafo Thermo Scientific®, modelo UltiMate 3000, equipado com detector UV, utilizando coluna Thermo Scientific® C18 (250 x 4,60 mm, 100 Å, diâmetro de partícula 5 μ m), na condição de gradiente 60 - 75% de acetonitrila em 30 minutos, com vazão de 1,0 mL/min. e detecção no comprimento de onda de 254 nm. A identificação das substâncias

foi realizada com base nos dados espectrométricos e tempos de retenção (t_R) obtidos, e nos dados da literatura científica.

3.3. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro*

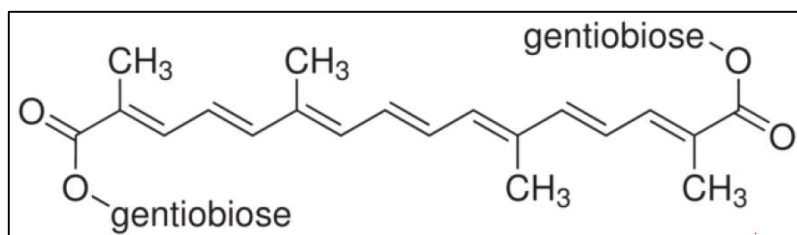
A fim de constatar a capacidade de EHE-Cv (1), EHE-Cv (2) e da tiramina em capturar as EROs que podem ser formadas no contexto do estresse glico-oxidativo *in vivo*, foram realizados os seguintes ensaios: (i) clareamento da crocina (captura do radical $ROO^\bullet$), (ii) captura do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e (iii) captura do peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Além de EHE-Cv (1), EHE-Cv (2) e da tiramina, os compostos quercetina (Sigma-Aldrich, grau de pureza $\geq 95\%$, CAS: 117-39-5) e trolox (Sigma-Aldrich, grau de pureza $\geq 97\%$, CAS: 53188-07-1) também foram incorporados nos ensaios como padrões, tendo em vista seus conhecidos potenciais antioxidantes (ROMÃO, 2016; UTRERA e ESTÉVEZ, 2013).

3.3.1. Ensaio do clareamento (*bleaching*) da crocina (captura do radical $ROO^\bullet$)

O ensaio foi realizado de acordo com Assis et al. (2015), onde, mediante o uso de triplicatas, 25 $\mu\text{mol/L}$ de crocina (carotenoide derivado da planta *Crocus sativus* L.; Figura 05) e diferentes concentrações de EHE-Cv (1), EHE-Cv (2), tiramina, quercetina ou de trolox foram incorporados em tampão fosfato de sódio (0,12 mol/L; pH 7,0) a 40 °C e com agitação constante, o que se sucedeu pela adição de 12,5 $\mu\text{mol/L}$ do azocomposto dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (AAPH) que, após sofrer uma reação de termólise, gerava um radical livre capaz de interagir com o O_2 dissolvido, resultando na formação do radical $ROO^\bullet$ responsável por promover a redução da absorbância da crocina, a qual foi avaliada a 443 nm durante 9 minutos com espectrofotômetro (Jasco, modelo V630).

Figura 05. Representação da estrutura molecular da crocina.

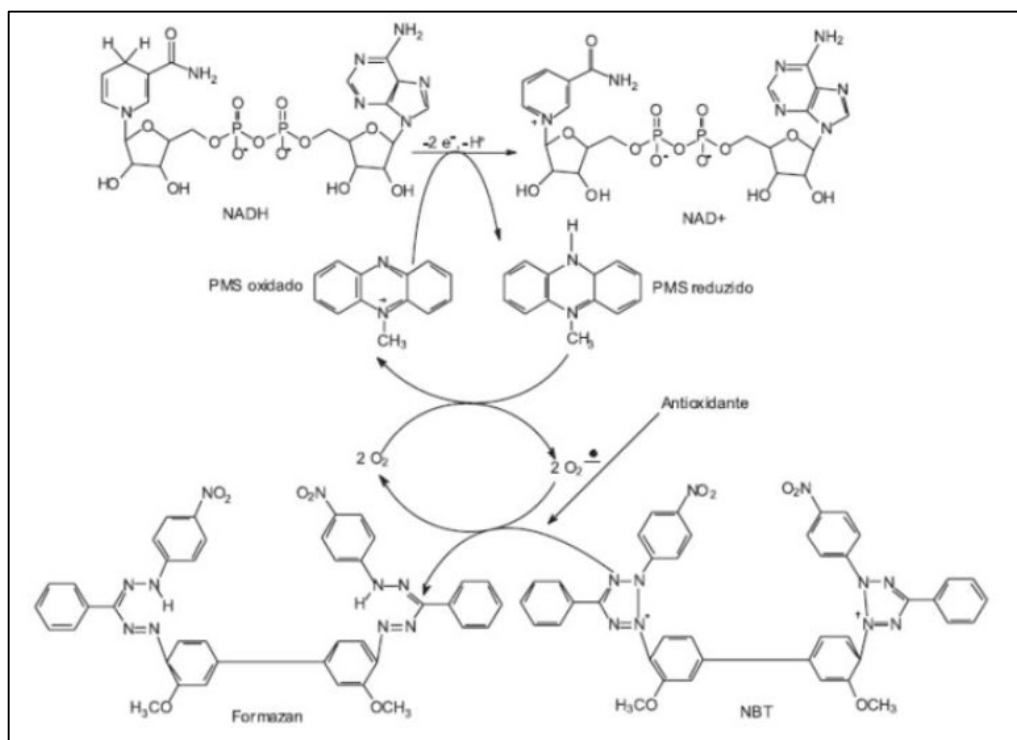


Fonte: Modificado de MOHAJERI et al. (2010).

3.3.2. Ensaio de captura do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

A interação entre nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), metassulfato de fenazina (PMS) e O_2 resulta na geração do $O_2^{\cdot-}$, que é capaz de reduzir o azul de nitrotetrazólio (NBT) a uma formazana caracterizada por exibir uma coloração de intensidade diretamente proporcional à concentração do radical (Figura 06) (KAKKAR, DAS e VISWANATHAN, 1984).

Figura 06. Esquema da geração do ânion superóxido em presença de um antioxidante



Fonte: OLIVEIRA et al. (2009).

O ensaio, conduzido mediante o uso de triplicatas, foi realizado em tampão pirofosfato de sódio (25 mmol/L; pH 8,3), contendo PMS (372 μ mol/L), NBT (600 μ mol/L), NADH (1560 μ mol/L), bem como EHE-Cv (1), EHE-Cv (2), tiramina, quercetina ou trolox. Após 7 minutos de incubação a temperatura ambiente e na ausência de luz, houve o monitoramento da absorbância em 560 nm com espectrofotômetro UV-Vis (BioTek®, modelo PowerWave XS2), a fim de determinar a mudança da coloração do NBT (amarelo pálido) para aquela expressa pela formazana (púrpura), um fenômeno que tende a ser reduzido na presença de moléculas com atividade antioxidante (HAZRA, BISWAS e MANDAL, 2008). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) das porcentagens de inibição da geração da formazana (CE_{50}) obtidas através da utilização do programa Microsoft Excel (Version 16.0) e da implementação da fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{(\text{Abs. máx.} - \text{Abs. amostra})}{\text{Abs. máx.}} \cdot 100$$

Onde:

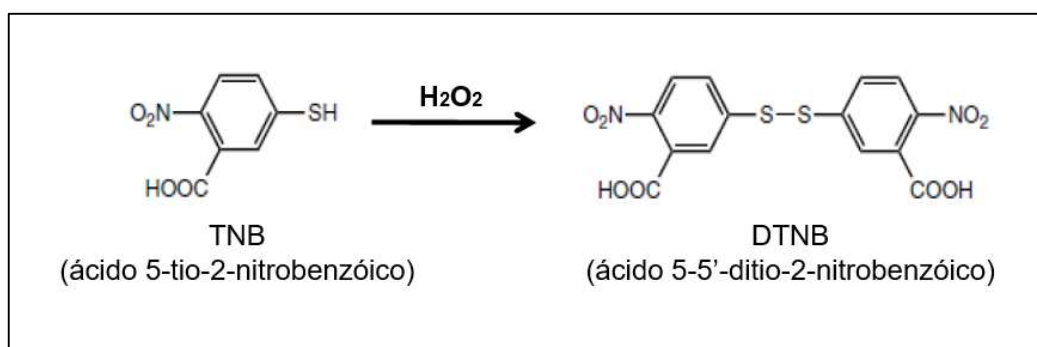
Abs. máx. = absorvância da formazana na ausência da amostra;

Abs. amostra = absorvância da formazana na presença da amostra.

3.3.3. Ensaio de captura do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Quando na presença de H₂O₂, o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) é oxidado à ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB), o que proporciona uma redução da absorvância detectada a 412 nm e um aumento da absorvância detectada a 325 nm (Figura 07). O TNB, preparado de acordo com Ching et al. (1994), teve sua concentração encontrada com o uso do coeficiente de extinção molar de 13600 M⁻¹cm⁻¹, associado ao comprimento de onda de 412 nm. A concentração do H₂O₂ foi definida de acordo com Brestel (1985), o que envolveu a utilização do coeficiente de extinção molar de 80 M⁻¹cm⁻¹, relativo a 230 nm.

Figura 07. Representação da oxidação do TNB à DTNB pelo H₂O₂.



Fonte: Modificado de LANDINO et al. (2008).

O ensaio, conduzido mediante o uso de triplicatas, foi realizado em tampão fosfato de potássio (50 mmol/L; pH 7,4), EHE-Cv (1), EHE-Cv (2), tiramina, quercetina ou trolox, H₂O₂ (0,3 mmol/L) e incubação por 30 minutos a 37 °C; foi adicionado o TNB (63,5 µmol/L), e a reação foi incubada a 37°C por mais 1 hora. A absorvância foi monitorada a 412 nm com espectrofotômetro UV-Vis (BioTek®, modelo PowerWave XS2). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) das

porcentagens de inibição da oxidação do TNB (CE₅₀), calculadas pela utilização do programa Microsoft Excel (Version 16.0) e pela implementação da fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = 1 - \frac{(\text{Abs. máx.} - \text{Abs. amostra})}{(\text{Abs. máx.} - \text{Abs. min.})} \cdot 100$$

Onde:

Abs. máx. = absorbância de TNB na ausência de H₂O₂;

Abs. min. = absorbância de TNB na presença de H₂O₂;

Abs. amostra = absorbância de TNB na presença de H₂O₂ e da amostra.

3.4. Sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*

O sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* foi conduzido conforme as metodologias utilizadas por Dos Santos et al. (2019) e Motta et al. (2020). A albumina sérica bovina (BSA, 10 mg/mL) foi incubada sob condições estéreis, em tubos criogênicos de 1,8 mL com rosca externa, na presença de glicose (Gli, 0,5 M), em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,4), contendo 0,02% de azida sódica e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), a 37°C (estufa incubadora de CO₂, P Selecta®) por 30 dias. Incubações foram conduzidas na ausência ou na presença de diferentes concentrações de EHE-Cv (1) (62,5, 125 e 250 µg/mL) ou de aminoguanidina (AG, 1 mM; agente protótipo anti-AGE).

As condições de incubação foram conduzidas em triplicata, onde cada replicata teve um volume final de 1500 µL, o qual foi obtido a partir da mistura de 500 µL da solução de trabalho de BSA (30 mg/mL), 500 µL da solução de trabalho de glicose (1,5 M), 300 µL da solução de trabalho de AG (5 mM), 125 µL da solução de trabalho de azida sódica (0,24%), 75 µL de DMSO puro, 75 µL da solução de trabalho de EHE-Cv (1) (5 mg/mL), 75 µL da solução de trabalho de EHE-Cv (1) (2,5 mg/mL) ou 75 µL da solução de trabalho de EHE-Cv (1) (1,25 mg/mL) (Quadro 01). Tampão fosfato foi adicionado para completar o volume desejado (Quadro 01).

Quadro 01. Constituição das distintas condições de incubação conduzidas no sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*.

Incubação	BSA 30 mg/mL (μ L)	Gli 1,5 M (μ L)	AG 5 mM (μ L)	Azida sódica 0,24% (μ L)	DMSO (μ L)	EHE-Cv (1) 5 mg/mL (μ L)	EHE-Cv (1) 2,5 mg/mL (μ L)	EHE-Cv (1) 1,25 mg/mL (μ L)	Tampão (μ L)	Volume final (μ L)
BSA	500	-	-	125	75	-	-	-	800	1500
Gli	-	500	-	125	75	-	-	-	800	1500
AG	-	-	300	125	75	-	-	-	1000	1500
BSA + Gli	500	500	-	125	75	-	-	-	300	1500
BSA + AG	500	-	300	125	75	-	-	-	500	1500
Gli + AG	-	500	300	125	75	-	-	-	500	1500
BSA + Gli + AG	500	500	300	125	75	-	-	-	-	1500
EHE-Cv (1) 250 μ g/mL	-	-	-	125	-	75	-	-	1300	1500
Gli + EHE-Cv (1) 250 μ g/mL	-	500	-	125	-	75	-	-	800	1500
BSA + EHE-Cv (1) 250 μ g/mL	500	-	-	125	-	75	-	-	800	1500
BSA + Gli + EHE-Cv (1) 250 μ g/mL	500	500	-	125	-	75	-	-	300	1500
EHE-Cv (1) 125 μ g/mL	-	-	-	125	-	-	75	-	1300	1500
Gli + EHE-Cv (1) 125 μ g/mL	-	500	-	125	-	-	75	-	800	1500
BSA + EHE-Cv (1) 125 μ g/mL	500	-	-	125	-	-	75	-	800	1500
BSA + Gli + EHE-Cv (1) 125 μ g/mL	500	500	-	125	-	-	75	-	300	1500
EHE-Cv (1) 62,5 μ g/mL	-	-	-	125	-	-	-	75	1300	1500
Gli + EHE-Cv (1) 62,5 μ g/mL	-	500	-	125	-	-	-	75	800	1500
BSA + EHE-Cv (1) 62,5 μ g/mL	500	-	-	125	-	-	-	75	800	1500
BSA + Gli + EHE-Cv (1) 62,5 μ g/mL	500	500	-	125	-	-	-	75	300	1500

Fonte: Autoria própria.

Alíquotas das incubações foram utilizadas nos ensaios para determinação da formação de AGEs fluorescentes e marcadores de oxidação de resíduos de triptofano e tirosina (0, 10, 20 e 30 dias). Complementando essas análises, foram obtidos espectros de absorbância (espectrofotômetro UV-Vis BioTek®, modelo PowerWave XS2) e de emissão após excitação à 355 nm (espectrofluorímetro de placas, BioTek®, modelo Synergy H1 Hybrid), os quais abrangeram o intervalo de comprimento de onda de 300 a 500 nm, a fim de consultar a existência de possíveis interferências geradas por parte das características físico-químicas de EHE-Cv (1) sobre os dados espectrofluorimétricos obtidos. Os níveis de proteínas carboniladas e a formação de ligações cruzadas entre em proteínas (*cross-link* proteico) foram analisados após 30 dias de incubação.

3.4.1. Determinação da formação de AGEs fluorescentes

A geração de AGEs fluorescentes foi monitorada espectrofluorimetricamente (espectrofluorímetro de placas da marca BioTek®, modelo Synergy H1 Hybrid), a partir da seleção dos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 355 e 430 nm, respectivamente (SÉRO et al., 2013).

A geração dos AGEs fluorescentes foi expressa graficamente e o potencial anti-AGE de EHE-Cv (1) foi avaliado mediante a comparação entre a fluorescência relativa aos AGEs gerados na incubação de BSA + Gli frente a fluorescência relativa aos AGEs gerados na incubação de BSA + Gli + EHE-Cv (1), nas diferentes concentrações estudadas. Os valores de AGEs foram obtidos após subtração aritmética da fluorescência das incubações contendo AG ou EHE-Cv (1) na presença de BSA ou de BSA + Gli menos a fluorescência das incubações contendo AG ou EHE-Cv (1) na ausência de proteína. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência.

3.4.2. Determinação da formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos

Tal como os AGEs fluorescentes, os marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos foram monitorados espectrofluorimetricamente, nos respectivos comprimentos de onda de excitação/emissão: ditirosina (330/415 nm) como marcador de oxidação dos resíduos de tirosina; *N'*-formilquinurenina (325/434 nm) e quinurenina (365/480 nm), como marcadores da oxidação dos resíduos de triptofano (SADOWSKA-BARTOSZ, GALINIAK e BARTOSZ, 2014). Os valores de ditirosina, *N'*-formilquinurenina e quinurenina foram obtidos após subtração aritmética da fluorescência das incubações contendo AG ou EHE-Cv (1) na presença de BSA + Gli menos a fluorescência das incubações contendo AG ou EHE-Cv (1) na ausência de proteína. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência.

3.4.3. Quantificação dos níveis de proteínas carboniladas

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

A determinação de PCO ocorreu mediante adição de 100 µL das amostras das incubações em dois microtubos, sendo um deles denominado Amostra (A) e o outro Controle (C). No tubo (A) foram adicionados 400 µL de DNPH (10 mM) preparado em HCl (2,5 M), para que ocorra a reação com os grupos carbonilas formados em proteínas, enquanto que no tubo (C) foram acrescentados 400 µL de HCl (2,5 M). Ambos os tubos foram incubados por 1 hora na ausência de luz e, em seguida, foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (TCA, 20%), a fim de promover a precipitação das proteínas. Após homogeneização, os microtubos ficaram 5 minutos no gelo e, então, foram centrifugados a 10000 g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados duas vezes com 1 mL de acetato de etila: etanol (1:1), homogeneizados e centrifugados por 5 minutos a 10000 g a 4°C. Os *pellets* formados foram ressuspensos em 1 mL de solução de ureia (6 M). A absorbância dos sobrenadantes foi monitorada à 370 nm com

espectrofotômetro (Jasco, modelo V630) (MEEPROM et al., 2013). Os resultados foram obtidos com base na diferença entre os valores de absorbância dos microtubos (A) e (C) de cada amostra, onde a diferença encontrada foi utilizada para o cálculo da concentração dos grupos carbonilas, utilizando o coeficiente de extinção molar do DNPH ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.4.4. Modificação da BSA via formação de ligações cruzadas (*cross-link* proteico)

A verificação da formação de ligações cruzadas (*cross-link*) em proteínas foi realizada conforme os protocolos de estudos de Dos Santos et al. (2019) e Motta et al. (2020). Alíquotas das incubações foram submetidas à separação de proteínas (condições desnaturantes) via eletroforese em gel tipo SDS-PAGE (12%). Para o preparo da amostra para a eletroforese, foram adicionados 3 μL das incubações à 9 μL de tampão da amostra [62,5 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 10% de glicerol, 2% de SDS, 100 mM de ditiotreitol e 0,1% de azul de bromofenol] (LAEMMLI, 1970).

Massa de 3,75 μg de proteína (contida em volume de 1,5 μL) foi submetida à separação eletroforética em gel tipo SDS-PAGE (12%) por uma hora e trinta minutos e à 120 V, utilizando tampão de corrida de eletroforese [25 mM de Tris (pH 8,3), 192 mM de glicerol e 0,1% de SDS]. Após a separação das proteínas no gel, o gel foi corado com *Coomassie blue* (0,01% 10% metanol 10% ácido acético glacial, em água milliQ) por 30 minutos, seguido por 3 lavagens com solução descorante (10% metanol 10% de ácido acético, em água milliQ), substituída a cada 5 minutos.

Por fim, o gel permaneceu *overnight* em solução descorante por 2 dias, a fim de garantir uma melhor visualização das bandas no gel, e uma imagem do mesmo foi capturada pelo uso da câmera de um telefone celular. A imagem foi salva em formato JPG e submetida à análise densitométrica com o uso do programa ImageJ (Version 1.53a).

3.4.5. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram analisados usando o programa GraphPad Prism 9 (Version 9.0.0, GraphPad Software, Inc, USA), através da avaliação de variância One-Way (ANOVA) e análise de diferença pelo pós-teste Newman-Keuls, nas comparações intergrupos. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. Resultados e discussão

4.1. Rendimento de EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2)

Após secagem e pulverização das folhas de *Cissus verticillata*, as drogas vegetais obtidas apresentaram massas de 133,08 g (primeira coleta) e 145,80 g (segunda coleta). Por sua vez, com a completa remoção do líquido extrator, os pós na forma de cristais equivalentes a EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2) exibiram massas de 17,00 g e 17,49 g, respectivamente.

Dessa forma, os rendimentos em massa de EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2), a partir das massas das folhas secas e moídas, foram de aproximadamente 12,77% e 12,00%, na devida ordem. Esses valores vão ao encontro dos achados descritos por Braga (2008), onde o preparo de um extrato de folhas de *Cissus verticillata* com o uso dos solventes etanol: água destilada 50:50 (v/v) apresentou um rendimento de 10,6%, um valor menor do que os conquistados neste estudo, o que pode ser explicado tanto por perdas de massa durante transferências, quanto pela proporção de etanol presente no líquido extrator, a qual, por ter sido mais baixa no estudo de Braga (2008), pode ter repercutido na extração de uma menor quantidade de substâncias que possuem maior afinidade por solventes orgânicos, ou seja, substâncias mais apolares.

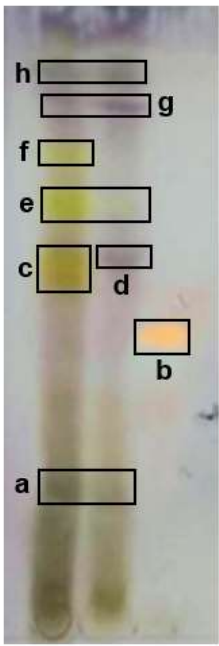
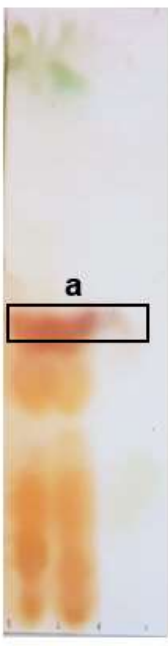
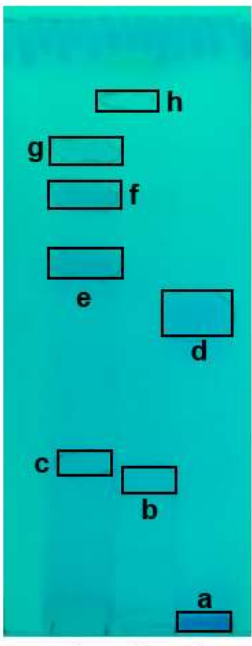
4.2. Perfis cromatográficos de EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2)

Através da realização de CCD utilizando o anisaldeído sulfúrico como revelador, observou-se que, após o aquecimento da placa, as amostras de EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2) resultaram na formação de padrões ligeiramente distintos de bandas de coloração amarela (indicativa de flavonoides), marrom (indicativa de terpenos), verde (indicativa de carboidratos e/ou metabólitos glico-conjugados) e violeta-azulada (indicativa de terpenos e/ou saponinas), sendo algumas dessas condizentes com as bandas e respectivos R_f visualizados em luz UV de 254 nm através da obstrução da fluorescência emitida pelo indicador F254 contido cromatoplaça (Quadro 02) (BRASIL, 2019; ARNHOLD e TISSOT-SQUALLI, 2016; CHAVES, 1997; GAZOLLA, 2017).

Além disso, bandas avermelhadas aparentemente similares foram identificadas em EHE-Cv (1), EHE-Cv (2) e tiramina quando empregado o revelador ninidrina SR

seguido de aquecimento, contudo, a baixa resolução da banda gerada pela solução-padrão de tiramina dificulta a realização de uma comparação mais assertiva (Quadro 02, letra B). O respectivo problema pode ser justificado pela existência da banda “a” observada na cromatoplaca submetida à incidência de luz ultravioleta de 254 nm (Quadro 02, letra C), a qual indica que uma grande quantidade de tiramina manteve-se próxima do ponto de aplicação devido a uma provável baixa afinidade da substância pela fase móvel utilizada, o que denota um elevado caráter polar exibido por parte da tiramina (DE AMORIM, 2019).

Quadro 02. Cromatoplas após eluição de acetato de etila: tolueno: ácido fórmico e revelação com anisaldeído sulfúrico (A) e ninidrina SR (B), e sob incidência de luz ultravioleta de 254 nm (C).

A	B	C
 1 2 3	 1 2 3	 1 2 3
$R_f a \cong 0,23$; $R_f b \cong 0,48$; $R_f c \cong 0,58$; $R_f d \cong 0,61$; $R_f e \cong 0,70$; $R_f f \cong 0,77$; $R_f g \cong 0,84$; $R_f h \cong 0,90$	$R_f a = 0,50$	$R_f a \cong 0,00$; $R_f b \cong 0,24$; $R_f c \cong 0,27$; $R_f d = 0,50$; $R_f e \cong 0,58$; $R_f f = 0,70$; $R_f g \cong 0,77$; $R_f h \cong 0,86$
1 = EHE-Cv (1); 2 = EHE-Cv (2); 3 = Tiramina		

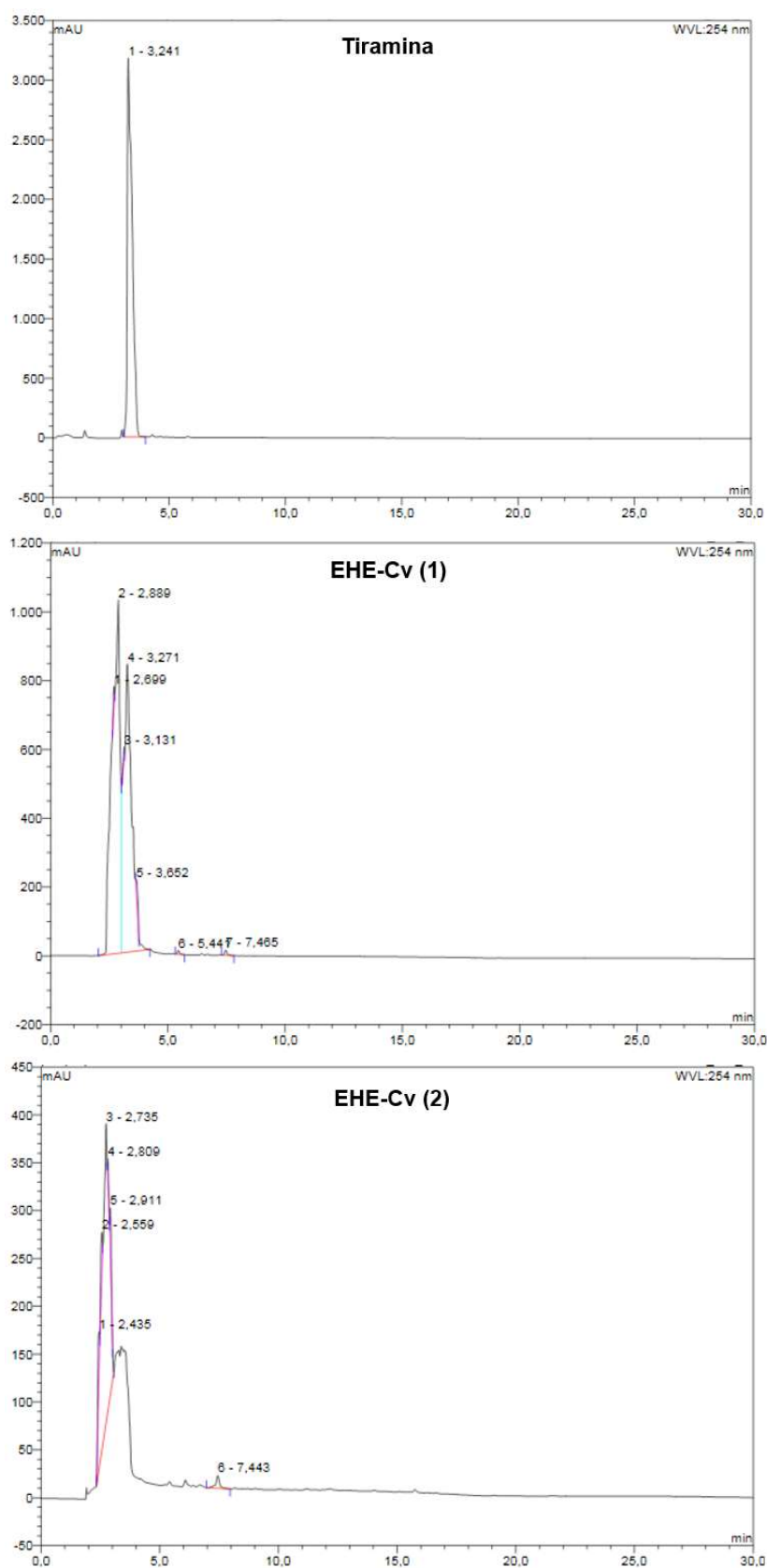
Fonte: Autoria própria.

A ninidrina SR é comumente usada na investigação de aminoácidos ou moléculas com grupamento amino livre, onde o resultado é interpretado como positivo quando originada uma coloração azul-violácea, conhecida como “púrpura de Ruhemann”, porém, existem descrições sobre o aparecimento de colorações amarelas e vermelhas (BRASIL, 2019; CHAVES, 1997; DE AZEREDO, 2004; EBEL e ROTH, 1991). As bandas avermelhadas com R_f de 0,50 encontradas (Quadro 02, letra B) indicam que EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2) possuem substâncias dotadas de grupamentos amino livres com polaridades muito próximas.

Os perfis químicos ligeiramente distintos apresentados por EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2) na placa cromatográfica revelada com anisaldeído sulfúrico (Quadro 02, letra A) permitem sugerir a existência de variações na composição química dos extratos, como uma provável maior presença de flavonoides em EHE-Cv (1) (BRASIL, 2019; ARNHOLD e TISSOT-SQUALLI, 2016). Tal achado remete a ideia de que, dentro do intervalo de dois meses entre as coletas da matéria-prima vegetal, o qual abrangeu uma transição entre estações do ano, provavelmente ocorreram modificações em fatores, como temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, incidência de luz solar, poluição atmosférica, ataque de herbívoros e patógenos, e ritmo circadiano próprio da espécie vegetal, condições que podem ter impactado positiva ou negativamente na síntese de determinadas classes de metabólitos secundários por parte de *Cissus verticillata* (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Com a realização da CLAE-UV, foram obtidos os cromatogramas relativos à tiramina, EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2), onde foi possível observar que os picos dos cromatogramas dos extratos eluem muito próximo do tempo de retenção da tiramina ($R_t = 3,241$ min), porém, tal achado não garante uma confirmação da presença ou ausência do metabólito nas preparações (Figura 08). Os picos com baixa resolução cromatográfica identificados com a CLAE-UV de EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2) (Figura 08) complementam a ideia da presença de substâncias dotadas de grupamentos amino livres nos extratos, pois, esses grupamentos tendem a desenvolver interações intermoleculares mais fracas com compostos de natureza apolar. Em condições cromatográficas de fase reversa (como aquela assegurada pelo uso de coluna de sílica C18), substâncias com menor afinidade pela fase estacionária acabam eluindo mais rapidamente e apresentando valores de t_R menores (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2010).

Figura 08. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV de tiramina, EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2) em 254 nm.



Fonte: Autoria própria.

Otimizações na fase móvel, fluxo e volume de injeção foram feitas, mas, sem sucesso, indicando que uma melhor separação de picos poderia ser atingida modificando a composição da fase estacionária com especificidade para separação de aminoácidos, o que não foi realizado devido à falta de materiais disponíveis. Desse modo, não foi possível afirmar se a tiramina fez-se ou não presente em EHE-Cv (1) e EHE-Cv (2), pois, a falta de separações apropriadas entre os picos não permitiu a realização de comparações confiáveis entre os valores de t_R obtidos.

4.3. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

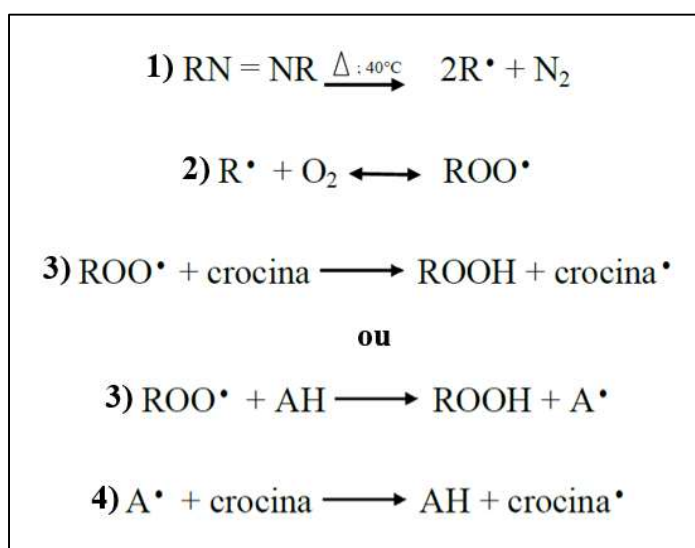
In vivo, um dos principais alvos das EROs são as membranas biológicas, que são compostas por bicamadas de fosfolipídios e, por isso, tornam-se suscetíveis ao processo lipoperoxidação, o qual é capaz de provocar modificações na estrutura e na função dessas biomembranas, caso o mesmo ocorra de maneira descontrolada, o que está associado ao desencadeamento de muitas doenças (BARRERA, 2016; LÚCIO et al., 2009).

Uma consequência da lipoperoxidação em meio aerado é a formação do radical peroxil ($ROO^{\bullet}$). Devido à relevância da lipoperoxidação *in vivo*, vários sistemas-modelo *in vitro* foram desenvolvidos para simular essa reação, permitindo, portanto, a avaliação da atividade antioxidante frente tal processo. O *bleaching* da crocina é um exemplo desses sistemas-modelo *in vitro*, no qual a capacidade antioxidante é analisada através da inibição do clareamento (*bleaching*) da respectiva substância, quando a mesma é submetida a um meio reacional dotado de um composto que gera radicais livres (ASSIS, 2012; BORS, MICHAEL e SARAN, 1984).

O $ROO^{\bullet}$ abstrai um átomo de hidrogênio da estrutura da crocina, que adquire um elétron desemparelhado e, conseqüentemente, perde seu sistema de duplas ligações conjugadas, o que se reflete em seu clareamento, ou seja, a diminuição de sua absorbância no intervalo de comprimento de onda da luz visível. Dessa maneira, os antioxidantes disputam com a crocina pelos radicais $ROO^{\bullet}$ e, por consequência, a inibição de sua oxidação é decorrente da capacidade das amostras em capturar as espécies radicalares ($ROO^{\bullet}$) (Figura 09) (ASSIS, 2012; ORDOUDI e TSIMIDOU, 2006). Tal evento é representado pelos gráficos das razões entre as velocidades de

descolorimento da crocina na ausência ou presença de agentes antioxidantes (V_0/V) *versus* as razões entre as concentrações de amostras e de crocina ($[A]/[C]$), cujas regressões lineares geram coeficientes angulares que expressam as capacidades antioxidantes das amostras (Figura 10). Quanto maior o valor do coeficiente angular, mais eficiente é a ação antioxidante.

Figura 09. Esquema de reações envolvidas no clareamento da crocina com a termólise do AAPH.

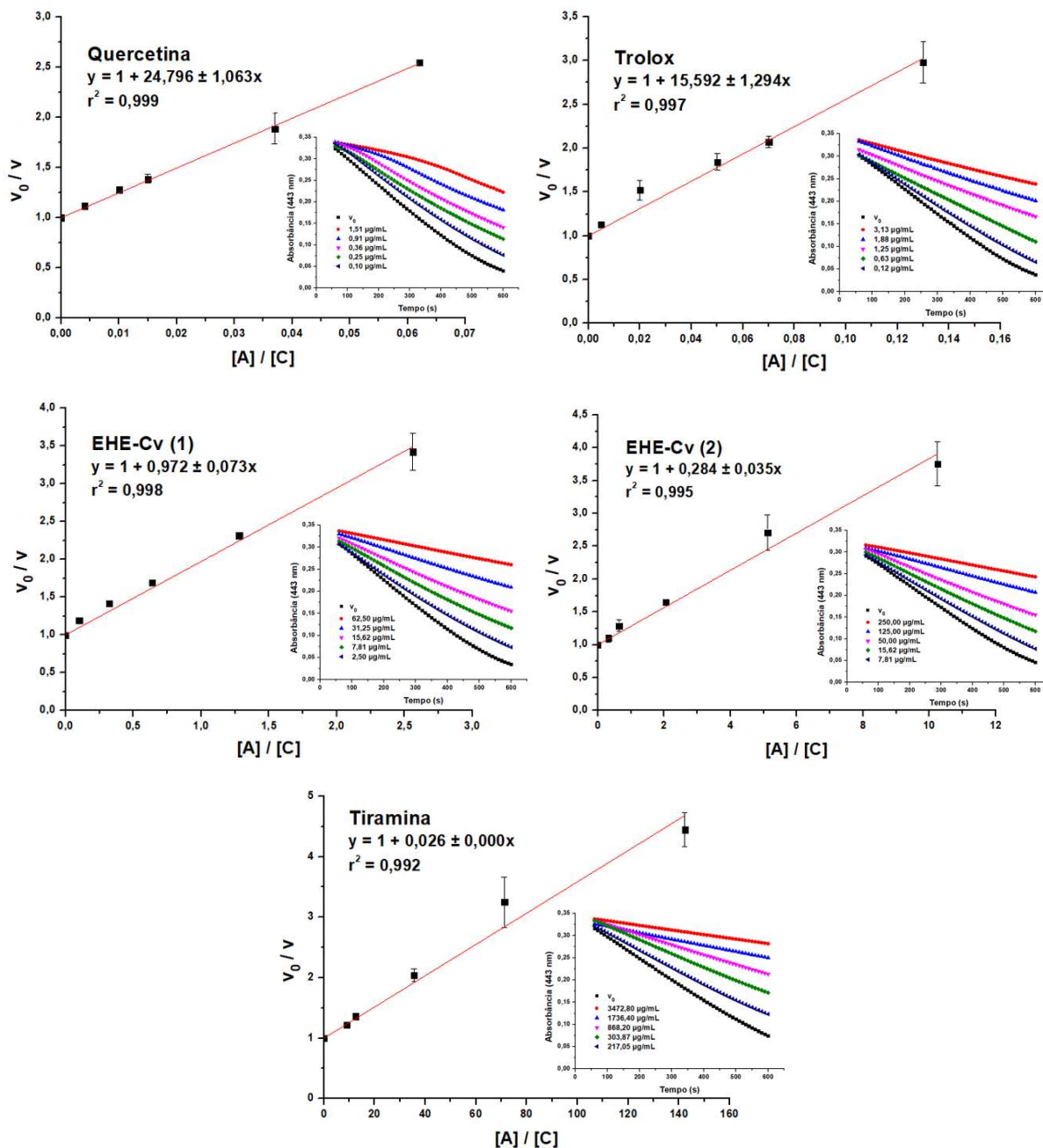


RN = NR, azocomposto AAPH; $\text{R}^\bullet$, radical livre; N_2 , nitrogênio molecular; O_2 , oxigênio molecular; $\text{ROO}^\bullet$, radical peroxil; ROOH, radical peroxil reduzido; AH, estado reduzido do antioxidante (amostra); $\text{A}^\bullet$, estado radicalar do antioxidante (amostra).

Fonte: Modificado de ASSIS et al. (2015).

Ao comparar os coeficientes angulares exibidos por cada amostra, verificou-se a seguinte ordem de atividade antioxidante: quercetina > trolox > EHE-Cv (1) > EHE-Cv (2) > tiramina (Tabela 01).

Figura 10. Representações entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com quercetina, trolox, EHE-Cv (1), EHE-Cv (2) e tiramina.



V_0 , velocidade na ausência das amostras; V , velocidade na presença de Trolox; $[C]$, concentração de crocina constante (25 $\mu\text{mol/L}$); e $[A]$, concentração das amostras. Os gráficos inseridos a direita representam a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (V_0) e presença (V) das amostras ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 01. Equação de competição cinética entre padrões e amostra

Padrões/Amostras	Equação de Competição	
	Cinética	r^2
	$y = V_0/V; x = [A]/[C]$	
Quercetina	$y = 1 + 24,796 \pm 1,063x$	0,999
Trolox	$y = 1 + 15,592 \pm 1,294x$	0,997
EHE-Cv (1)	$y = 1 + 0,972 \pm 0,073x$	0,998
EHE-Cv (2)	$y = 1 + 0,284 \pm 0,035x$	0,995
Tiramina	$y = 1 + 0,026 \pm 0,000x$	0,992

Os valores de coeficiente angular $\pm$ EPM indicam a capacidade antioxidante relativa da amostra.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os dados da Tabela 01, foram calculados os valores de equivalentes de quercetina e trolox para EHE-Cv (1), EHE-Cv (2) e tiramina (Tabela 02).

Tabela 02. Comparação entre as capacidades de captura do radical ROO^{*} em equivalentes à quercetina e trolox.

Padrões/Amostras	Equivalente de quercetina	Equivalente de trolox
Quercetina	1,000	1,590
Trolox	0,629	1,000
EHE-Cv (1)	0,039	0,062
EHE-Cv (2)	0,011	0,018
Tiramina	0,001	0,002

A equivalência aos padrões foi obtida pelo quociente das constantes de velocidade (coeficiente angular; amostra/padrões), apresentados na Tabela 01.

Fonte: Autoria própria.

Outra maneira de avaliar os resultados relacionados ao ensaio de clareamento da crocina consiste no uso do valor de porcentagem de inibição do clareamento da

crocina (%In), o qual possibilita a determinação dos valores de CE₅₀ (Tabela 03) (LUSSIGNOLI et al., 1999).

Tabela 03. Comparação entre valores de coeficiente angular e CE₅₀, para o ensaio de clareamento da crocina.

Padrões/Amostras	Coeficiente angular	CE ₅₀ * (µg/mL)
Quercetina	24,796 ± 1,063	1,11 ± 0,04
Trolox	15,592 ± 1,294	1,76 ± 0,12
EHE-Cv (1)	0,972 ± 0,073	29,98 ± 1,27
EHE-Cv (2)	0,284 ± 0,035	89,36 ± 3,89
Tiramina	0,026 ± 0,000	1058,55 ± 45,64

*Valores de CE₅₀ ± EPM, obtidos através da equação: %In = [1 - (ΔV / ΔV₀)] · 100.

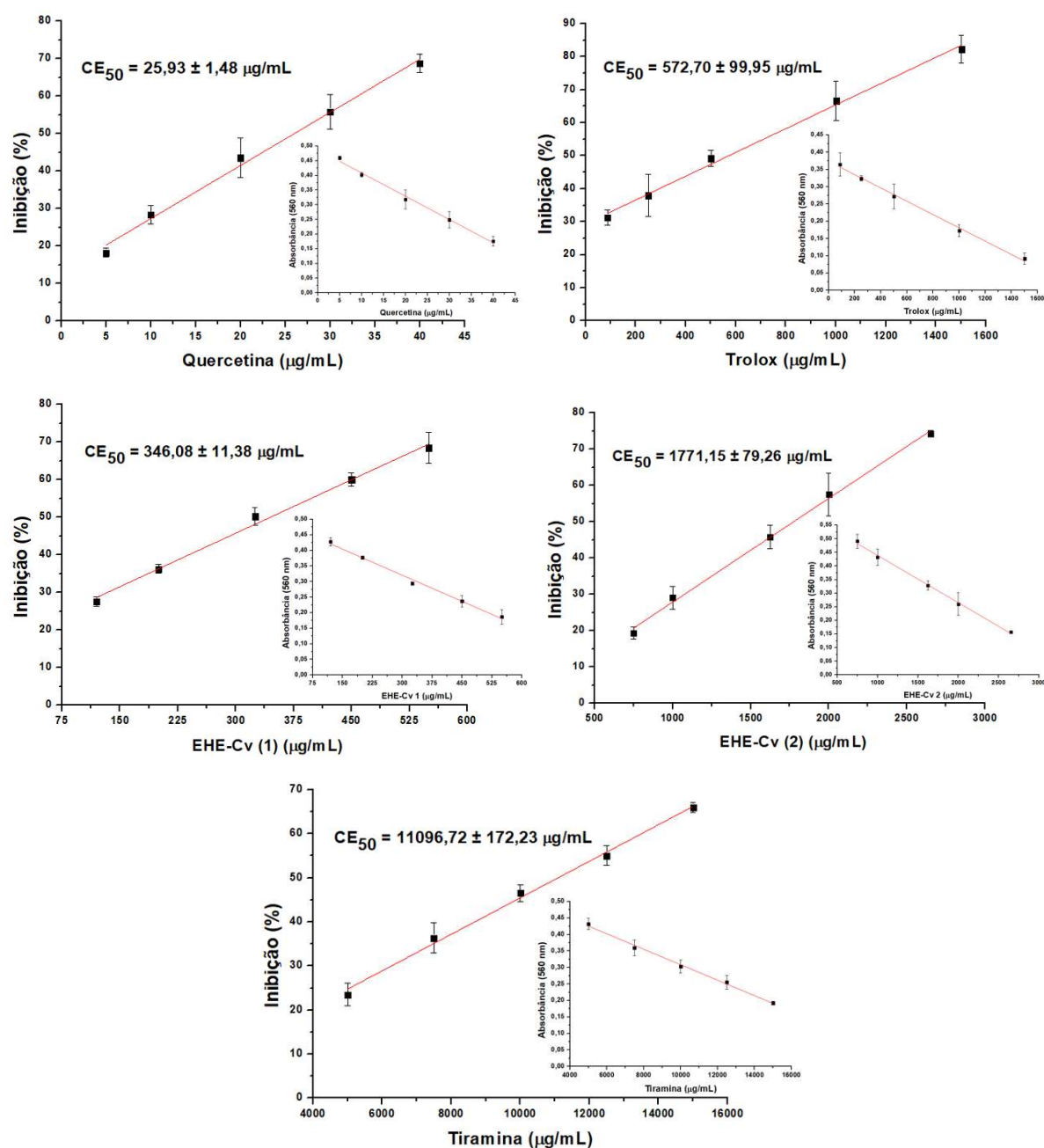
Fonte: Autoria própria.

A expressiva capacidade de inibir o clareamento da crocina, exibida por parte da quercetina e do trolox, vão ao encontro de seus já relatados potenciais antioxidantes, especialmente contra o radical ROO[•], onde Romão (2016) encontrou valores de CE₅₀ equivalentes a 1,33 e 2,61 µg/mL para as respectivas substâncias. Por outro lado, EHE-Cv (2) e a tiramina não se mostraram tão eficientes em capturar o radical ROO[•], diferente de EHE-Cv (1) que foi a amostra mais promissora, provavelmente devido à suposta presença de compostos fenólicos e bandas mais distintas observadas em CCD. A relação entre compostos fenólicos e a atividade antioxidante de preparações de *Cissus verticillata* (*Cissus sicyoides*) já foi descrita no estudo de Salazar et al. (2018), no qual folhas e caules da respectiva espécie vegetal foram utilizados para produção de extratos etanólico e hexânico que, ao serem submetidos ao teste de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) apresentaram, na devida ordem, CE₅₀ de 325,67 e 897,99 g de extrato/g de DPPH[•], valores que foram atrelados as quantidades de compostos fenólicos totais encontradas via equivalentes de ácido gálico (EAG) em cada preparação, onde o extrato etanólico exibiu 150,19 mg de

EAG/g de extrato, uma concentração superior àquela encontrada com o extrato hexânico, a qual foi 60,51 mg de EAG/g de extrato.

Mediante os resultados obtidos no ensaio de captura do radical $O_2^{\bullet-}$ (Figura 11), foi possível observar que EHE-Cv (1) apresentou uma atividade antioxidante *in vitro* inferior àquela apresentada pela quercetina e superior àquela apresentada pelo trolox. Já EHE-Cv (2) e a tiramina expressaram elevadas CE_{50} , indicando baixas atividades antioxidantes por parte dessas amostras (Figura 11).

Figura 11. Inibição (captura) do $O_2^{\cdot-}$ por quercetina, trolox, EHE-Cv (1), EHE-Cv (2) e tiramina.



As imagens inseridas a direita representam as médias das absorbâncias, a 560 nm, da formazana gerada pela redução de NBT na presença de diferentes concentrações das amostras.

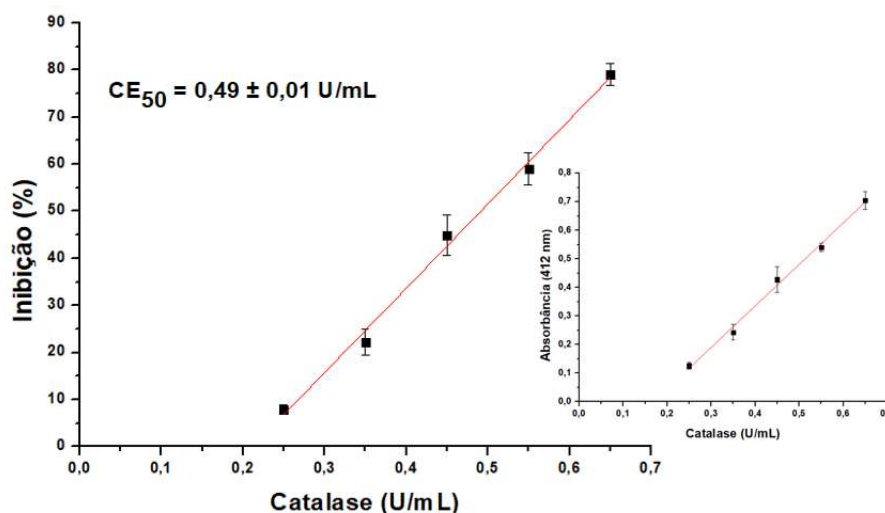
Fonte: Autoria própria.

Ao avaliar a capacidade do extrato aquoso de folhas de *Cissus verticillata* de capturar o radical $O_2^{\cdot-}$ por meio de condições parcialmente semelhantes às presentes

neste estudo, Khalil e colaboradores (2008) encontraram a CE_{50} de $60,0 \pm 2,3 \mu\text{g/mL}$, a qual se mostra aproximadamente 5,8 vezes menor do que a CE_{50} de $346,08 \pm 11,38 \mu\text{g/mL}$ obtida com EHE-Cv (1) (Figura 11). Tal diferença pode ser explicada tanto por distinções entre as metodologias executadas (por exemplo, as concentrações utilizadas de PMS e NADH, bem como o tempo de incubação para a geração da formazana), as quais conferem uma potencial maior “agressividade” por parte do sistema conduzido no presente estudo, quanto por variações entre as composições químicas dos respectivos extratos, uma hipótese presumível tendo em vista as diferentes técnicas de extração empregadas, os solventes utilizados e o considerável intervalo de tempo entre as coletas do material vegetal (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; HAZRA, BISWAS e MANDAL, 2008; KHALIL, PEPATO e BRUNETTI, 2008).

No ensaio de captura do H_2O_2 , nenhum padrão ou amostra foi capaz de capturar a espécie reativa em 50%. Quercetina e trolox foram avaliados até, respectivamente, 80 e 2000 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que concentrações mais elevadas geravam interferências exacerbadas no sinal analítico detectado, motivo que também limitou as avaliações de EHE-Cv (1), EHE-Cv (2) e tiramina em concentrações de até, respectivamente, 1000, 1500 e 15000 $\mu\text{g/mL}$. Para validar o método, utilizou-se a enzima CAT, devido às suas conhecidas eficiência e especificidade em catalisar a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio (PISOSCHI et al., 2021; SMITH, MARKS e LIEBERMAN, 2007). Desse modo, preparou-se uma solução de trabalho com concentração de 20 unidades/mL (U/mL) de CAT, tendo como base a concentração de 2950 U/mg de sólidos designada pelo fabricante. Ao considerar a massa molecular de 240.000 Da determinada por Budavari et al. (2006), foi possível converter o valor obtido de CE_{50} equivalente a $0,49 \pm 0,01 \text{ U/mL}$ (Figura 12) para $0,17 \pm 0,00 \mu\text{g/mL}$.

Figura 12. Inibição (captura) do H_2O_2 pela catalase (CAT).



A figura inserida a direita representa a média das absorbâncias, 412 nm, do TNB na presença de diferentes concentrações de catalase.

Fonte: Autoria própria.

4.4. Efeitos de EHE-Cv (1) nas mudanças em biomarcadores de glicação em sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica

Através de sistemas-modelo *in vitro* de glicação proteica, torna-se possível mimetizar algumas etapas da glicação de proteínas que ocorre em condições de hiperglicemia *in vivo*, além de permitir o estudo (tipo *screening*) do potencial antiglicação e/ou anti-AGE de promissores compostos e/ou preparações (HSIA et al., 2013; SIDDIQUI et al., 2016).

A albumina sérica humana (HSA) é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, e possui a capacidade de reagir com a glicose de modo dez vezes mais rápido quando comparada à capacidade da hemoglobina. Os resíduos dos aminoácidos arginina, lisina e cisteína presentes na estrutura da HSA são os mais susceptíveis à glicação, a qual é responsável por aumentar o peso molecular da proteína e conferir uma maior exposição de seus sítios hidrofóbicos ao solvente (ARASTEH et al., 2016). Por apresentar um tempo de vida de aproximadamente 21 dias, a albumina glicada é considerada um marcador de estados hiperglicêmicos recentes (ARASTEH et al., 2016), tal como anteriormente descrito. Por sua vez, a

albumina sérica bovina (BSA) (que possui homologia de sequência de aminoácidos de 76% com a HSA) é mais utilizada em sistemas-modelo *in vitro* de glicação proteica, via incubação com agentes que promovem a geração de AGEs (ARASTEH et al., 2016; HSIA et al., 2013; SIDDIQUI et al., 2016).

Considerando os seguintes resultados: (i) as análises cromatográficas visando a detecção da tiramina em EHE-Cv (1) e em EHE-Cv (2) foram inconclusivas, e (ii) EHE-Cv (2) e a tiramina demonstraram atividades antioxidantes *in vitro* significativamente baixas, a fim de evitar gastos excessivos de reagentes, optou-se por avaliar o potencial antiglicação *in vitro* somente de EHE-Cv (1).

Por meio da análise dos espectros de absorção e de emissão (Anexos 02 a 09), verificou-se que EHE-Cv (1), nas três concentrações estudadas e durante todo o período de incubação, não apresentou perfis de resposta que remetesse à possibilidade de ocorrências de interferências significativas nos sinais analíticos monitorados espectrofluorimetricamente.

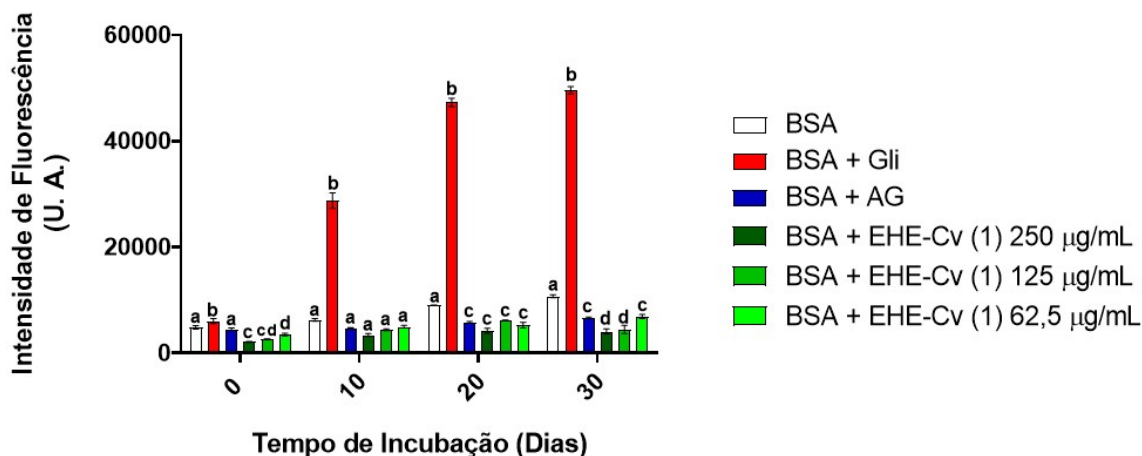
Nas incubações de BSA conduzidas na ausência de glicose, porém, na presença de AG ou de EHE-Cv (1), em todas as concentrações estudadas do extrato e em todos os tempos analisados, não foram observados aumentos nos valores de fluorescência relativa aos AGEs, em comparação aos valores de fluorescência da condição BSA incubada sozinha (Figura 13), demonstrando que os constituintes de EHE-Cv (1) não promoveram reações que resultassem na geração dos AGEs.

Nas incubações de BSA conduzidas na presença de glicose, em todos os tempos estudados e em comparação às incubações de BSA sozinha, foram observados aumentos na fluorescência relativa aos AGEs, em todas as condições: BSA + Gli, BSA + Gli + AG, BSA + Gli + EHE-Cv (1) 62,5 µg/mL, BSA + Gli + EHE-Cv (1) 125 µg/mL e BSA + Gli + EHE-Cv (1) 250 µg/mL (Figura 14). Na condição BSA + Gli, foram observados aumentos de 4,6 vezes (10 dias), 5,2 vezes (20 dias) e 4,6 vezes (30 dias) na fluorescência de AGEs, em comparação com a condição BSA sozinha (Figura 14).

Ao comparar a condição BSA + Gli + AG com a condição BSA + Gli, nota-se que a presença de AG reduziu a formação de AGEs fluorescentes, em 62% no dia 10, em 54% no dia 20 e em 41% no dia 30 (Figura 14). Esses resultados eram algo esperado, pois a AG é uma substância que inibe a formação de AGEs ao sequestrar os

intermediários dicarbonílicos reativos gerados no curso de sua formação (KHALIFAH, BAYNES e HUDSON, 1999).

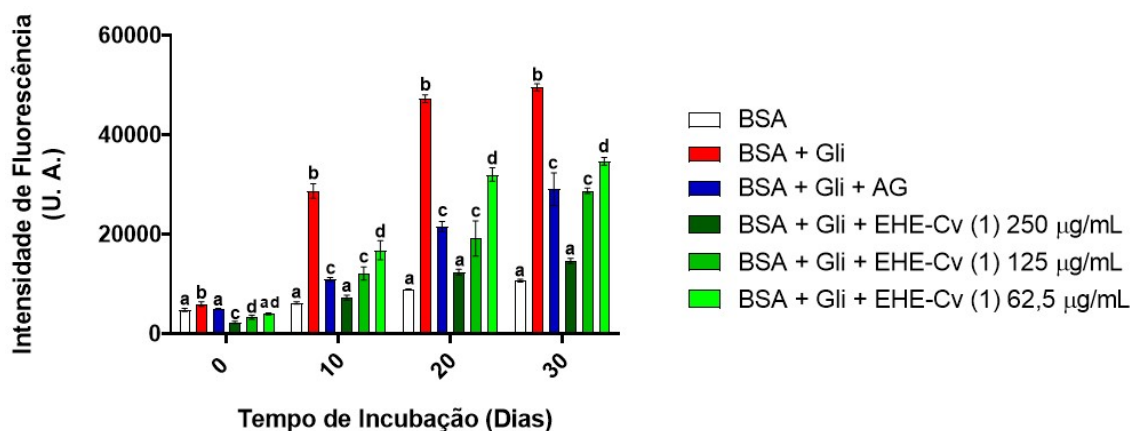
Figura 13. Efeitos das diferentes concentrações de EHE-Cv (1) na formação de AGEs fluorescentes em condições de incubação de BSA na ausência de glicose.



Os valores são expressos como média $\pm$ EPM de valores obtidos a partir de ensaios conduzidos em triplicata. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas se $p < 0,05$ e foram analisadas com One-way ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls. Médias que não compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas.

Fonte: Autoria própria.

Figura 14. Efeitos das diferentes concentrações de EHE-Cv (1) na formação de AGEs fluorescentes em condições de incubação de BSA na presença de glicose.



Os valores são expressos como média $\pm$ EPM de valores obtidos a partir de ensaios conduzidos em triplicata. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas se $p < 0,05$ e foram analisadas com One-way ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls. Médias que não compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas.

Fonte: Autoria própria.

Entre 10 e 30 dias de incubação, a adição de EHE-Cv (1) nas incubações de BSA + Gli garantiu as seguintes porcentagens de inibição na formação de AGEs fluorescentes, em comparação aos valores de AGEs encontrados na condição BSA + Gli:

- BSA + Gli + EHE-Cv (1) 62,5 µg/mL $\rightarrow$ dia 10 $\cong$ 41% / dia 20 $\cong$ 32% / dia 30 $\cong$ 30%;
- BSA + Gli + EHE-Cv (1) 125 µg/mL $\rightarrow$ dia 10 $\cong$ 57% / dia 20 $\cong$ 59% / dia 30 $\cong$ 42%;
- BSA + Gli + EHE-Cv (1) 250 µg/mL $\rightarrow$ dia 10 $\cong$ 74% / dia 20 $\cong$ 74% / dia 30 $\cong$ 70%.

O efeito anti-AGE demonstrado por EHE-Cv (1) pode ser explicado por sua composição química constituída de metabólitos que podem ter sido extraídos das folhas de *Cissus verticillata*. Dentre esses metabólitos, destacam-se os flavonoides rutina, quercetina e kaempferol, bem como certas moléculas derivadas deles (especialmente derivados glicosilados), cuja ocorrência em partes aéreas de *Cissus verticillata* é descrita na literatura (DIAS et al., 2017; SALAZAR et al., 2019; XU et al.,

2009). Além disso, um estudo demonstrou que estes flavonoides (na concentração de 100 μ M), ao serem incubados sob condições estéreis com 50 mg/mL de BSA na presença de 0,5 M de glicose, em tampão fosfato (1,5 M, pH 7,4), a 37°C por 7 dias, garantiram porcentagens de inibição na geração de AGEs fluorescentes iguais a, respectivamente, 86%, 79% e 69% (WU e YEN, 2005). Resultados similares foram obtidos por Dias et al. (2021), onde, em condições experimentais praticamente idênticas àsquelas descritas no item 3.4 do presente estudo, constatou-se que a presença de 100 μ M de rutina inibiu a geração de AGEs fluorescentes em 80%, enquanto que 100 μ M de quercetina garantiu uma inibição de 45%.

Ademais, vale a pena ressaltar que, em estudos recentes com modelos *in vivo*, tem sido demonstrado que diferentes flavonoides, além de prevenirem o acúmulo de AGEs em diferentes tecidos, também estão associados a promoção de uma menor expressão de RAGE, o que se reflete em uma atenuação das consequências do estresse glico-oxidativo (ZHOU et al., 2020).

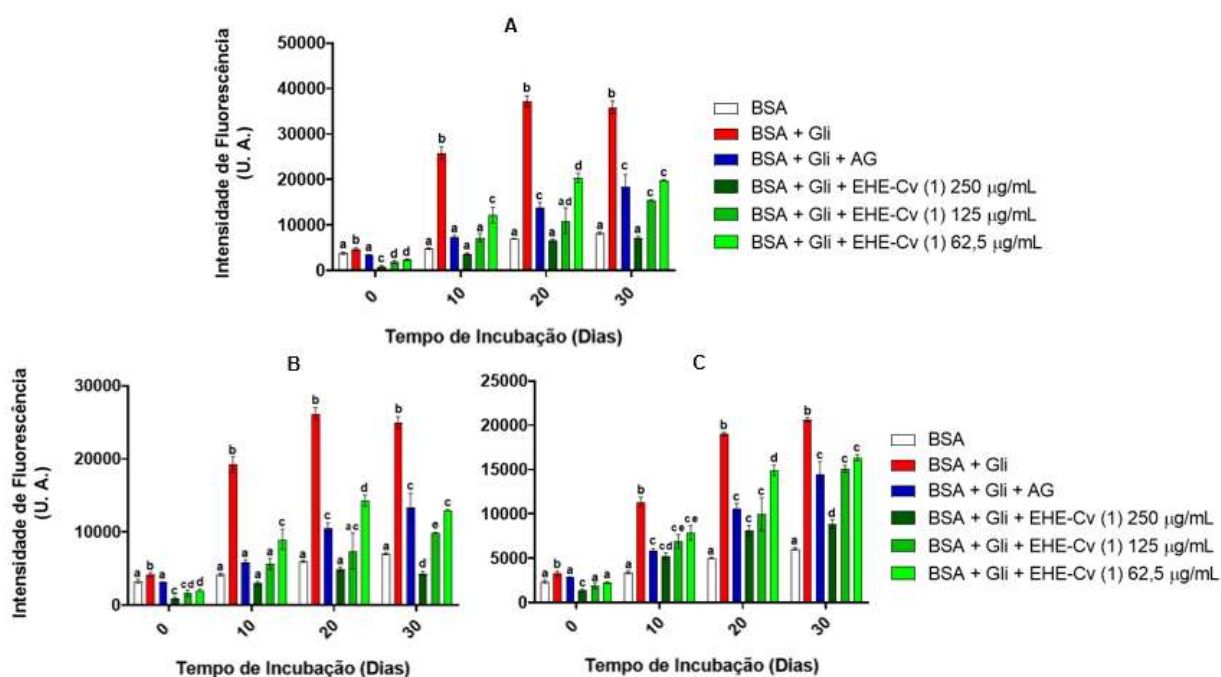
O resveratrol é um polifenol encontrado em partes aéreas de *Cissus verticillata* (LUCENA et al., 2010; SILVA et al., 2007). O mesmo desempenha uma expressiva capacidade de inibir a geração de AGEs, conforme apontado por Shen e colaboradores (2017), que conduziram dois sistemas-modelo de glicação proteica *in vitro*, o primeiro envolvendo BSA (60 mg/mL) incubada com frutose (1,5 M) em tampão fosfato (0,2 M, pH 7,4) a 50°C por 24 horas, e o segundo usou-se BSA (60 mg/mL) incubada com metilglioxal (60 mM) em tampão fosfato (0,2 M, pH 7,4) a 37°C por 2 horas. Em ambos os sistemas-modelo de glicação proteica *in vitro*, a presença de 300 μ g/mL de resveratrol assegurou porcentagens de inibição na geração de AGEs fluorescentes equivalentes a, aproximadamente, 58% e 86%, na devida ordem. Logo, a eventual presença desse metabólito secundário também pode explicar efeito anti-AGE apresentado por EHE-Cv (1).

A glicação proteica favorece a promoção de danos oxidativos, onde a oxidação dos resíduos de aminoácidos em proteínas que ocorre naturalmente em condições fisiológicas torna-se mais acelerada em indivíduos diabéticos (MEEPROM et al., 2013). O monitoramento das intensidades de fluorescência de ditirosina, *N'*-formilquinurenina e quinurenina foi utilizado como meio de avaliação das alterações

oxidativas dos resíduos de aminoácidos de tirosina e triptofano, respectivamente, na molécula de BSA incubada com glicose (Figura 15).

Durante os 30 dias de avaliação, a formação desses marcadores da oxidação de resíduos de aminoácidos exibiu um perfil praticamente idêntico àquele apresentado pelos AGEs fluorescentes, ou seja, a partir do dia 10, a presença de glicose induziu um aumento na fluorescência desses marcadores, o qual foi reduzido nas condições BSA + Gli + AG, BSA + Gli + EHE-Cv 1 62,5 µg/mL, BSA + Gli + EHE-Cv 1 125 µg/mL e BSA + Gli + EHE-Cv 1 250 µg/mL (Figura 15).

Figura 15. Efeitos das diferentes concentrações de EHE-Cv (1) na formação de ditirosina (A), *N'*-formilquinurenina (B) e quinurenina (C) em condições de incubação de BSA na presença de glicose.

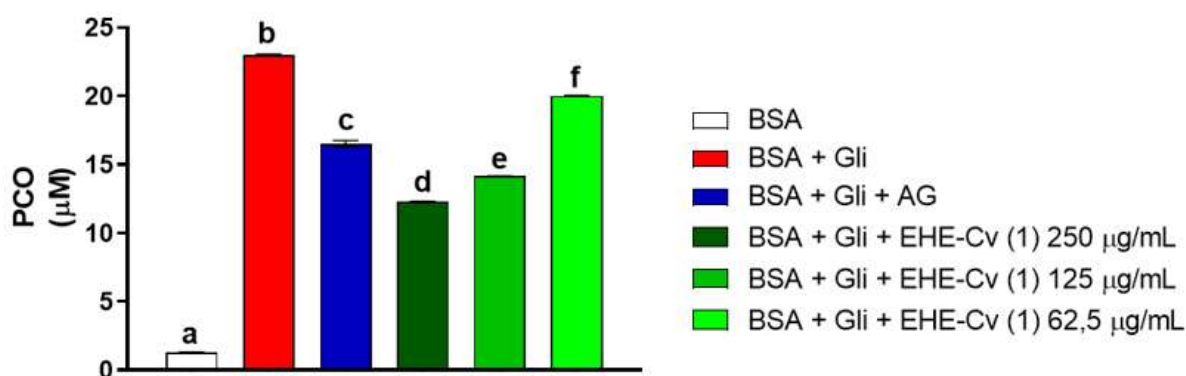


Os valores são expressos como média $\pm$ EPM de valores obtidos a partir de ensaios conduzidos em triplicata. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas se $p < 0,05$ e foram analisadas com One-way ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls. Médias que não compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas.

Fonte: Autoria própria.

Corroborando os achados referentes à formação de marcadores de oxidação de resíduos de aminoácidos, a quantificação de proteínas carboniladas (PCO) das amostras após 30 dias de incubações indicou que tanto a AG quanto o extrato EHE-Cv (1) nas três concentrações estudadas foram capazes de diminuir os danos oxidativos proporcionados pelas elevadas concentrações de glicose no sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* contendo BSA + glicose, os quais se refletem diretamente nos níveis de PCO (Figura 16) (CHAUDHURI et al., 2018; LEVINE et al., 1994). Nota-se que EHE-Cv (1), nas concentrações de 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$, impediu a formação de grupos carbonilas na estrutura da BSA de modo mais expressivo do que a AG (Figura 16).

Figura 16. Efeitos das diferentes concentrações de EHE-Cv (1) nos níveis de proteínas carboniladas em sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



Os valores são expressos como média $\pm$ EPM de valores obtidos a partir de ensaios conduzidos em triplicata. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas se $p < 0,05$ e foram analisadas com One-way ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls. Médias que não compartilham a mesma letra apresentam diferenças estatísticas.

Fonte: Autoria própria.

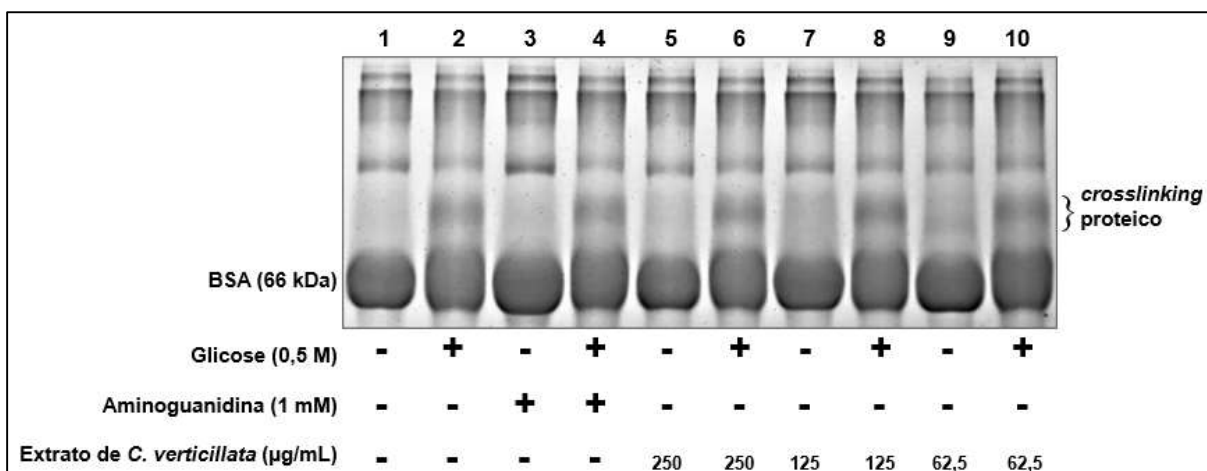
Além do desenvolvimento de danos glico-oxidativos, outra consequência dos eventos de glicação proteica é a formação de ligações cruzadas em proteínas, intracadeia polipeptídica ou entre diferentes proteínas (*cross-link* proteico), as quais costumam envolver em especial os resíduos dos aminoácidos arginina e lisina (HSIA,

et al., 2016; VISTOLI et al., 2013). Dessa forma, o *cross-link* proteico foi avaliado com amostras de incubações contendo BSA, após 30 dias.

Visualizou-se uma banda proteica de maior peso molecular em relação à banda de BSA, a qual poderia ser descrita como uma “sombra” ou um “espalhamento”, em todas as condições que continham glicose (Figura 17). Essa “sombra” corresponde ao *cross-link* proteico, um fenômeno frequentemente associado à estágios tardios da glicação de proteínas, onde AGEs interagem com resíduos de aminoácidos das proteínas (destaque para arginina e lisina), de modo a promover a formação de ligações covalentes cruzadas intra- e inter-proteicas, que modificam as estruturas das proteínas afetadas, as quais tendem a adquirir um maior peso molecular e, por isso, migrar mais lentamente em uma separação eletroforética em relação à proteína não glicada (FRANCO, 2018; NEMET, STRAUCH e MONNIER, 2011).

O *cross-link* proteico aparentou ser menos intenso nas linhas 4 e 6, equivalentes às incubações BSA + Gli + AG e BSA + Gli + EHE-Cv (1) 250 µg/mL, respectivamente (Figura 17). Com análise densitométrica verificou-se que as bandas de *cross-link* referentes à BSA + Gli + AG e BSA + Gli + EHE-Cv (1) 250 µg/mL apresentaram, na devida ordem, diminuições de 5% e 7% nas suas intensidades, em comparação à intensidade da banda de *cross-link* formada na condição BSA + Gli (Tabela 04).

Figura 17. Efeitos das diferentes concentrações de EHE-Cv (1) na formação de *cross-link* proteico em sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



Linhas: (1) BSA; (2) BSA + Gli; (3) BSA + AG; (4) BSA + AG + Gli; (5) BSA + EHE-Cv (1) 250 µg/mL; (6) BSA + Gli + EHE-Cv (1) 250 µg/mL; (7) BSA + EHE-Cv (1) 125 µg/mL; (8) BSA + Gli + EHE-Cv (1) 125 µg/mL; (9) BSA + EHE-Cv (1) 62,5 µg/mL; (10) BSA + Gli + EHE-Cv (1) 62,5 µg/mL.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 04. Análise densitométrica das bandas referentes ao *cross-link* proteico nas amostras após 30 dias de incubação.

Condição/linha correspondente no gel	Intensidade da tonalidade de cinza
BSA + Gli	31218,024 (100,00%)
BSA + Gli + AG	29586,368 (94,77%)
BSA + Gli + EHE-Cv (1) 250 µg/mL	28980,125 (92,83%)
BSA + Gli + EHE-Cv (1) 125 µg/mL	30945,974 (99,13%)
BSA + Gli + EHE-Cv (1) 62,5 µg/mL	30979,146 (99,23%)

A condição BSA + Gli foi considerada como 100%.

Fonte: Autoria própria.

A discreta inibição na formação de *cross-link* proteico assegurada por EHE-Cv (1) 250 µg/mL (Figura 17; Tabela 04) tende a ser justificada pela provável maior proporção de flavonoides presentes na composição da amostra, uma hipótese presumida com base nos achados de Urios e colaboradores (2007), onde, ao serem

incubados com incubados com 9 mg/mL de colágeno e 250 mM de glicose, em tampão fosfato (200 mM, pH 7,4), a 37°C por 28 dias, 25 µM de quercetina e rutina promoveram em torno de, respectivamente, 63% e 48% de redução na geração de pentosidina (exemplo de AGE responsável pela formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas de colágenos e outras proteínas).

Reforçando a ideia da capacidade que a quercetina e a rutina possuem em inibir o *cross-link* proteico, no estudo de Dias et al. (2021) identificou-se que, ao serem submetidas a uma eletroforese em gel tipo SDS-PAGE (10%), amostras de BSA (10 mg/mL) incubada na presença de glicose (0,5 M) e 100 µg/mL de quercetina ou rutina em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), a 37°C por 30 dias apresentaram a formação de *cross-link* proteico com intensidades inferiores às aquelas exibidas por parte das amostras de BSA incubada com glicose na ausência desses flavonoides. O *cross-link* proteico formado na condição BSA + Gli + 100 µg/mL de rutina foi visualmente mais fraco do que o *cross-link* gerado na condição BSA + Gli + 100 µg/mL de quercetina (DIAS et al., 2021).

Ademais, um raciocínio similar pode ser empregado com o resveratrol, que, mediante o desenvolvimento de uma eletroforese em gel tipo SDS-PAGE (10%) com amostras de uma incubação envolvendo BSA (60 mg/mL) na presença de frutose (1,5 M) e diferentes concentrações do respectivo polifenol (5, 10, 15, 20 e 30 mg/mL) em tampão fosfato (0,2 M, pH 7,4), a 50°C por 24 horas, o resveratrol demonstrou ser capaz de inibir a formação de *cross-link* proteico em todas as condições estudadas (SHEN, XU e SHENG, 2017).

Dessa forma, levando em consideração todos os resultados encontrados, constata-se que o extrato bruto hidroetanólico de folhas de *Cissus verticillata* (1) apresentou expressivos potenciais antioxidante e antiglicação *in vitro*, os quais estão relacionados à composição química da preparação, provavelmente dotada de flavonoides e/ou compostos fenólicos, informações que agregam às pesquisas referentes às capacidades terapêuticas que a respectiva planta possui contra o DM.

5. Conclusão

As condições de cultivo da *Cissus verticillata* impactam diretamente na síntese de metabólitos secundários que foram extraídos de suas folhas. Dentre esses metabólitos, não foi possível confirmar a presença de tiramina. Variações no conteúdo de metabólitos secundários extraídos implicaram em diferentes perfis de atividade antioxidante *in vitro* por parte das preparações obtidas. EHE-Cv (1) apresentou uma maior atividade antioxidante *in vitro* quando comparado a EHE-Cv (2), possivelmente devido a maior quantidade de flavonoides em sua composição.

Tendo em vista as fracas respostas exibidas por EHE-Cv (2) e pela tiramina no âmbito de captura de EROs, tais amostras foram consideradas como pouco promissoras e inaptas a desenvolverem expressivos potenciais antiglicação. Dessa forma, decidiu-se prosseguir com a análise do potencial antiglicação *in vitro* apenas de EHE-Cv (1).

Através do estudo envolvendo o sistema modelo de glicação proteica *in vitro*, constatou-se que EHE-Cv (1) apresentou um significativo potencial antiglicação, o qual seguiu um perfil dependente de concentração e pode ser atrelado a certos flavonoides e/ou compostos fenólicos extraídos das folhas de *Cissus verticillata*. Tal achado avança nas evidências acerca das propriedades antidiabéticas dessa espécie vegetal, indicando uma possível eficácia de preparações da planta no combate aos eventos deletérios associados ao estresse glico-oxidativo.

6. Referências

AGUIAR, C. C. T. et al. Instrumentos de avaliação de qualidade de vida relacionada à saúde no diabetes melito. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, p. 931 - 939, 2008.

ANDRIOLO, A.; VIEIRA, J. G. H. Diagnóstico e acompanhamento laboratorial do diabetes mellitus. In: **Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar UNIFESP/Escola Paulista de Medicina**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2008. p. 37 - 42.

ANSARALI, S. et al. Review on phytochemical and pharmacological activities of the genus *Cissus* Linn. **International Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 4, p. 1 - 7, 2016.

ARASTEH, A. et al. Glycated albumin: An overview of the *in vitro* models of an *in vivo* potential disease marker. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 13, n. 1, p. 49 - 58, 2014.

ARNHOLD, A. L.; TISSOT-SQUALLI, M. L. Análise preliminar por cromatografia em camada delgada dos extratos da fração hexânica das folhas de três espécies de Eriocaulaceae Mart. In: **XXIV Seminário de Iniciação Científica**, UNIJUÍ, 2016.

ASSIS, R. P. **Efeito dos solutos urêmicos sobre espécies reativas de oxigênio em sistemas-modelo *in vitro***. 2012. 93f. Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

ASSIS, R. P. et al. Effects of uremic solutes on reactive oxygen species *in vitro* model systems as a possibility of support the renal function management. **BMC Nephrology**, v. 16, p. 1 - 13, 2015.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.1, p. 1 - 31, 2014.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940 - 950, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000600005>. Acesso em: 06 jan. 2023.

BARRERA, G. et al. Mitochondrial dysfunction in cancer and neurodegenerative diseases: Spotlight on fatty acid oxidation and lipoperoxidation products. **Antioxidants**, v. 5, n. 1, p. 1 - 25, 2016.

BEREZIN, A. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: Achieving and perspectives. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 10, n. 2, p. 176 - 183, 2016.

BHARDWAJ, A. et al. Tyramine-producing enterococci are equally detected on tyramine production medium, by quantification of tyramine by HPLC, or by *tdc* gene-targeted PCR. **Dairy Science & Technology**, v. 89, p. 601 - 611, 2009.

BORS, W.; MICHAEL, C.; SARAN, M. Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 796, p.312 - 319, 1984.

BRAGA, T. V. **Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* Nicolson & C. E. Jarvis subsp. verticillata como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante**. 2008. 202f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6 ed. Brasília: Anvisa, 2019. v. 2 (Monografias Plantas Medicinais).

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

BUDAVARI, S. et al. **The Merck Index (An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals)**. 14. ed. Whitehouse Station, Nova Jersey, EUA: MERCK & CO., INC, 2006.

CAGAN, R. Drug screening using model systems: Some basics. **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, p. 1241 - 1244, 2016.

CEPAS, V. et al. Redox signaling and advanced glycation endproducts (AGEs) in diet-related diseases. **Antioxidants**, v. 9, n. 142, p. 1 - 20, 2020.

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

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: Uma metodologia aplicada à disciplina "Química Orgânica". **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 560 - 562, 1997.

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

COLOMBO, G. et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. **Journal of Chromatography B**, p. 1 - 13, 2015.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D. C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do diabetes mellitus em animais: Artigo de atualização. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, p. 366 - 373, 2011.

DE AMORIM, A. F. V. **Química - Métodos Cromatográficos**. 1 ed. Fortaleza, Ceará, Brasil: EdUECE, 2019.

DE AZEREDO, F. S. et al. Validação de técnica analítica em cromatografia em camada delgada comparativa para identificação de fármacos anorexígenos sintéticos em produtos fitoterápicos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, p. 17 - 24, 2004.

DIAS, D. T. M. et al. Rutin inhibits the *in vitro* formation of advanced glycation products and protein oxidation more efficiently than quercetin. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 42, p. 1 - 13, 2021.

DIAS, G. T. et al. Toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 1, p. 8 - 12, 2017.

DIL, F. A.; RANJKESH, Z.; GOODARZI, M. T. A systematic review of antiglycation medicinal plants. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 2, p. 1225 - 1229, 2019.

DINIZ, M. F. F. M. et al. Non-clinical acute and chronic toxicity evaluations of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) hydroalcoholic leaf extract. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 890 - 896, 2018.

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

EBEL, S.; ROTH, H. J. **Lexikon der Pharmazie**. 1 ed. New York: Thieme Georg Verlag, 1991. p. 704. ISBN: 978-3136722015.

EIZIRIK, D. L.; PASQUALI, L.; CNOP, M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: Different pathways to failure. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 7, p. 349 - 362, 2020.

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

FIGUEIREDO, I. D. et al. Lycopene improves the metformin effects on glycemic control and decreases biomarkers of glycoxidative stress in diabetic rats. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 13, p. 3117 - 3135, 2020.

FRANCO, P. D. A. **Avaliação temporal da formação de produtos de glicoxidação em sistema modelo *in vitro* de glicação proteica e prevenção por compostos fenólicos**. 2018. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia-Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2018.

GAZOLLA, M. C. **Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato bruto e metabólitos isolados de *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. (Asteraceae)**. 2017. 86f. Trabalho de Conclusão de Curso (Faculdade de Farmácia) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

GIANOTTI, V. et al. A new hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of seven biogenic amines in cheese. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, p. 296 - 300, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374 - 381, 2007.

GOMES, B. D. A. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste: *Cissus verticillata* L. (Vitaceae)**. 2012. 115f. Tese (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

GREGG, E. W.; SATTAR, N.; ALI, M. K. The changing face of diabetes complications. **Lancet Diabetes Endocrinology**, v. 4, p. 537 - 547, 2016.

GUTIERRES, V. O. et al. Curcumin improves the effect of a reduced insulin dose on glycemic control and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 4, p. 976 - 988, 2019.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n. 63, p. 1 - 10, 2008.

HSIA, S. M. et al. Capsaicin, an active ingredient from chilli peppers, attenuates glycativ stress and restores sRAGE levels in diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 406 - 417, 2016.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 10th ed. 2021. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>. Acesso em: 06 jan. 2023.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 21, p. 130 - 132, 1984.

KHALIFAH, R. G.; BAYNES, J. W.; HUDSON, B. G. Amadorins: Novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 257, n. 2, p. 251 - 258, 1999.

KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biological Research**, v. 41, p. 165 - 171, 2008.

KIM, W. et al. *Cissus verticillata* extract decreases neuronal damage induced by oxidative stress in HT22 cells and ischemia in gerbils by reducing the inflammation and phosphorylation of MAPKs. **Plants**, v. 10, n. 6, p. 1 - 14, 2021a.

KIM, W. et al. Extracts from the leaves of *Cissus verticillata* ameliorate high-fat diet-induced memory deficits in mice. **Plants**, v. 10, n. 9, p. 1 - 14, 2021b.

KUNKEL, H. G.; WALLENIIUS, G. New hemoglobin in normal adult blood. **Science**, v. 122, n. 3163, p. 288 - 288, 1955.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680 - 685, 1970.

LANDINO, L. M. et al. Oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid, by the biologically-relevant oxidants peroxynitrite anion, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. **Nitric Oxide**, v.18, p.11 - 18, 2008.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346 - 357, 1994.

LIMA, W. P. D. **A dosagem da frutossamina no diagnóstico do diabetes mellitus – Contribuição do estudo longitudinal de saúde do adulto (ELSA-BRASIL)**. 2018. 111f. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

LINO, C. D. S. **Efeito antidiabético, antioxidante, analgésico e anti-inflamatório da fração solúvel em metanol e tiramina isolados de *Cissus verticillata***. 2008. 190f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

LUCENA, F. R. S. et al. Cytotoxic, antitumor and leukocyte migration activities of resveratrol and sitosterol present in the hidroalcoholic extract of *Cissus sicyoides* L., Vitaceae, leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 729 - 733, 2010.

LÚCIO, M. et al. Antioxidant activity of vitamin e and trolox: Understanding of the factors that govern lipid peroxidation studies *in vitro*. **Food Biophysics**, v. 4, p. 312 - 320, 2009.

LUSSIGNOLI, S. et al. A microplate based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 38 - 44, 1999.

LYONS, T. J.; JENKINS, A. J. Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypothesis. **Diabetes Reviews**, v. 5, n. 4, p. 365 - 391, 1997.

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

MOHAJERI, S. A. et al. Extraction of crocin from saffron (*Crocus sativus*) using molecularly imprinted polymer solid-phase extraction. **Journal of separation science**, v. 33, n. 15, p. 2302 - 2309, 2010.

MONNIER, V. M.; SELL, D. R.; GENUTH, S. Glycation products as makers and predictors of the progression of diabetic complications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 567 - 581, 2005.

MORAES, J. S. et al. The use of the plant *Cissus verticillata* (insulin) in the treatment of diabetes mellitus, in a coastal community in Pará, Amazon, Brazil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 1 - 23, 2020.

MORIN, N. et al. Tyramine stimulates glucose uptake in insulin- sensitive tissues in vitro and in vivo via its oxidation by amine oxidases. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 3, p. 1238 - 1247, 2002.

MOTTA, B. P. et al. *In vitro* inhibition of protein glycation and advanced glycation end products formation by hydroethanolic extract and two fractions of *Simaba trichilioides* roots. **Natural Product Research**, v. 34, n. 16, p. 2389 - 2393, 2020.

NAVALE, A. M.; PARANJAPE, A. N. Glucose transporters: Physiological and pathological roles. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 1, p. 5 - 9, 2016.

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

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

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689 - 702, 2009.

ORDOUDI, S. A.; TSIMIDOU, M. Z.; Crocin bleaching assay (CBA) in structure-radical scavenging activity studies of selected phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9347 - 9356, 2006.

OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, p. 411 - 429, 2014.

PENNACHI, P. C. **Modulação da enzima indolamina 2,3-dioxigenase pelos AGEs (produtos finais de glicação avançada) em ratos diabéticos**. 2011. 76f. Tese (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2011.

PEPATO, M. T. et al. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, p. 15 - 20, 2003.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146 - 152, 2012.

PISOSCHI, A. M. et al. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 209, 2021.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133 - 149, 2005.

ROCHA, F. D. et al. Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, p. 49 - 54, 2006.

RODACKI, M. et al. **Classificação do diabetes**. São Paulo: Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2022. Disponível em: <https://doi:10.29327/557753.2022>. Acesso em: 06 jan. 2023. ISBN: 978-65-5941-622-6.

ROMÃO, G. B. **Estudo *in vitro* da ação de extrato hidroetanólico de *Cordia verbenacea* Dc. em espécies reativas de oxigênio de importância biológica**. 2016. 137f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2016.

ROXO, D. F. et al. Curcumin combined with metformin decreases glycemia and dyslipidemia, and increases paraoxonase activity in diabetic rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. 1 - 8, 2019.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G. Prevention of protein glycation by natural compounds. **Molecules**, v. 20, p. 3309 - 3334, 2015.

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

SALAZAR, M. A. R. et al. Chemical composition, antioxidant activity, neuroprotective and anti-inflammatory effects of cipó-pucá (*Cissus sicyoides* L.) extracts obtained from supercritical extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 138, p. 36 - 45, 2018.

SALAZAR, M. D. L. et al. Antioxidant and biological activity of *Cissus sicyoides* and *Rosmarinus officinalis* extracts. **IntechOpen**, 2019. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/65500>. Acesso em: 06 jan. 2023.

SALGADO, J. M.; MANSI, D. N.; GAGLIARDI, A. *Cissus sicyoides*: Analysis of glycemic control in diabetic rats through biomarkers. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 4, p. 722 - 727, 2009.

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

SHEN, Y.; XU, Z.; SHENG, Z. Ability of resveratrol to inhibit advanced glycation end product formation and carbohydrate-hydrolyzing enzyme activity, and to conjugate methylglyoxal. **Food Chemistry**, v. 216, p. 153 - 160, 2017.

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

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, p. 363 - 383, 2020.

SILVA, L. D. et al. Bicyclogermacrene, resveratrol and fungitoxic activity on leaves extracts of *Cissus verticillata* L. Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 361 - 367, 2007.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. Toxicidade do oxigênio e danos por radicais livres. In: **Bioquímica Médica Básica de Marks: Uma Abordagem Clínica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. Cap. 24, p. 439 - 457.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3rd ed. Hoboken, Nova Jersey, EUA: A John Wiley & Sons, Inc., 2010.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, p. 351 - 355, 2007.

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

TAKEUCHI, M. et al. Assessment of the concentrations of various advanced glycation end-products in beverages and foods that are commonly consumed in Japan. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1 - 16, 2015.

TESTA, R. et al. The “metabolic memory” theory and the early treatment of hyperglycemia in prevention of diabetic complications. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 437 - 445, 2017.

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

URIOS, P.; GRIGOROVA-BORSOS, A.; STERNBERG, M. Flavonoids inhibit the formation of the cross-linking AGE pentosidine in collagen incubated with glucose, according to their structure. **European Journal of Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 139 - 146, 2007.

UTRERA, M.; ESTÉVEZ, M. Impact of trolox, quercetin, genistein and gallic acid on the oxidative damage to myofibrillar proteins: The carbonylation pathway. **Food chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4000 - 4009, 2013.

VARVAROVSKA, J. et al. Aspects of oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus. **Biomed Pharmacother**, v. 58, n. 10, p. 539, 2004.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. D. F.; OLIVEIRA, O. M. M. D. F. Pesquisa de produtos naturais: Plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 119 - 130, 2007.

VIANA, G. S. B. et al. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacology**, v. 4, n. 9, 2004.

VISTOLI, G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): An overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47, n. 1, p. 3 - 27, 2013.

WAGHELA, B. N. et al. AGE-RAGE synergy influences programmed cell death signaling to promote cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 476, p. 585 - 598, 2021.

WU, C.; YEN, G. 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.

XU, F. et al. Structures of new flavonoids and benzofuran-type stilbene and degranulation inhibitors of rat basophilic leukemia cells from the brazilian herbal medicine *Cissus sicyoides*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 10, p. 1089 - 1095, 2009.

ZAJDENVERG, L. et al. **Rastreamento e diagnóstico da hiperglicemia na gestação**. São Paulo: Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2022. Disponível em: <https://doi:10.29327/557753.2022-11>. Acesso em: 06 jan. 2023. ISBN: 978-65-5941-622-6.

ZHANG, Y. J. et al. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 21138 - 21156, 2015.

ZHOU, Q. et al. The multifunctional roles of flavonoids against the formation of advanced glycation end products (AGEs) and AGEs-induced harmful effects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 103, p. 333 - 347, 2020.

Anexos

Anexo 01. Comprovante de cadastro da *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis no SisGen.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A109280

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A109280
Usuário:	Amanda Martins Baviera
CPF/CNPJ:	289.299.208-70
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Cissus verticillata
Cissus verticillata (L.) Nicolson & C.E. Jarvis

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Investigar o potencial antidiabético, antioxidante e antiglicação de preparações de folhas de Cissus verticillata (L.) Nicolson & C.E. Jarvis com o uso de sistemas-modelo in vivo e in vitro**

Equipe

Amanda Martins Baviera	UNESP
Felipe Nunes Cardoso	UNESP

Data do Cadastro:	15/06/2022 09:51:10
Situação do Cadastro:	Concluído

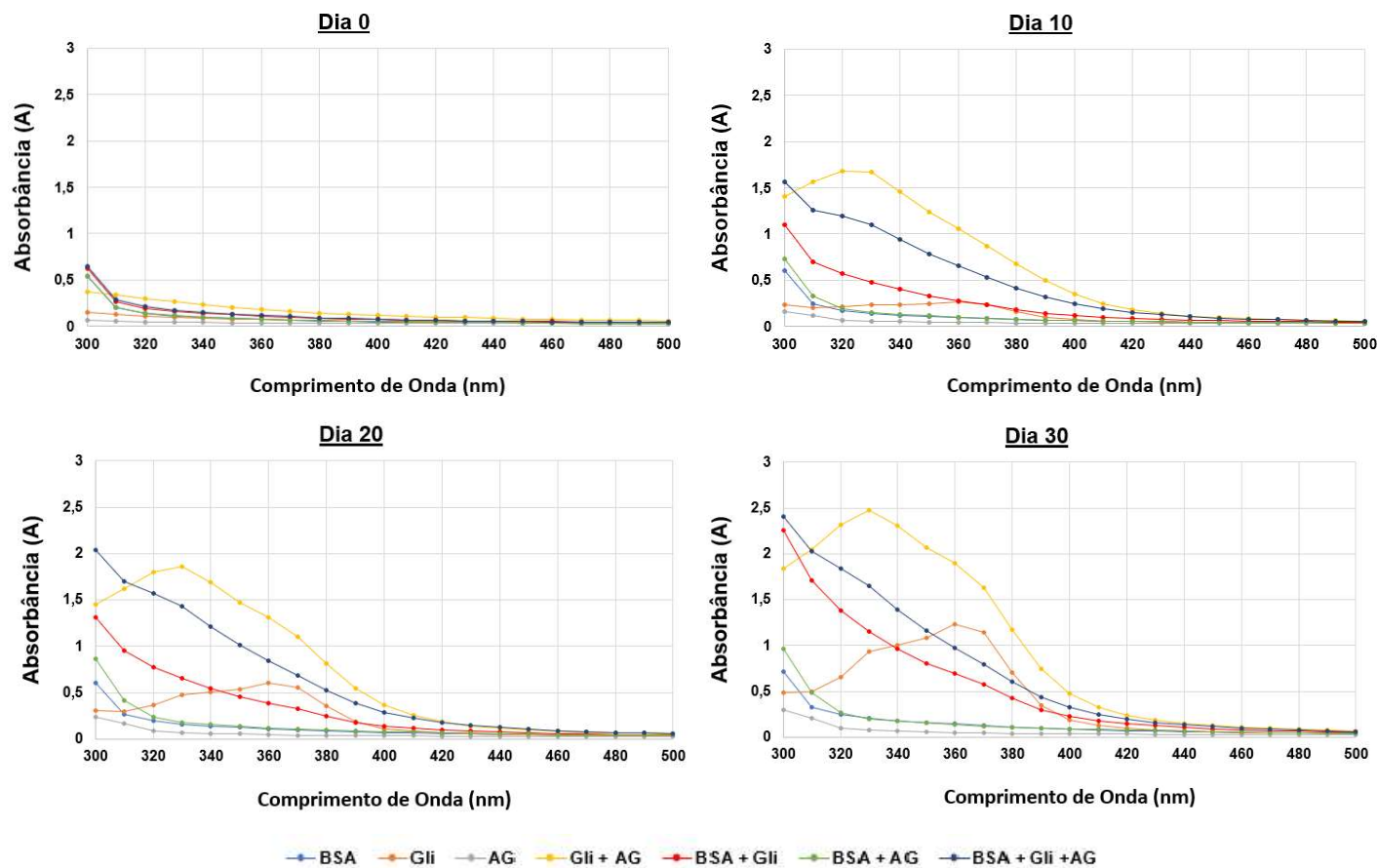
Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 9:51 de 15/06/2022.



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

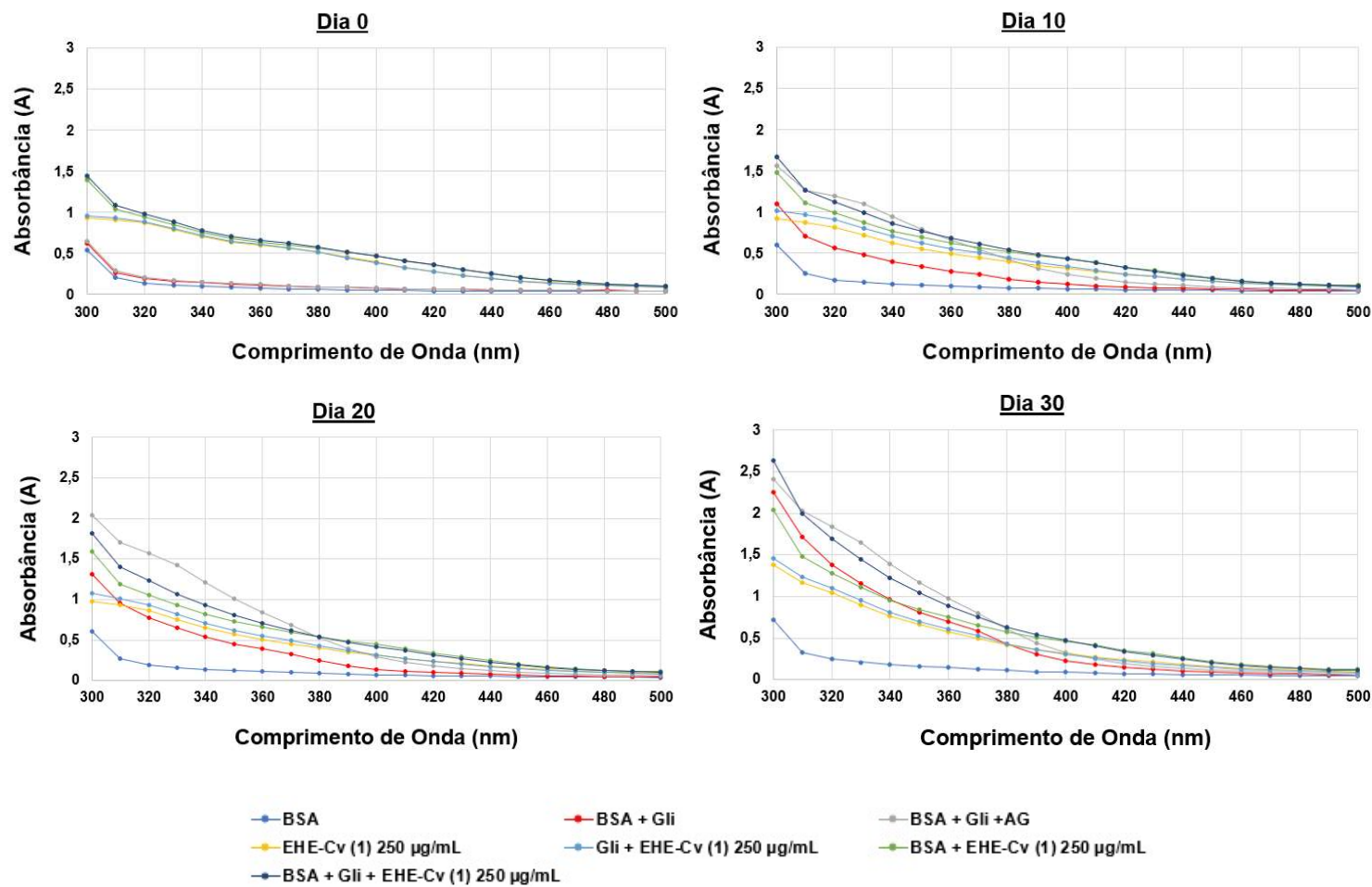
Fonte: Autoria própria.

Anexo 02. Evolução temporal de espectros de absorbância dos grupos controles envolvidos na condução do sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



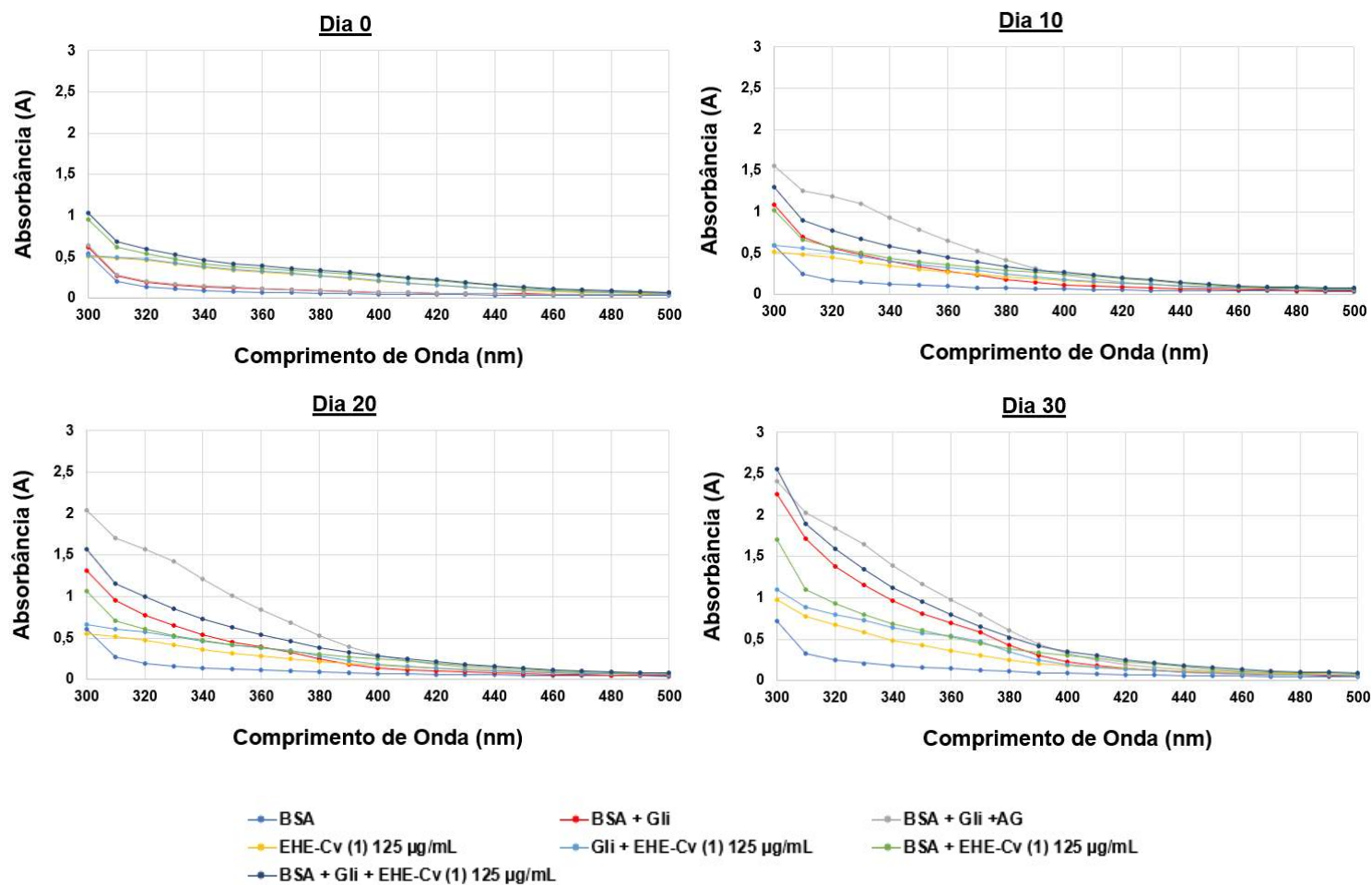
Fonte: Autoria própria.

Anexo 03. Evolução temporal de espectros de absorvância dos grupos contendo EHE-Cv (1) 250 µg/mL envolvidos na condução do sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



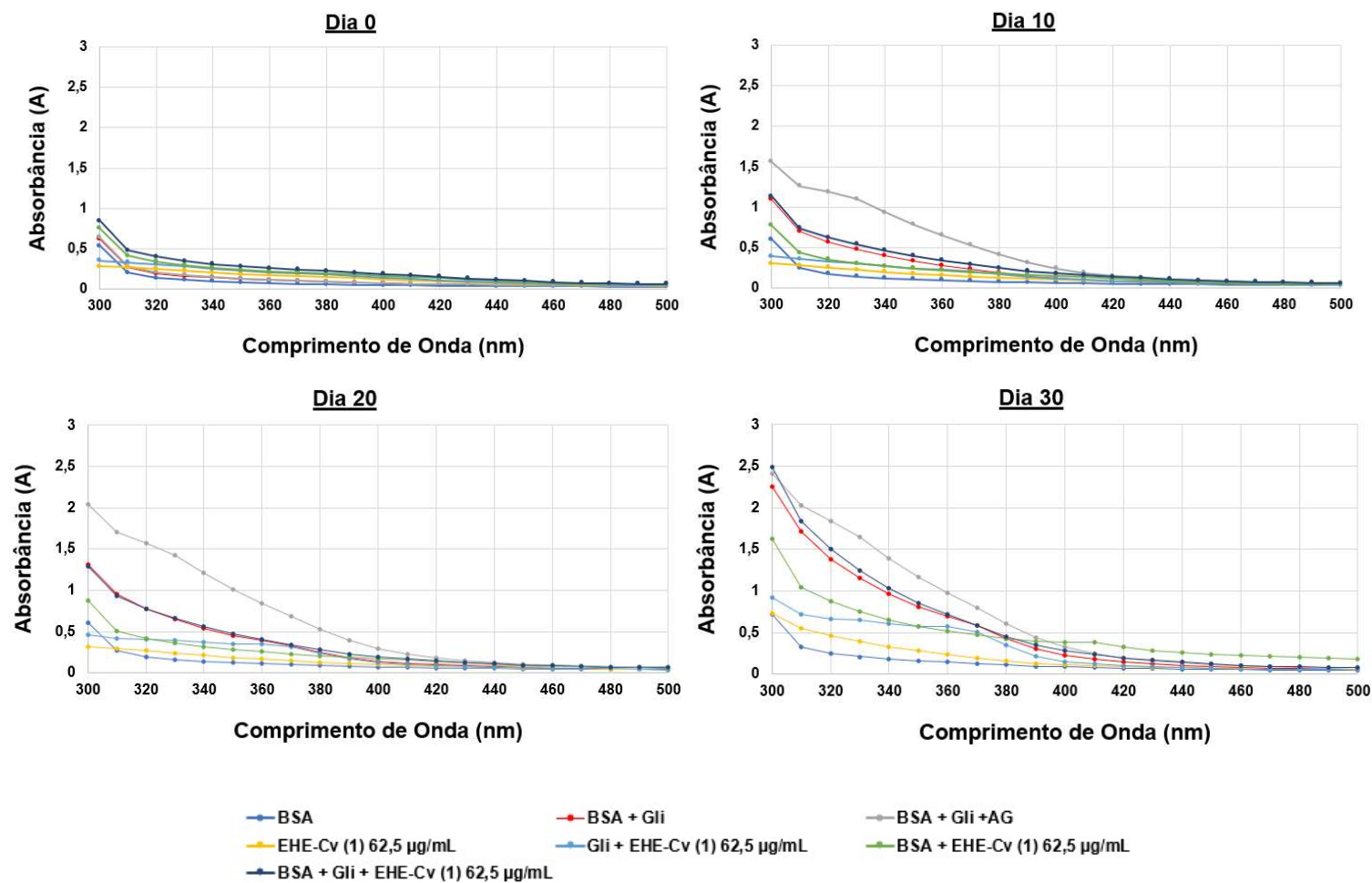
Fonte: Autoria própria.

Anexo 04. Evolução temporal de espectros de absorbância dos grupos contendo EHE-Cv (1) 125 µg/mL envolvidos na condução do sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



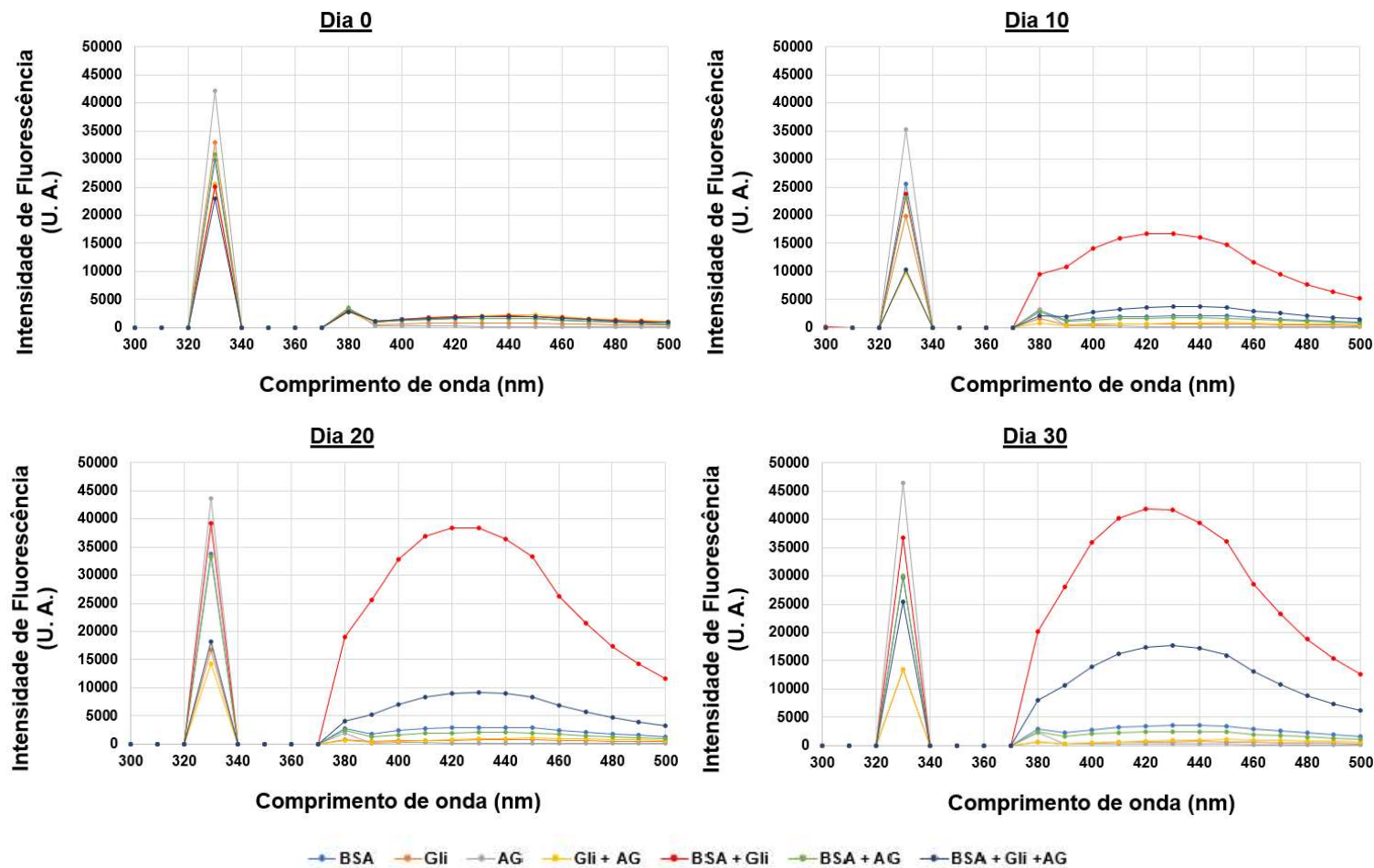
Fonte: Autoria própria.

Anexo 05. Evolução temporal de espectros de absorvância dos grupos contendo EHE-Cv (1) 62,5 µg/mL envolvidos na condução do sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



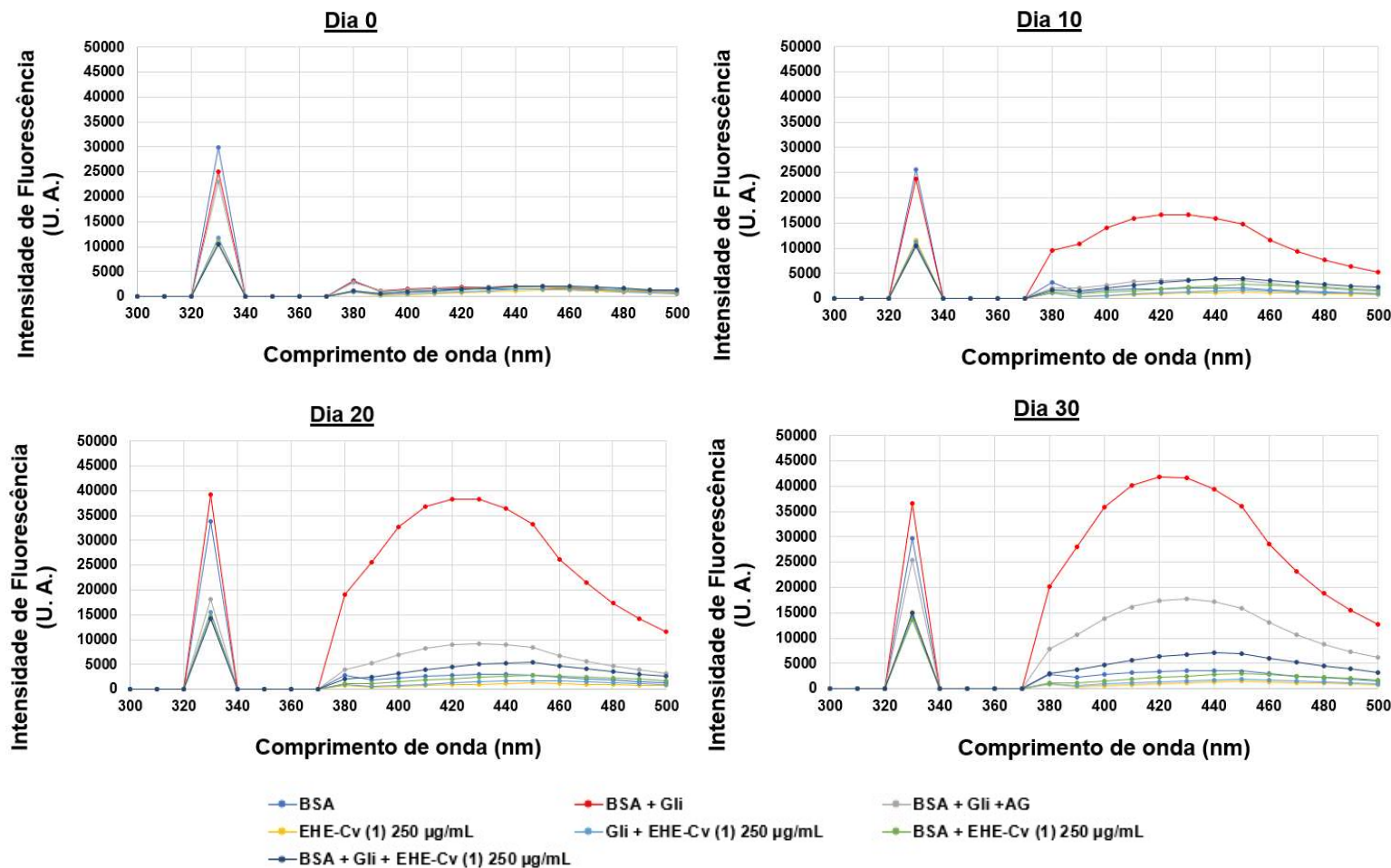
Fonte: Autoria própria.

Anexo 06. Evolução temporal de espectros de emissão dos grupos controles envolvidos na condução do sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



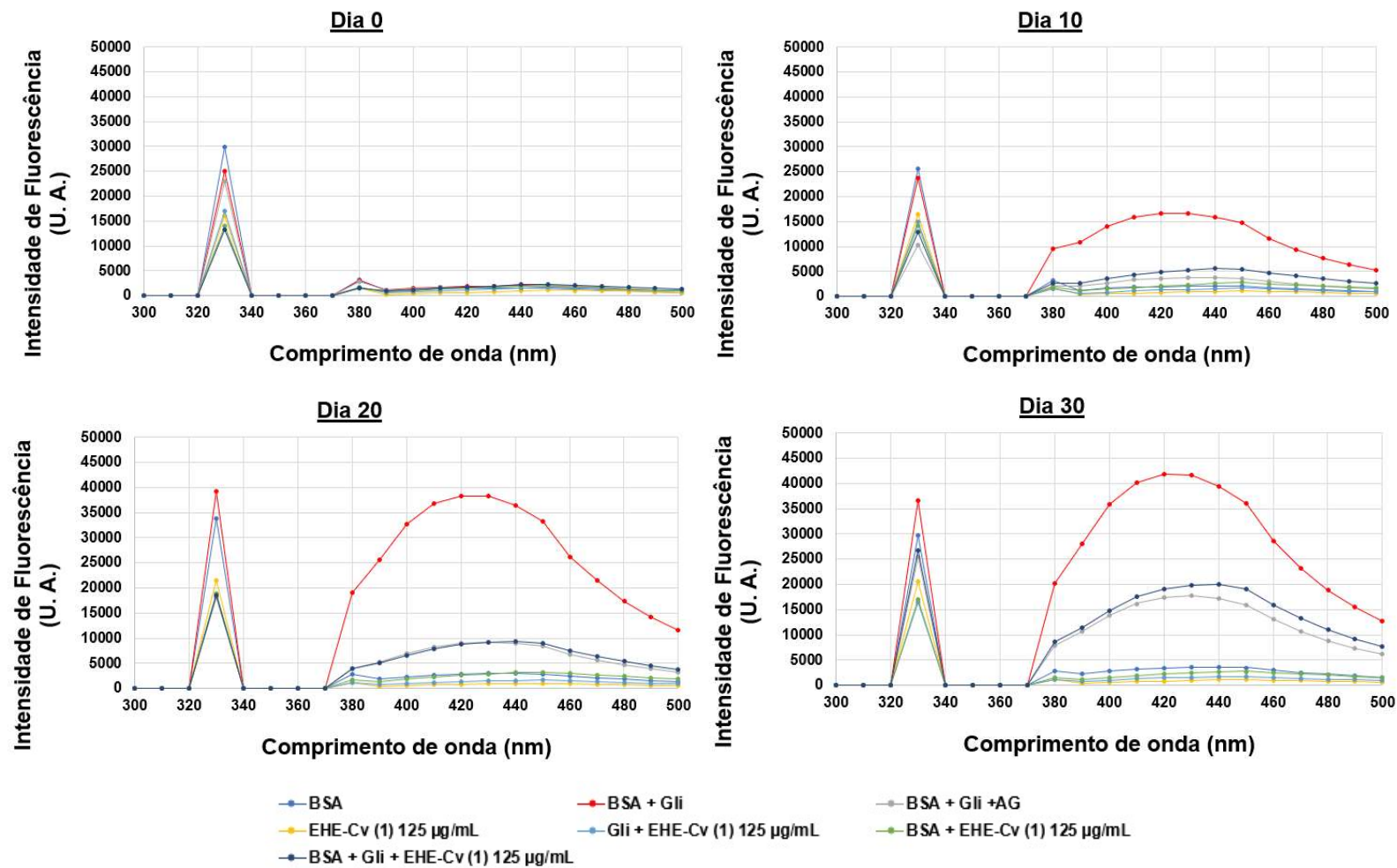
Fonte: Autoria própria.

Anexo 07. Evolução temporal de espectros de emissão dos grupos contendo EHE-Cv (1) 250 µg/mL envolvidos na condução do sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



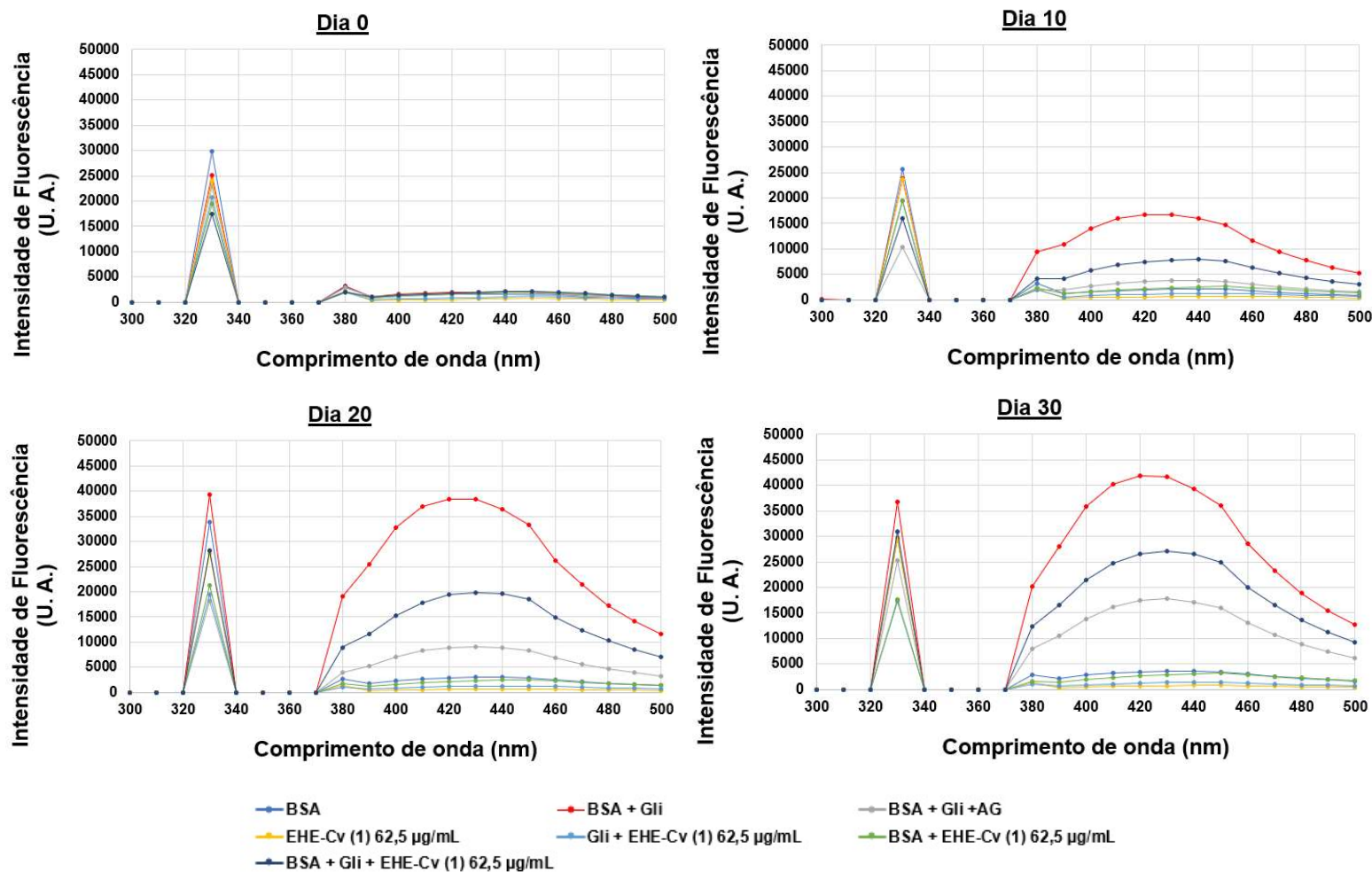
Fonte: Autoria própria.

Anexo 08. Evolução temporal de espectros de emissão dos grupos contendo EHE-Cv (1) 125 µg/mL envolvidos na condução do sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



Fonte: Autoria própria.

Anexo 09. Evolução temporal de espectros de emissão dos grupos contendo EHE-Cv (1) 62,5 µg/mL envolvidos na condução do sistema-modelo *in vitro* de glicação proteica.



Fonte: Autoria própria.