

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

KAREN RAMALHO PALERMO

**PROSPECÇÃO DO POTENCIAL ANTI-GLICAÇÃO
DE FITOQUÍMICOS VIA ENSAIOS *IN VITRO***

ARARAQUARA – SP

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E ENZIMOLOGIA CLÍNICAS**

**PROSPECÇÃO DO POTENCIAL ANTI-GLICAÇÃO
DE FITOQUÍMICOS VIA ENSAIOS *IN VITRO***

Karen Ramalho Palermo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista como requisito para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Co-orientadora: Tayra Ferreira Oliveira de Lima

ARARAQUARA – SP

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, meu porto seguro, que sempre me deu suporte e me incentivou a conquistar meus sonhos, bem como chegar onde estou. Agradeço principalmente aos meus pais, Kátia e Walter, meus exemplos de dedicação e caráter, que não mediram esforços quando o assunto era minha formação pessoal e profissional. Todos os valores que sempre me ensinaram são de extrema importância e significam tudo para mim.

Às minhas irmãs, Karol e Kamila, agradeço por todo o carinho e cumplicidade que compartilhamos entre nós. Com certeza são as pentelhas mais incríveis desse mundo! Um obrigada especial à nossa amizade e às palhaçadas que me divertem e me fazem tão feliz quando estamos juntas.

Aos meus avós, padrinhos, primos e amigos do colégio, pela compreensão e apoio durante esses anos que passei longe de casa; agradeço imensamente pela torcida de todos.

Agradeço às minhas irmãs de coração, Lolitas, minhas eternas companheiras! A todas que estiveram comigo, desde quando pisei pela primeira vez em Araraquara, até hoje (e sempre), muita gratidão por terem feito dos últimos anos, os melhores da minha vida. Não seria tão feliz hoje se não tivesse escolhido morar nessa república que tanto amo! Cada uma com seu jeitinho particular foi capaz de me mostrar que nem sempre “família” é apenas aquela composta por parentes. Também sou muito grata ao Marcos, por ter cuidado de mim durante todo o tempo que estive fora de casa. Às minhas queridas amigas Ana Carolina, Bárbara e Raquel, que foram minhas companheiras desde 2013, passando por momentos únicos, sempre juntas.

Ao meu namorado, Gabriel, por toda a parceria que compartilhamos um com o outro, sendo sempre meu melhor amigo e me apoiando em qualquer situação. Agradeço pela paciência e carinho, e por estar disposto a tirar um sorriso do meu rosto sempre que preciso. Sou muito grata também aos meninos da República Quebra Tudo, por me aturarem frequentemente durante todos esses anos.

A todos os amigos queridos que Araraquara me presenteou desde o primeiro dia de aula até hoje, pelos momentos vividos durante a minha

trajetória. Agradeço à Carol e ao Bruno, por todos os ensinamentos que me proporcionaram enquanto coordenadores da entidade AFEP, e principalmente à Emiliana, por ter dividido comigo a honra de “Cuidar, Orientar e Humanizar”, juntamente à gestão 2016/2017.

Agradeço especialmente à professora Amanda, minha orientadora, primeiramente por todas as aulas incríveis de Bioquímica que foram ministradas, despertando cada vez mais meu interesse e gosto pela profissão farmacêutica. Depois, pela dedicação para com meu desempenho como aluna de iniciação científica no laboratório, estando sempre muito presente e disposta a prestar total apoio em qualquer situação.

À minha co-orientadora, Tayra, por ter sido uma ótima companhia durante essa minha jornada, me ensinando tudo com muita paciência e empenho, sempre determinada a promover meu completo aprendizado. Ao professor Iguatemy, por todos os ensinamentos de grande sabedoria e pelo eterno bom humor.

A todas as pessoas do laboratório de bioquímica clínica que estiveram comigo durante este período: Mariana, Maiara, Renata, Monalisa, Carlos, Thais, Megley, Vitor, Jonas, Bruno e Renildo, por me auxiliarem desde o início da minha experiência até hoje.

Por fim, agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas por ser o local onde adquiri conhecimentos valiosos, com professores muito queridos e à PIBIC-reitoria/CNPq pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os produtos finais de glicação avançada (AGE) são compostos formados via reação não enzimática entre os grupos carbonil de açúcares redutores (glicose, frutose) e os grupos amino livres em proteínas. Estes compostos participam da formação de ligações cruzadas entre proteínas, gerando diversos intermediários oxidados que culminam na indução de estresse oxidativo observado tanto na circulação sanguínea quanto no interior das células. Tais ligações modificam as estruturas proteicas e prejudicam sua funcionalidade, afetando o seu *turnover*, processos de reconhecimento entre ligante e receptor, atividade enzimática, capacidade de transporte, propriedades físico-químicas, dentre outras funções. Por esta razão, a glicação de proteínas, bem como a formação excessiva de AGE e seu acúmulo nos tecidos, contribuem de maneira significativa para o estabelecimento das complicações do diabetes mellitus (DM), tais como retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas, bem como as complicações cardiovasculares.

Este projeto teve como objetivo o estudo do potencial anti-glicação do ácido *para*-cumárico e seus derivados: ácido ferúlico, ácido cafeico, curcumina (associação de duas unidades de ácido ferúlico) e ácido rosmarínico (associação de duas unidades de ácido cafeico), via ensaios realizados em sistema-modelo de glicação proteica *in vitro*. Os compostos foram incubados a 37°C na presença de albumina e glicose, durante 7 e 14 dias. Alíquotas das incubações foram retiradas para os seguintes ensaios: estimativa de AGE totais via fluorescência, quantificação de proteínas carboniladas (PCO) e quantificação de grupamentos tiol (-SH) via espectrofotometria, e separação eletroforética de proteínas em SDS-PAGE para estudo de formação de ligações cruzadas (*cross-linking*).

Os resultados demonstraram que o sistema-modelo de glicação *in vitro* foi responsivo às intervenções capazes de inibir as modificações na estrutura da albumina promovidas pela glicose. Todos os compostos derivados do ácido *p*-cumárico apresentaram algum tipo de efeito protetor, de modo que as moléculas com maior hidroxilação (ácidos cafeico e rosmarínico) apresentaram melhor resposta na prevenção/redução na formação de AGE totais e PCO, enquanto que aquelas com maior metoxilação (ácido ferúlico e curcumina) apresentaram melhor ação protetora em relação à geração de *cross-linking*. Estes resultados sugerem que a estrutura química do fitoquímico tem influência no tipo de potencial anti-glicação de derivados do ácido *para*-cumárico.

PALAVRAS-CHAVE: diabetes mellitus; produtos finais de glicação avançada; estresse glico-oxidativo; potencial anti-glicação; fitoquímicos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação endógena de produtos finais de glicação avançada (AGE).

Figura 2: Representação da estrutura tridimensional da albumina sérica bovina (BSA) e alguns de seus resíduos de cisteína.

Figura 3: Estruturas químicas gerais dos ácidos (A) hidroxibenzoico e (B) hidroxicinâmico.

Figura 4: Estrutura química do ApC e seus derivados.

Figura 5: Redução do DTNB pelos grupamentos sulfidríla (-SH) formando TNB, medido espectrofotometricamente a 412 nm.

Figura 6: Curva de calibração de cisteína, na presença de DTNB.

Figura 7: Reação entre a proteína carbonilada e a 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH).

Figura 8: Intensidade de fluorescência (% em relação ao BSA) para estimativa de AGE no sistema-modelo de glicação *in vitro*.

Figura 9: Intensidade de fluorescência (% em relação ao BSA) para estimativa de AGE no sistema-modelo de glicação *in vitro*, quando incubado com AG.

Figura 10: Intensidade de fluorescência (% em relação ao BSA) de ApC e AG na presença de glicose e na presença de BSA.

Figura 11: Intensidade de fluorescência (% em relação ao BSA) do ApC na condição Glicação + Fitoquímico.

Figura 12: Intensidade de fluorescência (% em relação ao BSA) dos fitoquímicos derivados do ApC e da AG, na presença de BSA e na presença de glicose.

Figura 13: Absorbância da CUR 0,5 mM na presença de BSA e/ou glicose.

Figura 14: Intensidade de fluorescência do AF 0,25 mM e 0,5 mM na presença de BSA e/ou glicose.

Figura 15: Intensidade de Fluorescência (% em relação ao BSA) de AF 0,25 mM e 0,5 mM na condição Glicação + fitoquímico, com os valores dos controles descontados.

Figura 16: Intensidade de fluorescência (%) dos fitoquímicos derivados do ApC e da AG, na presença de BSA + glicose.

Figura 17: Quantificação de grupamentos sulfidrila no sistema-modelo de glicação *in vitro*.

Figura 18: Quantificação de grupamentos sulfidrila das condições Controle Glicação (-), Controle Glicação (+), e Controle Fitoquímicos (compostos + BSA ou compostos + glicose).

Figura 19: Quantificação de grupamentos sulfidrila das condições Controle Glicação (-), Controle Glicação (+), e Glicação + Fitoquímicos.

Figura 20: Quantificação de proteínas carboniladas das condições Controle Glicação (-), Controle Glicação (+), e Controle Fitoquímicos (compostos + BSA).

Figura 21: Quantificação de proteínas carboniladas das condições Controle Glicação (-), Controle Glicação (+), e Glicação + Fitoquímicos.

Figura 22: Bandas proteicas formadas após separação eletroforética do BSA em gel 10% e corado com *Coomassie blue*.

Figura 23: Formação de *cross-linking*, condições Controle Glicação (-) e Controle Glicação (+).

Figura 24: Níveis proteicos das condições Controle Glicação (-), Controle Glicação (+), e Glicação + Fitoquímicos.

Figura 25: Variações na densitometria das bandas formadas durante separação eletroforética SDS-PAGE das condições Controle Glicação (-), Controle Glicação (+), e Glicação + Fitoquímicos.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – Ácido Cafeico

AF – Ácido Ferúlico

ApC – Ácido *para*-cumárico

AR – Ácido Rosmarínico

AG – Aminoguanidina

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

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

CUR – Curcumina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

EPM – Erro padrão da Média

HCl – Ácido Clorídrico

PCO – Proteínas Carboniladas

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Dodecil Sulfato de Sódio de Poliacrilamida

TCA – Ácido Tricloroacético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Diabetes mellitus e suas complicações.....	11
1.2. Estresse glico-oxidativo	12
1.3. Compostos antioxidantes e anti-glicação.....	16
1.3.1. Ácido <i>para</i> -cumárico	17
1.3.2. Ácido Ferúlico.....	18
1.3.3. Curcumina.....	19
1.3.4. Ácido Cafeico	19
1.3.5. Ácido Rosmarínico	20
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Principais reagentes utilizados.....	22
3.2. Glicação <i>in vitro</i> da albumina sérica bovina (BSA)	22
3.3. Determinação da formação de AGE totais	23
3.4. Quantificação de grupamentos tiol (sulfidrila)	23
3.5. Quantificação de proteínas carboniladas (PCO).....	25
3.6. Formação de ligações cruzadas (<i>cross-linking</i>) entre proteínas.....	26
3.7. Análise estatística	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Estudo temporal da formação de AGE totais	27
4.2. Responsividade do sistema-modelo quanto ao potencial anti-glicação e/ou anti-AGE	28
4.3. Estimativa de AGE totais na presença de ácido <i>p</i> -cumárico.....	29
4.4. Determinação da formação de AGE totais na presença dos derivados do ácido <i>p</i> -cumárico.....	31
4.6. Quantificação de proteínas carboniladas (PCO).....	39

4.7. Determinação da massa de proteína a ser aplicada na separação eletroforética de proteínas em SDS-PAGE no estudo de <i>cross-linking</i>	41
4.8. Verificação da formação de <i>cross-linking</i> em amostras de BSA incubadas na presença de glicose	42
4.9. Estudo da formação de <i>cross-linking</i> nos ensaios de glicação na ausência e na presença dos fitoquímicos.....	43
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes mellitus e suas complicações

O termo diabetes mellitus (DM) se refere a uma síndrome metabólica de múltipla origem etiológica, que pode ocorrer devido a prejuízos na produção da insulina pelas células beta pancreáticas e/ou à resistência dos tecidos-alvo à ação deste hormônio, resultando em um quadro de hiperglicemia crônica. Com base na etiologia, pode-se classificar o DM em quatro classes clínicas: DM tipo 1 (geralmente é mediado por autoimunidade, causando a destruição das células beta do pâncreas e, conseqüentemente, deficiência absoluta de insulina), DM tipo 2 (resistência tecidual à insulina combinada a prejuízos na secreção de insulina), outros tipos específicos de diabetes mellitus (defeitos genéticos na função das células beta e/ou na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, entre outros) e diabetes mellitus gestacional (intolerância à glicose diagnosticada durante a gravidez) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015 – 2016).

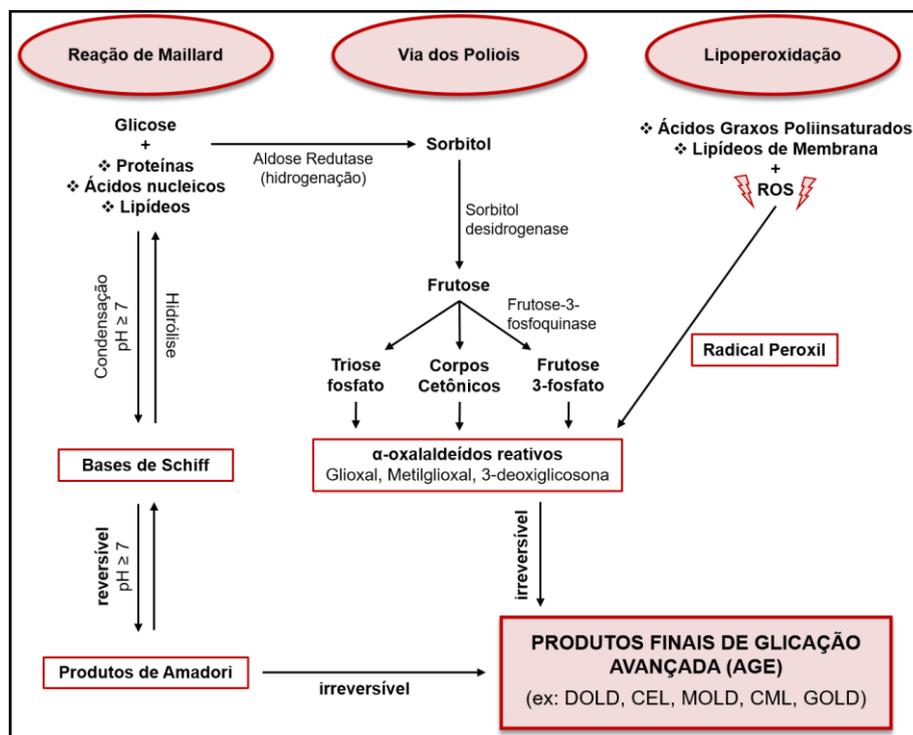
Sustentado pelo aumento global na prevalência da obesidade e estilos de vida pouco saudáveis, o número de pessoas com DM aumentou solidamente nas últimas décadas. Estimou-se em 2015 que 415 milhões de adultos entre 20 e 79 anos conviviam com a doença, incluindo 193 milhões não diagnosticados e 318 milhões com tolerância à glicose reduzida. Ainda, caso este aumento não seja controlado, até 2040 estima-se que este índice subirá para 642 milhões de pessoas (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Caracterizado por desordens no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, o DM pode acarretar em complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas) e macrovasculares (aterosclerose, hipertensão arterial, doenças coronarianas e infarto) (DONNELLY et al., 2000). Sendo assim, a prevenção desta síndrome de maneira eficaz torna-se extremamente importante.

1.2. Estresse glico-oxidativo

As complicações do DM podem ser observadas como uma consequência de diversos eventos, incluindo a glicação de proteínas, bem como da formação excessiva e acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGE, do inglês *advanced glycation end products*) nos mais diversos tecidos. Estes produtos são majoritariamente formados via reação não-enzimática entre os grupos carbonil de açúcares redutores (principalmente glicose e frutose) e os grupos amino livres em proteínas, denominada Reação de Maillard. O primeiro estágio deste processo é reversível e compreende condensações, rearranjos e modificações oxidativas, culminando na formação de estruturas instáveis, conhecidas como bases de Schiff. Por conta de tal instabilidade, estes compostos sofrem um rearranjo a fim de formar produtos com maior estabilidade (produtos de Amadori), tratando-se de um processo dificilmente reversível. Durante tais rearranjos, os produtos de Amadori podem sofrer processos de oxidação que geram compostos dicarbonílicos altamente reativos (com destaque para o glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona), que também podem ser gerados como intermediários ou subprodutos da auto-oxidação dos açúcares redutores, da lipoperoxidação ou de intermediários da via dos poliois. Estes compostos dicarbonílicos, após desidratação e rearranjos, levam à formação dos AGE, caracterizando assim uma cascata complexa de reações (Figura 1) (VINSON e HOWARD, 1996; ARDESTANI et al., 2007; NEGRE-SALVAYRE et al., 2009; SINGH et al., 2014; NOWOTNY et al., 2015).

Figura 1 – Formação endógena de produtos finais de glicação avançada (AGE).



CEL: carboxietilisina; CML: carboximetilisina; DOLD: dímero de lisina e 3-deoxiglicosona; GOLD: dímero de gloixal-lisina; MOLD: dímero de metilgloixal-lisina.

Fonte: adaptado de OTT et al., 2014.

Deve-se destacar também que, durante a formação de AGE, algumas espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas, potencializando os efeitos deletérios que levam à disfunção de diversas biomoléculas (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2002; BARBOSA et al., 2008). Por essa razão, a formação de ROS, bem como a glicação de proteínas e subsequente geração excessiva de AGE seguida de seu acúmulo nos tecidos, em conjunto contribuem de maneira significativa para o estabelecimento das complicações tardias do DM, tais como retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas, bem como contribuem também em etapas das complicações macrovasculares (AHMED, 2005; GOH et al., 2008).

A aminoguanidina (AG), um dos agentes mais investigados quanto à prevenção da formação de AGE via ensaios *in vivo* e *in vitro*, atua como uma molécula nucleofílica extremamente reativa, apresentando dois sítios centrais: grupamento hidrazina ($-NHNH_2$) e grupamento guanidina ($-NH-C(=NH)NH_2$). Sua atividade está relacionada à interação com os compostos dicarbonílicos intermediários (α -oxalaldeídos reativos), impedindo, portanto, a posterior

participação destes na geração de AGE. Há também indícios de que a AG é capaz de reagir diretamente com a glicose, competindo com os primeiros estágios da glicação proteica. Porém, trata-se de uma reação ocasional, podendo ser favorecida apenas em condições que contêm altas concentrações de AG (THORNALLEY et al., 2003; ENGELEN et al., 2013). Outros estudos demonstraram que a AG é capaz de sequestrar radicais hidroxil e peróxil, sugerindo um perfil antioxidante da molécula (COURDEROT-MASUYER et al., 1999; KARLI et al., 2012).

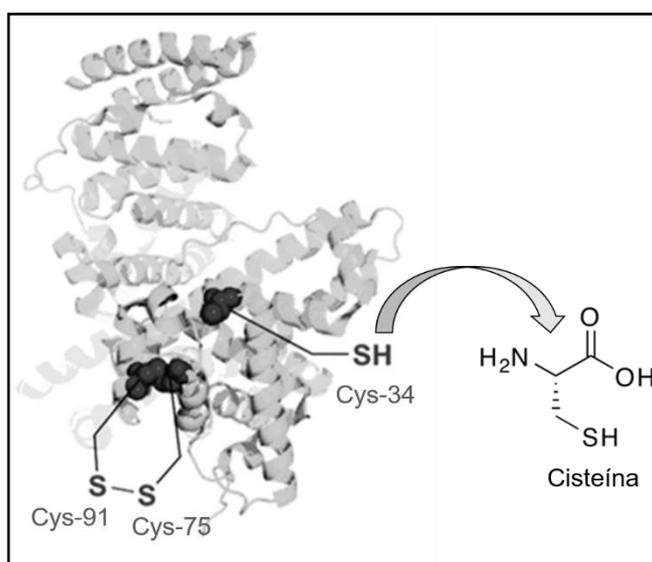
Além ocasionar a formação exacerbada de AGE, a produção de compostos intermediários altamente instáveis está envolvida na geração de ligações cruzadas entre proteínas (evento denominado como *cross-linking* proteico) (LIU e JING, 2016; HSIA et al., 2016), culminando na indução do estresse glico-oxidativo, observado tanto na circulação sanguínea quanto no interior das células (ULRICH e CERAMI, 2001). Tais ligações cruzadas modificam as estruturas proteicas e prejudicam sua funcionalidade, afetando sua capacidade de renovação (*turnover* proteico), processos de reconhecimento entre ligante e receptor, atividade enzimática, propriedades físico-químicas, função transportadora, dentre outras (SINGH et al., 2014). Há evidências de que a principal substância envolvida neste processo seja o metilglioxal, formando estas ligações cruzadas via interações com determinados resíduos de aminoácidos das proteínas (com destaque para os resíduos de lisina, arginina e cisteína) (RAMANAKOPPA et al., 1996; HO et al., 2010).

Sendo assim, alguns autores sugerem que os AGE podem induzir efeitos deletérios tardios por dois mecanismos distintos: alterações estruturais de proteínas (*cross-linking*), e interação dos AGE com receptores específicos de superfície (também conhecidos como RAGE) (BAYNES e THORPE, 1999). O primeiro mecanismo envolve a interação dos AGE com proteínas fisiológicas, provocando alterações intra e extracelulares. Este processo está diretamente relacionado à concentração do açúcar redutor no organismo e à velocidade de renovação (*turnover*) das proteínas; conseqüentemente, aquelas que apresentam maior tempo de meia-vida (como por exemplo, o colágeno e a elastina) são as proteínas mais afetadas por este mecanismo (POULSEN et al., 2013; OTT et al., 2014; OU e HUANG et al., 2017). Já a interação AGE-RAGE

está relacionada à indução de estresse oxidativo intracelular, via ativação de diversas cascatas de sinalização que desencadeiam a expressão de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, resultando em danos celulares e contribuindo, portanto, para o estabelecimento das comorbidades do DM (HO et al., 2010; OTT et al., 2014; OU e HUANG et al., 2017).

Além de estimular o aumento na geração de espécies reativas, a interação AGE-RAGE promove estresse oxidativo também via desregulação dos mecanismos de defesa antioxidante endógenos (como por exemplo, o sistema da glutatona), levando à redução da proteção promovida por tais sistemas fisiológicos (THORNALLEY, 2007). O grupamento tiol (-SH) presente nos resíduos de cisteína da molécula de albumina (Figura 2) está relacionado ao potencial antioxidante da proteína, pois é capaz de reagir com radicais livres (gerando uma cistina como produto desta reação); assim, a albumina participa dos mecanismos de defesa do organismo via captura dessas espécies reativas (FAURE et al., 2005; BARREIROS et al., 2006). Logo, as consequências geradas pelo estresse glico-oxidativo podem ter influência sobre este grupamento durante o processo de glicação proteica (MEEPROM et al., 2013).

Figura 2 – Representação da estrutura tridimensional da albumina sérica bovina (BSA) e alguns de seus resíduos de cisteína.



Todos os resíduos de cisteína apresentam interação entre si (como Cys-91 e Cys-75), formando pontes dissulfeto (cistina), com exceção da Cys-34, que se encontra na forma livre.
Fonte: adaptado de KONIEV e WAGNER, 2015.

1.3. Compostos antioxidantes e anti-glicação

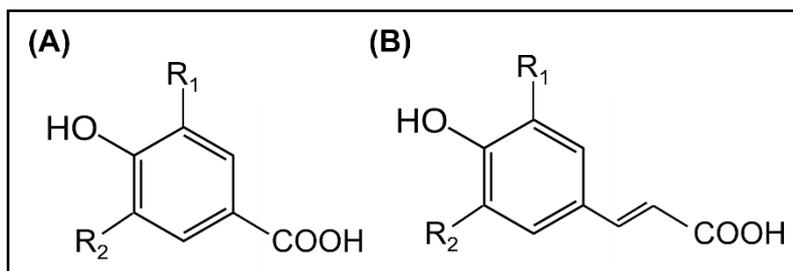
A inibição da glicação de proteínas e/ou da formação de AGE pode ser obtida por meio de diferentes mecanismos, tais como: bloqueio de grupamentos carbonil de açúcares redutores, bloqueio de grupamentos amino livres de proteínas, inibição da formação dos produtos de Amadori, quelação de metais, inibição da formação de radicais livres, remoção de radicais livres formados, promoção de quebra dos AGE, inibição da auto-oxidação da glicose e indução de expressão de enzimas com função antioxidante (BAYNES et al., 1991; AHMED, 2005; BOUSOVÁ et al., 2005; HARRIS et al., 2010; SÉRO et al., 2013).

Esforços têm sido direcionados na busca de compostos advindos de plantas medicinais ou de alimentos funcionais que possam inibir de maneira efetiva a glicação de proteínas e/ou a formação de AGE (MEEPROM et al., 2013; ABBAS et al., 2016; HSIA et al., 2016). Considerando a participação de reações oxidativas e a presença de radicais livres nos processos envolvidos no estresse glico-oxidativo, uma estratégia terapêutica interessante pode ser alcançada pela obtenção de efeito aditivo e/ou sinérgico e/ou complementar de compostos que possuam propriedades antioxidantes e anti-glicação (BOUSOVÁ et al., 2005; HARRIS et al., 2010).

Os ácidos fenólicos são caracterizados como compostos antioxidantes e anti-glicação, e podem ser divididos em dois grupos: ácidos hidroxibenzoicos (possuindo sete átomos de carbono) e hidroxicinâmicos (possuindo nove átomos de carbono) (Figura 3).

Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam uma maior atividade antioxidante em relação aos ácidos hidroxibenzoicos, visto que tal atividade está diretamente relacionada à capacidade de doação de átomos de hidrogênio da molécula. Por isso, a quantidade de átomos de hidrogênio disponíveis, bem como a posição dos grupamentos hidroxila (OH), ambos são importantes fatores a serem analisados durante a avaliação do potencial antioxidante e/ou anti-glicação destes compostos (RICE-EVANS et al., 1996; ANDREASEN et al., 2001).

Figura 3 – Estruturas químicas gerais dos ácidos (A) hidroxibenzoico e (B) hidroxicinâmico.



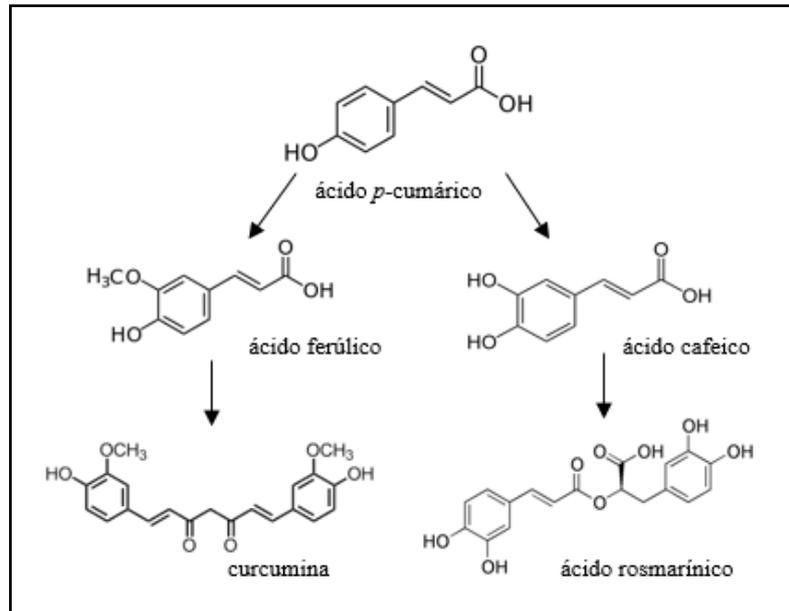
Fonte: própria autora, 2017.

1.3.1. Ácido *para*-cumárico

O ácido *para*-cumárico (ApC; ácido *trans*-4-hidroxicinâmico) é precursor de diversos outros compostos fenólicos e está amplamente distribuído em alimentos como frutas e vegetais, bem como em cereais e alguns vinhos (CLIFFORD, 2000). Este fitoquímico tem sido relacionado a propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, tendo como mecanismo principal a eliminação de ROS geradas no organismo (ZANG et al., 2000; LUCERI et al., 2007).

Em modelo de glicoxidação proteica, foi observado que a atividade antioxidante e/ou anti-glicação dos ácidos hidroxicinâmicos está diretamente relacionada à posição *para* do grupamento hidroxila das moléculas, reiterando que o ácido *para*-cumárico seja um melhor protetor que o *orto*-cumárico (BOUSOVÁ et al., 2005). Sendo assim, há grande interesse na compreensão do potencial farmacológico do ApC e seus derivados (Figura 4), na tentativa de se estabelecer uma relação estrutura vs atividade.

Figura 4 – Estrutura química do ApC e seus derivados.



Fonte: própria autora, 2017.

1.3.2. Ácido Ferúlico

O ácido ferúlico (AF; ácido trans-4-hidroxi-3-metoxicinâmico) é um derivado do ApC que apresenta uma metoxila ($-OCH_3$) na posição adjacente à hidroxila do anel aromático (Figura 4). Este fitoquímico pode ser encontrado em sucos cítricos, cereais e também no café (CLIFFORD, 2000). Quando incubado em sistema modelo de glicação *in vitro* contendo BSA e um monossacarídeo (glicose, frutose ou ribose), foi observado que o AF inibe a glicação proteica e os danos envolvidos no estresse glico-oxidativo, através de sua capacidade de aumentar o conteúdo de grupamentos tiol, bem como diminuir a formação de AGE, grupamentos carbonílicos e agregação proteica (SINVÁN et al., 2011; SOMPONG e MEEPROM, 2013).

Alguns estudos sugerem que a presença da substituição na posição *orto* por grupamentos doadores de elétrons, como ocorre no AF, está relacionada a um aumento da estabilidade da molécula, resultando em uma melhor atividade antioxidante. Logo, acredita-se que o AF tenha uma eficácia maior que o ApC na proteção contra o estresse glico-oxidativo (POKORNY, 1987; CUVÉLIER et al., 1992).

1.3.3. Curcumina

A curcumina [CUR; (E,E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadien-3,5-diona] é um pigmento amarelo isolado do rizoma comestível do açafrão-da-terra (*Curcuma longa* L.). Visto que a maioria das doenças crônicas envolve mecanismos relacionados à oxidação e inflamação, a CUR representa uma próspera alternativa terapêutica, pois possui diversas propriedades benéficas à saúde, tais como antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antidiabética (SHARMA, 1976; SRIVASTAVA e SRIMAL, 1985; AGGARWAL e SUNG, 2008). Tais propriedades estão relacionadas a inúmeros mecanismos: redução na geração de ROS, quelatação de íons metálicos (REDDY e LOKESH, 1994), inibição da formação de compostos pró-inflamatórios (prostaglandinas e leucotrienos) (HUANG et al., 1991), estímulo à captação de glicose pela musculatura esquelética (KIM et al., 2010), redução da formação de *cross-linking* proteico (SAJITHLAL et al., 1998), dentre outros.

A combinação de duas moléculas de AF tem como produto a estrutura da CUR (Figura 4). Estudos que comparam os dois fitoquímicos demonstram que a estrutura duplicada (CUR) evidencia maior atividade em relação à estrutura simples (AF), devido à presença de dois grupamentos cetona ao centro da molécula e/ou à presença de uma maior reatividade dos hidrogênios dos grupamentos CH₂ situados entre as duas carbonilas, além de uma possível potencialização do efeito simplesmente pela duplicação dos grupamentos fenil (LARSON, 1988; CUVELIER et al., 1992).

1.3.4. Ácido Cafeico

O ácido cafeico (AC; ácido 3,4-dihidroxicinâmico) é um derivado direto do ApC que apresenta outra hidroxila (-OH) na posição *orto* em relação à hidroxila da molécula de seu precursor (Figura 4). Este fitoquímico geralmente é encontrado no café, porém também está presente em algumas frutas como maçã e mirtilo (CLIFFORD, 2000). Os efeitos relacionados ao potencial anti-glicação do AC foram avaliados tanto *in vivo* quanto *in vitro*, evidenciando que o composto é capaz de atuar no controle glicêmico, bem como inibir a formação de AGE e citocinas pró-inflamatórias (GUGLIUCCI et al., 2009; CHAO et al., 2010).

Uma vez que a atividade dos ácidos fenólicos pode estar relacionada à presença de uma hidroxila no anel aromático, o AC é tido como um composto mais ativo que o próprio ApC, pois apresenta a adição de outro grupamento OH ao anel. Logo, é sugerido que este fitoquímico possua um sítio reativo adicional para desempenhar sua atividade (POKORNY, 1987; CUVELIER et al., 1992).

1.3.5. Ácido Rosmarínico

O ácido rosmarínico [AR; ácido 3,4-dihidroxicinâmico (R)-1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil) éster etílico] é encontrado em diversas ervas utilizadas na culinária, principalmente o alecrim (CLIFFORD, 2000; SHAN et al., 2005). Este fitoquímico apresenta evidente potencial antioxidante, sobretudo por conta de sua atividade como sequestrador de espécies reativas (CAZZOLA, CAMEROTTO e CESTARO, 2011) e inibidor da formação de AGE (OU e HUANG et al., 2017), contribuindo para a prevenção de complicações do DM.

A combinação de duas moléculas de AC tem como produto a estrutura do AR (Figura 4). O evidente potencial antioxidante apresentado por este fitoquímico está relacionado à presença de dois anéis fenólicos em sua estrutura, ambos com dois grupamentos hidroxila na posição *orto* (SHAN et al., 2005). Comparações feitas entre as moléculas simples (AC) e duplicada (AR) destacam que a combinação de estruturas tende a aumentar a efetividade do composto (CUVELIER et al., 1992).

2. OBJETIVOS

Investigar o potencial anti-glicação de compostos derivados do ácido *para*-cumárico: ácido ferúlico, curcumina, ácido cafeico e ácido rosmarínico via sistema-modelo de glicação *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Principais reagentes utilizados

O estudo foi realizado com o ApC e seus derivados (AF, CUR, AC e AR) (Figura 4), todos obtidos da Sigma-Aldrich.

Os demais reagentes utilizados nos ensaios estão listados a seguir: acetato de etila (LS Chemicals), ácido acético (Qhemis), ácido clorídrico (HCl) (Qhemis), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (Sigma-Aldrich), ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich), álcool etílico (Qhemis), álcool metílico (Impex), aminoguanidina (Sigma-Aldrich), azida sódica (Merck), BSA – pó liofilizado livre de ácidos graxos ($\geq 96\%$) (Sigma-Aldrich), dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Merck), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich), fosfato de sódio dibásico (Sigma-Aldrich), fosfato de sódio monobásico (Synth), glicose (Sigma-Aldrich), L-cisteína (Riedel-deHaën).

3.2. Glicação *in vitro* da albumina sérica bovina (BSA)

O sistema-modelo de glicação proteica *in vitro* foi realizado de acordo com Meeprom et al. (2013), com modificações. A albumina sérica bovina (BSA, 10 mg/mL) foi incubada na presença de glicose (0,5 M), em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) contendo 0,02% de azida sódica, a 37°C durante 7 e 14 dias, na ausência ou presença dos fitoquímicos (0,25 mM e 0,5 mM). A aminoguanidina (AG), um agente anti-glicação já conhecido, foi utilizada nas concentrações de 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM e 5 mM. O próprio tampão fosfato foi utilizado como solvente dos fitoquímicos, com exceção da curcumina, que foi solubilizada em DMSO, na proporção de 5% no meio de incubação.

As incubações foram conduzidas da seguinte forma:

- ❖ Controle Glicação (-) (BSA ou Glicose);
- ❖ Controle Glicação (+) (BSA + Glicose);
- ❖ Controle Anti-glicação (BSA + Glicose + Aminoguanidina);
- ❖ Controle do Fitoquímico (BSA + Fitoquímico ou Glicose + Fitoquímico);
- ❖ Glicação + Fitoquímico (BSA + Glicose + Fitoquímico).

Ao final das incubações, foram retiradas alíquotas para a determinação de AGE totais, quantificação de grupamentos tiol (SH), quantificação de proteínas carboniladas (PCO) e formação de *cross-linking* via separação eletroforética de proteínas em SDS-PAGE.

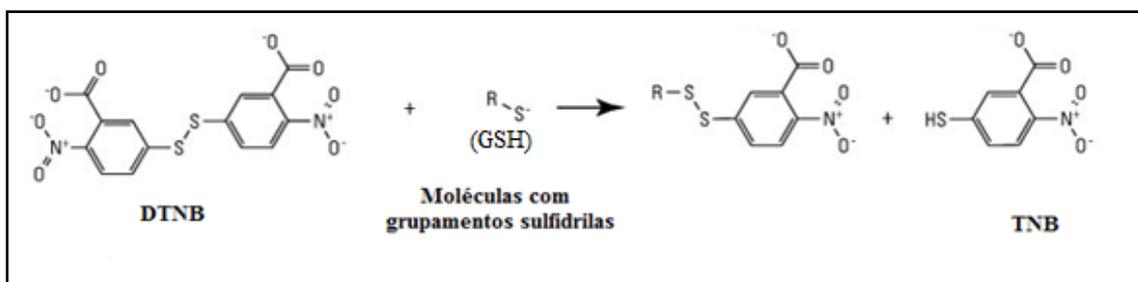
3.3. Determinação da formação de AGE totais

A formação de AGE totais foi determinada via fluorescência, nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 355 nm e 430 nm, respectivamente. O potencial anti-glicação dos compostos foi avaliado pela comparação relativa entre a glicação máxima ocasionada pela glicose [representada pelo grupo Controle Glicação (+)] e as incubações na presença de AG ou dos compostos (representadas pelos grupos Glicação + Fitoquímico) (MEEPROM et al., 2013; SÉRO et al., 2013).

3.4. Quantificação de grupamentos tiol (sulfidrila)

Segundo Sedlak & Lindsay (1968), é possível quantificar o conteúdo de grupamentos tiol a partir de sua capacidade de reduzir o reagente DTNB [ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)] à TNB (ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico), monitorado a 412 nm (Figura 5).

Figura 5: Redução do DTNB pelos grupamentos sulfidrila (-SH) formando TNB, medido espectrofotometricamente a 412 nm.



Fonte: adaptado de ELLMAN, 1959.

Para a determinação quantitativa de grupamentos -SH, foram utilizados 100 μ L de amostra, em duas placas UV-VIS de 96 poços. Na primeira placa, foram adicionados 200 μ L de água Mili-Q, com a finalidade de se obter um controle da absorbância basal das amostras. Na segunda placa, foram

adicionados 200 μL de DTNB (7,5 mM); o “branco” foi obtido a partir de poços com água Mili-Q e DTNB (média da triplicata) e foi descontado de todos os outros resultados. Após incubação de 15 minutos no escuro à temperatura ambiente, as placas foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 412 nm.

As absorvâncias finais das amostras foram calculadas conforme equação:

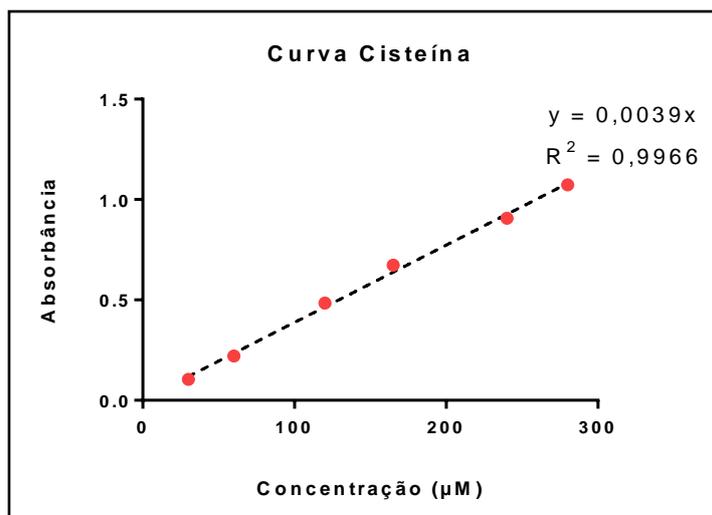
$$\text{Abs Final} = \text{Abs Amostra} - \text{Abs Controle da Amostra} - \text{Abs Branco} - \text{Abs Água}$$

Onde, Abs Amostra é a absorvância da amostra na presença do reagente de cor DTNB; Abs Controle da Amostra é a absorvância da amostra na ausência do reagente de cor DTNB; Abs Branco é a absorvância da água + DTNB; e Abs Água é a absorvância da água.

Também foi preparada uma curva de calibração de cisteína, nas concentrações de 30, 60, 120, 165, 240 e 280 μM , na presença de DTNB. A partir da curva obtida (Figura 6), calculou-se o fator (256,4103), e este foi utilizado para que os resultados fossem expressos em μM de grupamentos tiol, com base na equação:

$$\text{Tiol } (\mu\text{M}) = \text{Abs Final} \times \text{Fator}$$

Figura 6: Curva de calibração de cisteína, na presença de DTNB.

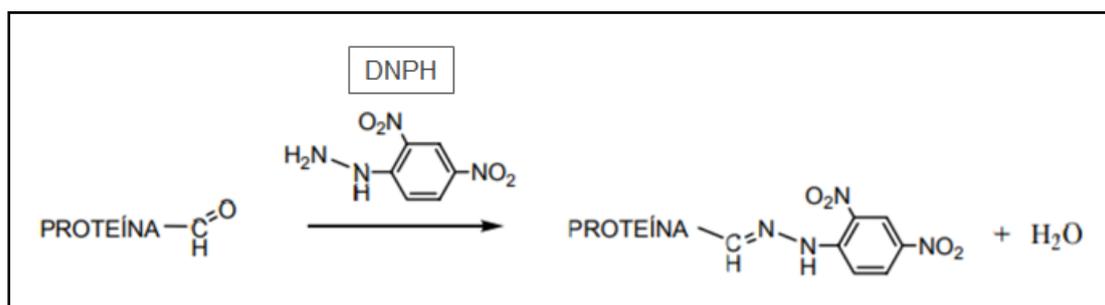


Fonte: própria autora, 2017.

3.5. Quantificação de proteínas carboniladas (PCO)

O conteúdo de grupamentos carbonila nas proteínas foi determinado de acordo com Levine et al. (1994), com modificações. O método se baseia na reação dos grupamentos carbonílicos com o reagente DNPH, formando uma hidrazona que pode ser quantificada espectrofotometricamente a 370 nm (Figura 7).

Figura 7: Reação entre a proteína carbonilada e a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH).



Fonte: adaptado de LEVINE et al., 1994.

Para cada alíquota de amostra (250 μL), foram utilizados dois tubos de polipropileno, um denominado Amostra (A) e outro Controle (C). Aos tubos A, foram adicionados 500 μL de DNPH (12 mM) e aos tubos C, foram adicionados 500 μL de HCl 2,5 M. Após homogeneização realizou-se incubação durante 1 hora no escuro. Em seguida, 500 μL de TCA 10% foram adicionados a todos os tubos, que passaram por homogeneização e centrifugação (5000 g, 5 min, 4°C). O pellet de proteínas formado foi lavado com 1 mL da mistura etanol/acetato de etila (1:1) três vezes, e em seguida ressuspenso em 750 μL de SDS 6%. Após última centrifugação (1000 g, 10 min, 4°C), os sobrenadantes foram utilizados para medida da absorbância a 370 nm.

Os resultados foram obtidos com base na diferença entre os tubos A e C de cada alíquota e a concentração de grupos carbonila foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar do DNPH ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$):

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

3.6. Formação de ligações cruzadas (*cross-linking*) entre proteínas

O estudo da formação de ligações cruzadas entre proteínas (*cross-linking*) foi realizado via separação de proteínas (por tamanho) de amostras das incubações, em eletroforese do tipo SDS-PAGE (gel de poliacrilamida em fase desnaturante).

Primeiramente foi realizada padronização da quantidade ideal de massa de proteína aplicada no gel de eletroforese para favorecer a melhor visualização das bandas de proteína nos géis revelados (10% SDS-PAGE). Foram realizadas separações eletroforéticas de amostras com aplicação de massas de 10, 15, 20, 25, 50, 75 e 100 µg de proteína, na presença de tampão Laemmli (1:1) (LAEMMLI, 1970).

Após a definição da massa proteica ideal a ser submetida à eletroforese, foi feita a separação eletroforética das demais amostras submetidas aos diferentes tratamentos em 10% de SDS-PAGE. Finalizada a etapa de separação, o gel foi corado com *Coomassie blue* por 30 minutos, e lavado três vezes com solução descorante (10% metanol, 10% ácido acético e 80% água MilliQ).

Foi gerada uma imagem obtida das bandas coradas no gel de separação para posterior quantificação densitométrica das bandas reveladas (software ImageJ versão 1.51k), seguida de representação gráfica dos valores relativos de densitometria.

3.7. Análise estatística

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

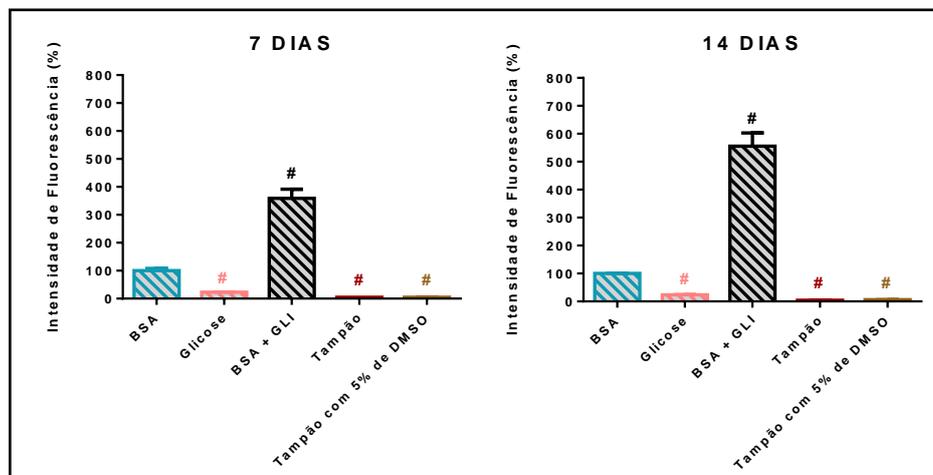
4.1. Estudo temporal da formação de AGE totais

A estimativa do conteúdo de AGE totais é muito importante para o estudo do potencial anti-glicação *in vitro*, pois trata-se de um marcador positivo do processo de glicação da BSA pela glicose, bem como permite estudo da temporalidade do ensaio, de modo a associar a duração do período de incubação das amostras ao grau de glicação da albumina (MEEPROM et al., 2013).

A Figura 8 representa o estabelecimento do sistema-modelo de glicação *in vitro* em relação à estimativa da formação de AGE totais. Em ambos os períodos de incubação (7 e 14 dias), a condição Controle Glicação (+) apresentou uma quantidade relativamente maior de AGE do que a condição Controle Glicação (-). Além disso, observou-se que este aumento foi contínuo quando comparados os períodos de 7 dias (aumento de 3,4 vezes) e 14 dias (aumento de 5,5 vezes). Estes resultados corroboram outros estudos que relatam aumento similar nos valores de fluorescência relativa à AGE quando BSA foi incubada com glicose (GUGLIUCCI et al., 2009; SILVÁN et al., 2011; MEEPROM et al., 2013; SOMPONG et al., 2013; HSIA et al., 2016).

Os solventes dos fitoquímicos utilizados no estudo (tampão fosfato e tampão fosfato com DMSO 5%) não apresentaram influência na fluorescência dos AGE nos comprimentos de onda estudados, não interferindo na metodologia utilizada.

Figura 8 – Intensidade de fluorescência (% em relação ao BSA) para estimativa de AGE no sistema-modelo de glicação *in vitro*.



% da intensidade de fluorescência obtida pela incubação de BSA (10 mg/mL); Glicose (0,5 M); BSA (10 mg/mL) + GLI (0,5 M); tampão fosfato (0,1 M) ou tampão fosfato (0,1 M) com 5% de DMSO, após períodos de 7 e 14 dias. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=2). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$ (One-Way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls). #, diferenças com BSA. Fonte: própria autora, 2017.

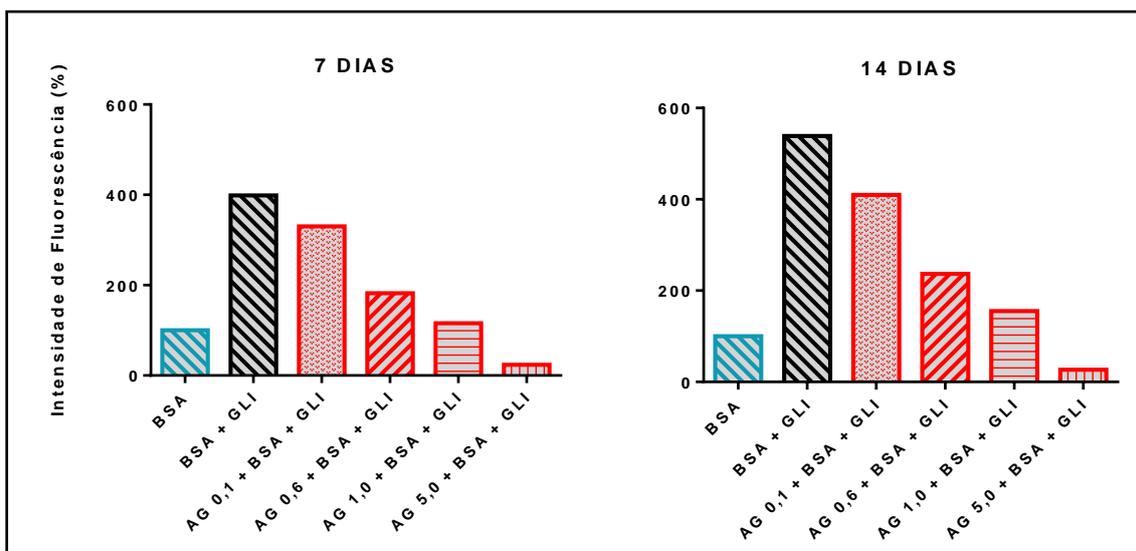
4.2. Responsividade do sistema-modelo quanto ao potencial anti-glicação e/ou anti-AGE

Por se tratar de um dos agentes mais investigados quanto à prevenção da formação de AGE, a AG é geralmente empregada como controle positivo dos sistemas-modelo de glicação *in vitro* (GUGLIUCCI et al., 2009; MEEPROM et al., 2013; SOMPONG et al., 2013). Portanto, este composto foi utilizado no presente estudo como um agente anti-glicação e/ou anti-AGE, na condição Controle Anti-glicação.

A Figura 9 representa o estudo da AG em quatro concentrações diferentes (0,1 mM, 0,6 mM, 1,0 mM e 5,0 mM), a fim de avaliar seu perfil de proteção na formação de AGE totais (estudo dose-resposta), bem como definir as concentrações dos fitoquímicos a serem utilizadas. De acordo com Rahbar et al. (2000), a capacidade da AG de reduzir os valores de fluorescência relativa à AGE está diretamente relacionada à concentração utilizada, de forma que maiores concentrações apresentam um melhor perfil de atividade anti-AGE. O resultado obtido respalda este princípio, pois observou-se que a AG apresentou comportamento concentração-dependente na promoção de redução de AGE no sistema (Figura 9).

Este resultado indica que o sistema-modelo de glicação *in vitro* é responsivo a intervenções que inibam as modificações na estrutura da albumina promovidas pela glicose.

Figura 9 – Intensidade de fluorescência (% em relação ao BSA) para estimativa de AGE no sistema-modelo de glicação *in vitro*, na ausência ou presença de AG.



% da intensidade de fluorescência obtida pela incubação de BSA (10 mg/mL); BSA (10 mg/mL) + GLI (0,5 M), na ausência ou presença de AG (0,1, 0,6, 1,0 ou 5,0 mM), após períodos de 7 e 14 dias. Fonte: própria autora, 2017.

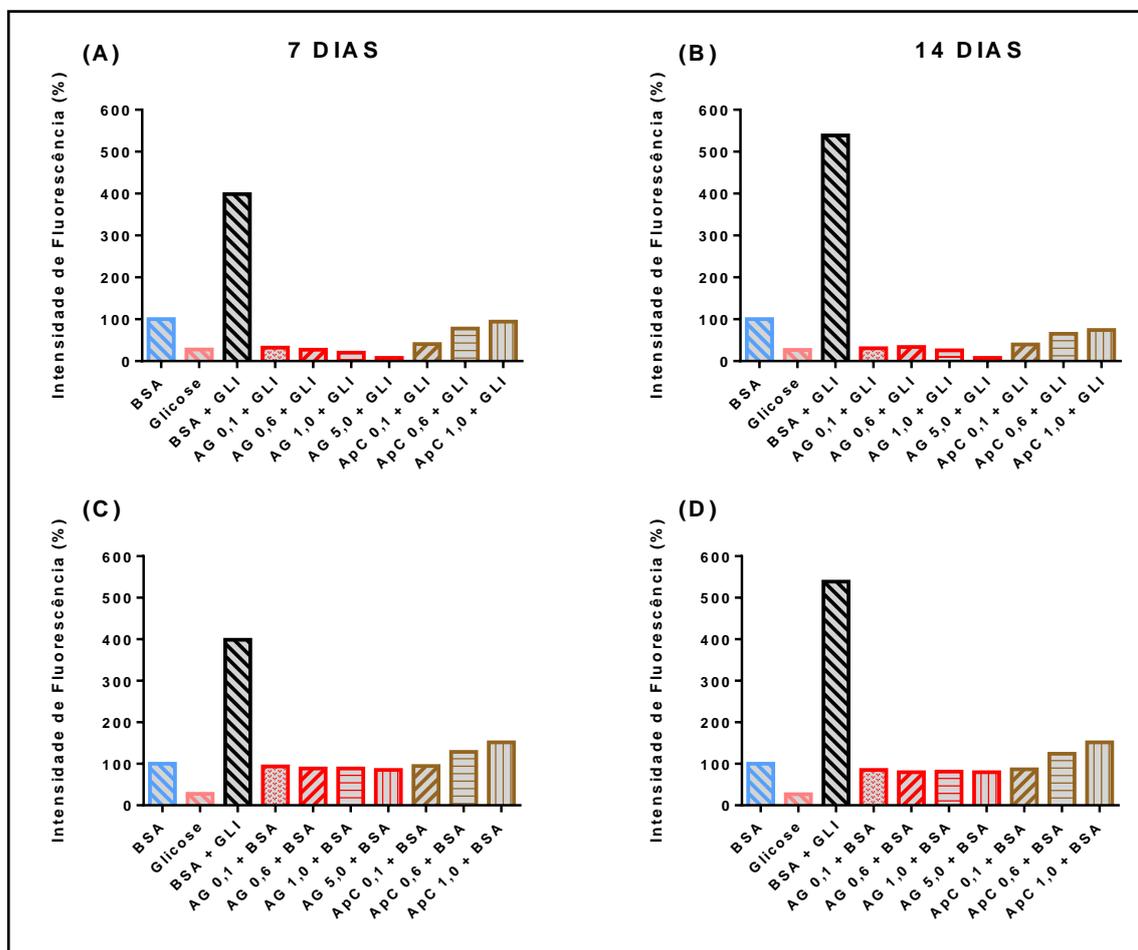
4.3. Estimativa de AGE totais na presença de ácido *p*-cumárico

Uma vez estabelecido o sistema-modelo *in vitro* de glicação e geração de AGE, foram analisadas diferentes concentrações do ApC (molécula precursora das demais moléculas estudadas), nas condições de Controle do Fitoquímico. Esta análise tornou-se necessária para a verificação de possíveis interferências do fitoquímico no método analítico utilizado, visto que a própria substância analisada poderia emitir fluorescência nos mesmos comprimentos de onda empregados, ou absorver a energia emitida pelo AGE em 430 nm após sua excitação à 355 nm.

A Figura 10 representa a análise de intensidade de fluorescência do sistema na presença do ApC e glicose (Figura 10 A e B) ou ApC e BSA (Figura 10 C e D). Quando feita uma comparação entre os perfis do ApC com os perfis da AG, observa-se que as maiores concentrações do fitoquímico apresentaram

valores de fluorescência aumentados, sugerindo certa interferência na metodologia utilizada.

Figura 10 – Intensidade de fluorescência (% em relação ao BSA) de ApC e AG na presença de glicose e na presença de BSA.



% da intensidade de fluorescência obtida pela incubação de AG (0,1; 0,6; 1,0; 5,0 mM); ApC (0,1; 0,6; 1,0 mM) **(A)** na presença de glicose (0,5 M), após período de 7 dias; **(B)** na presença de glicose (0,5 M), após período de 14 dias; **(C)** na presença de BSA (10 mg/mL), após período de 7 dias; **(D)** na presença de BSA (10 mg/mL), após período de 14 dias.

Fonte: própria autora, 2017.

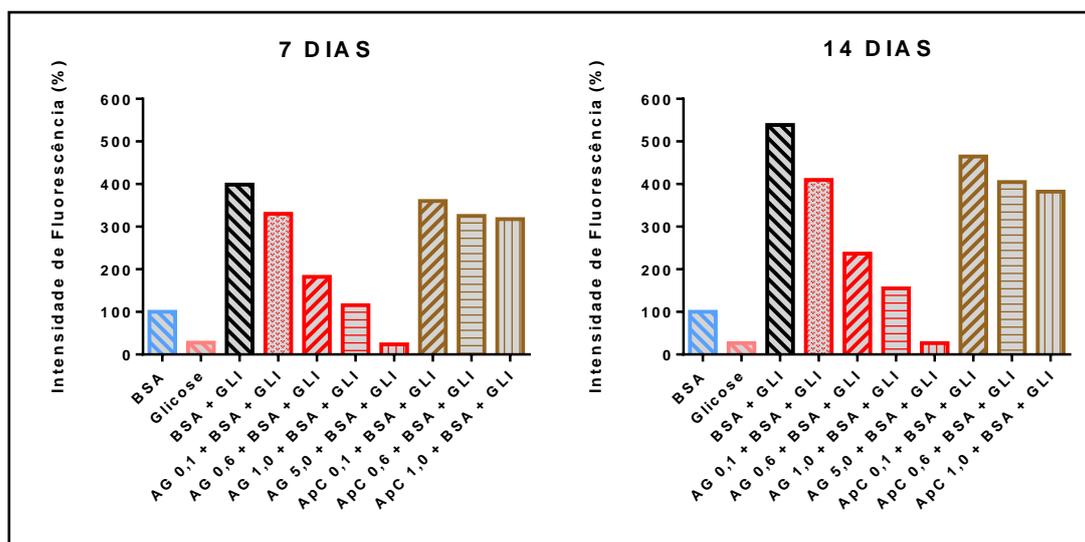
Foi realizada análise do ApC na condição Glicação + Fitoquímico (BSA + Glicose + ApC) para que seu possível potencial anti-AGE fosse avaliado. A Figura 11 representa essa situação: o fitoquímico, após ambos os períodos, apresentou baixa atividade em relação à redução na formação de AGE totais, de forma que, mesmo em sua mais alta concentração (1,0 mM), foi capaz de obter apenas ação similar à da menor concentração de AG (0,1 mM).

A partir destes resultados, percebe-se que o ApC apresenta altos valores de fluorescência basal e uma atividade anti-AGE não satisfatória.

Alguns estudos evidenciaram que os compostos derivados do ApC, por conta de suas substituições, aparentam apresentar maior atividade que a própria molécula precursora (POKORNY, 1987; CUVELIER, 1992).

Portanto, o presente estudo seguiu apenas com a análise dos fitoquímicos derivados do ApC: AC, AR, AF e CUR, a fim de estabelecer uma relação estrutura vs atividade entre eles.

Figura 11 – Intensidade de fluorescência (% em relação ao BSA) do ApC na condição Glicação + Fitoquímico.

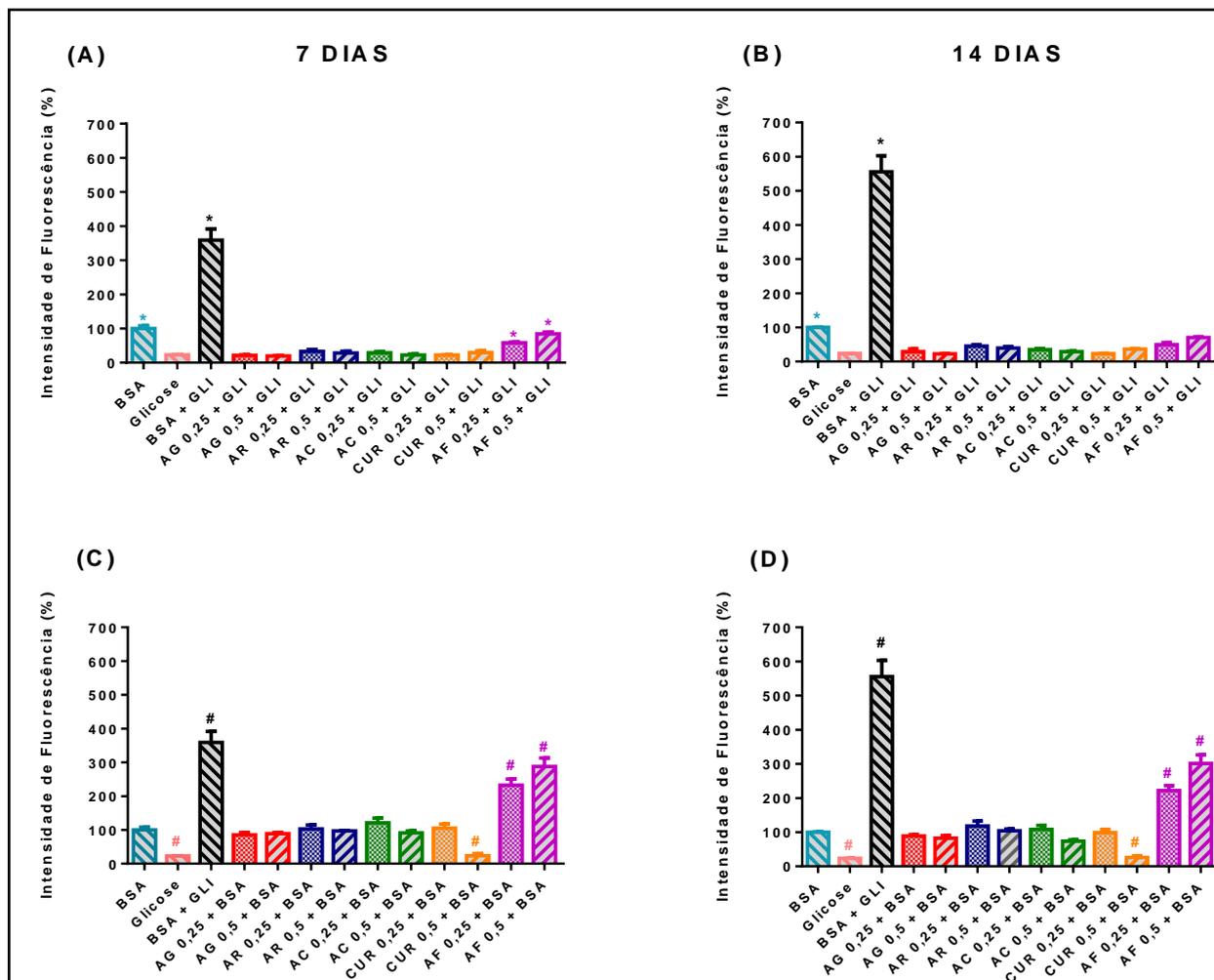


% da intensidade de fluorescência obtida pela incubação de AG (0,1; 0,6; 1,0; 5,0 mM); ApC (0,1; 0,6; 1,0 mM) na presença de BSA (10 mg/mL) + GLI (0,5 M), após períodos de 7 e 14 dias. Fonte: própria autora, 2017.

4.4. Determinação da formação de AGE totais na presença dos derivados do ácido *p*-cumárico

A Figura 12 representa a intensidade de fluorescência do sistema contendo fitoquímicos derivados do ApC e glicose (Figura 12 A e B) ou fitoquímicos derivados do ApC e BSA (Figura 12 C e D). A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que alguns compostos apresentaram resultados inesperados, indicativos de interferência: CUR 0,5 mM aparentou reduzir a emissão de fluorescência quando incubada apenas com BSA; AF 0,25 mM e 0,5 mM demonstrou aumentar a emissão de fluorescência quando incubado com BSA ou com glicose.

Figura 12 - Intensidade de fluorescência (% em relação ao BSA) de AG, AR, AC, CUR e AF na presença de BSA e na presença de glicose.



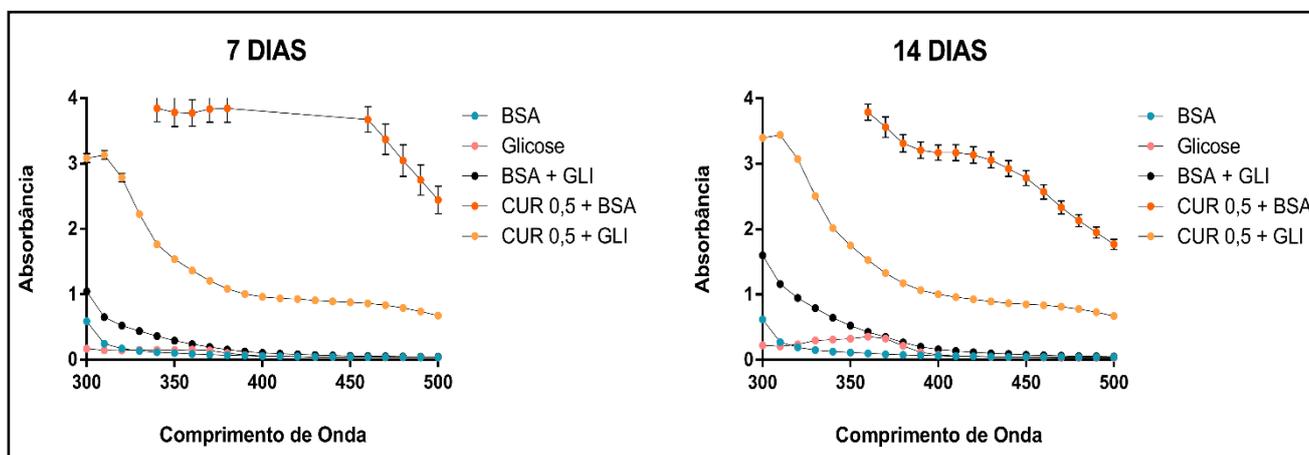
% da intensidade de fluorescência obtida pela incubação de AG (0,25; 0,5 mM); AR (0,25; 0,5 mM); AC (0,25; 0,5 mM); CUR (0,25; 0,5 mM); AF (0,25; 0,5 mM); **(A)** na presença de glicose (0,5 M), após período de 7 dias; **(B)** na presença de glicose (0,5 M), após período de 14 dias; **(C)** na presença de BSA (10 mg/mL), após período de 7 dias; **(D)** na presença de BSA (10 mg/mL), após período de 14 dias. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=2). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$ (One-Way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls). *, diferenças com Glicose; #, diferenças com BSA. Fonte: própria autora, 2017.

Por conta destes resultados, investigações foram feitas quanto ao perfil de absorção/emissão dos dois compostos:

A Figura 13 representa o perfil de absorção da CUR 0,5 mM na presença de BSA e glicose, após os períodos de 7 e 14 dias de incubação. O resultado sugere que a CUR, quando incubada com BSA, apresenta altos valores de absorbância no mesmo comprimento de onda utilizado na determinação do sinal de emissão de AGE totais (430 nm). Logo, seu evidente potencial anti-glicação observado anteriormente provavelmente é apenas uma

consequência dessa interferência, representando então um resultado falso-positivo.

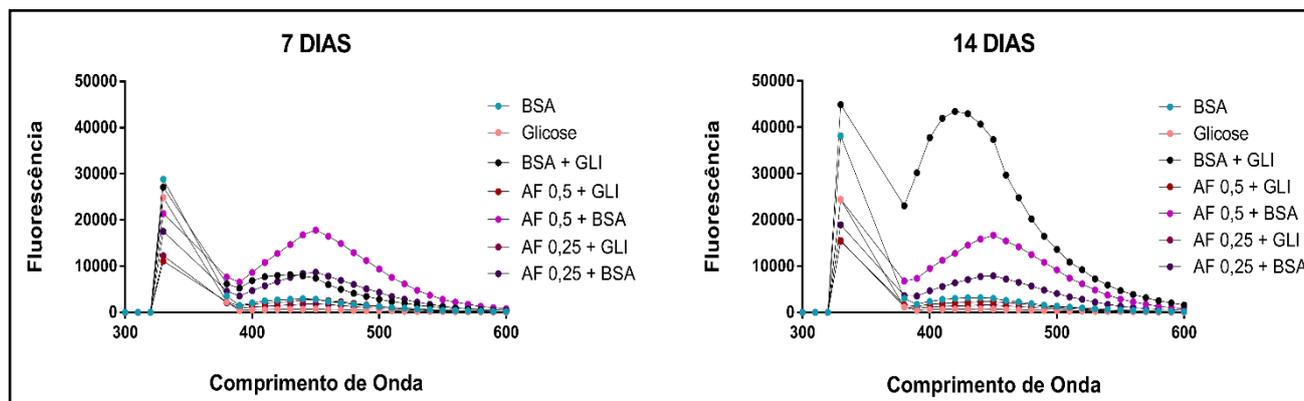
Figura 13 – Absorbância da CUR 0,5 mM na presença de BSA e/ou glicose.



Espectros de absorção obtidos pela incubação de CUR (0,5 mM) na presença de BSA (10 mg/mL) e/ou GLI (0,5 M), após períodos de 7 e 14 dias. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n = 2). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$ (One-Way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls). Fonte: própria autora, 2017.

A Figura 14 representa o perfil de emissão do AF (0,25 mM e 0,5 mM) na presença de BSA e glicose, após os períodos de 7 e 14 dias de incubação. O resultado indica que o AF, quando incubado com BSA, apresenta altos valores de emissão de fluorescência também em 430 nm. Essa situação pode dificultar a visualização de seu potencial anti-glicação, uma vez que aumenta a fluorescência para estimativa de AGE, representando então um resultado falso-negativo. Porém, é possível notar que, após o período de 14 dias, o AF promoveu uma redução significativa nos níveis de AGE em relação à Condição Glicação (+) (Figura 16). Este resultado sugere que o fitoquímico apresenta atividade anti-AGE, no entanto apenas tardiamente.

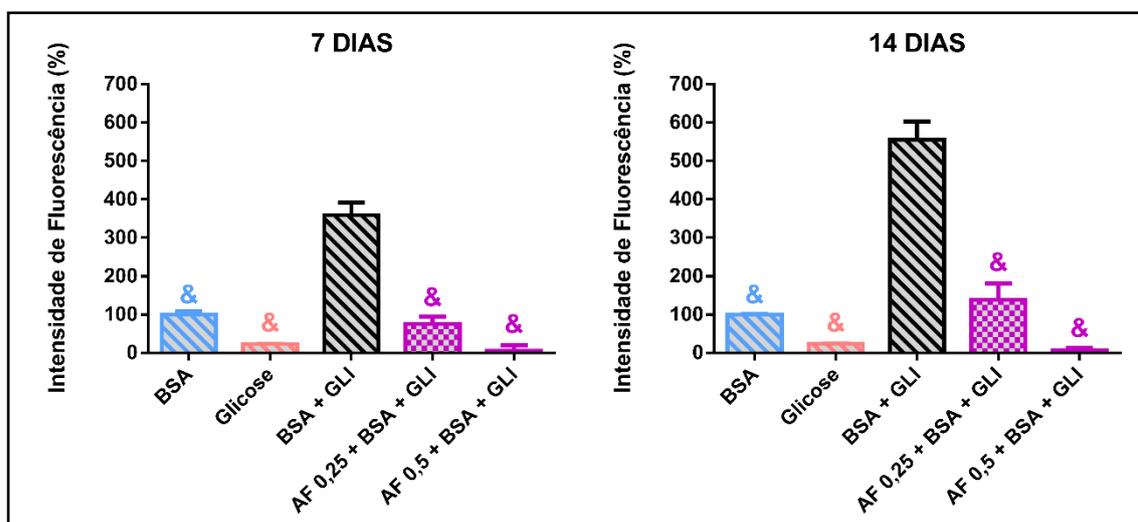
Figura 14 – Intensidade de fluorescência do AF 0,25 mM e 0,5 mM na presença de BSA e/ou glicose.



Espectros de emissão obtidos pela incubação de AF (0,25; 0,5 mM) na presença de BSA (10 mg/mL) e/ou GLI (0,5 M), após períodos de 7 e 14 dias. Os valores estão expressos como média \pm EPM ($n = 2$). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$ (One-Way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls). Fonte: própria autora, 2017.

Além disso, ao serem descontados os valores de fluorescência obtidos pelas condições Controle do fitoquímico (AF + BSA e AF + glicose) da condição Glicação + fitoquímico (AF + BSA + glicose), pode ser observado que o AF apresenta potencial anti-AGE, visto que foi capaz de reduzir os valores de fluorescência referentes aos AGE gerados no sistema-modelo de glicação (BSA + glicose) (Figura 15). Este resultado corrobora a literatura, que retrata o intenso potencial deste fitoquímico em relação às alterações resultantes da glicação proteica (dentre elas, a formação de AGE) (SILVÁN et al., 2011; SOMPONG et al., 2013), principalmente por conta de sua estrutura contendo grupamento metoxila na posição *orto* em relação à hidroxila do anel aromático (Figura 4) (CUVELIER, 1992).

Figura 15 - Intensidade de Fluorescência (% em relação ao BSA) de AF 0,25 mM e 0,5 mM na condição Glicação + fitoquímico, com os valores dos controles descontados.



% da intensidade de fluorescência obtida pela incubação de BSA (10 mg/mL); Glicose (0,5 M); BSA (10 mg/mL) + GLI (0,5 M) e AF (0,25; 0,5 mM) na presença de BSA (10 mg/mL) + GLI (0,5 M). Os valores estão expressos como média \pm EPM ($n = 2$), após períodos de 7 e 14 dias. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$ (One-Way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls). &, diferenças com BSA + GLI. Fonte: própria autora, 2017.

Tendo maior conhecimento sobre o tipo de interferência que a CUR e o AF apresentaram, foi dada continuidade ao estudo a partir da análise do potencial anti-glicação dos fitoquímicos derivados do ApC, comparando-os com o perfil de resposta do fármaco padrão, AG.

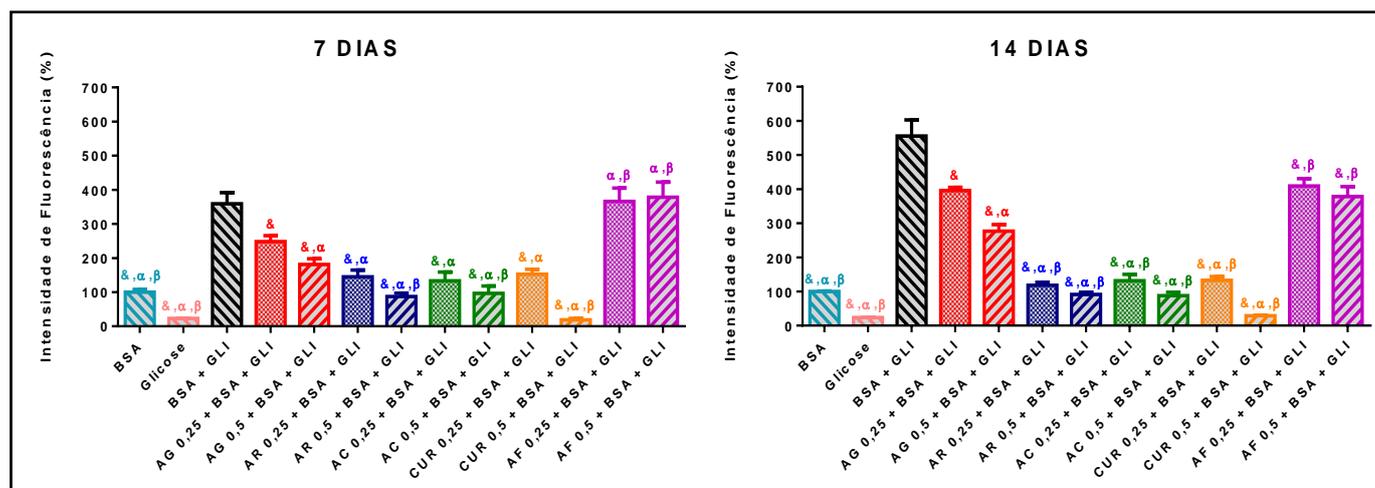
A Figura 16 representa o perfil dos compostos, quando incubados na condição Glicação Fitoquímico (BSA + glicose + fitoquímico). De modo geral, todos foram capazes de reduzir a formação de AGE totais no sistema após ambos os períodos de incubação, alguns de maneira até mais evidente que a AG (AR e AC). Este resultado respalda estudos que evidenciaram a eficácia dos fitoquímicos como compostos anti-AGE (SAJITHLAL et al., 1998; GUGLIUCCI et al., 2009; CAZZOLA et al., 2010; SOMPONG et al., 2013), representando potenciais coadjuvantes para a terapia convencional no tratamento do DM.

De acordo com Cuvelier et al. (1992), compostos hidroxilados (AC e AR) apresentam potencial antioxidante maior que os metoxilados (AF e CUR). Visto que a participação de reações oxidativas e a presença de ROS estão diretamente envolvidas no estresse glico-oxidativo, entende-se que o potencial antioxidante dos fitoquímicos esteja relacionado à prevenção da formação de

AGE (BOUSOVÁ et al., 2005; HARRIS et al., 2010). Os resultados obtidos corroboram parcialmente a literatura, pois as condições AR 0,25 mM, AR 0,5 mM, AC 0,25 mM e AC 0,5 mM (compostos hidroxilados) apresentaram potencial anti-AGE maior que as condições referentes ao AF (composto metoxilado), porém não houve uma maior eficácia em relação à CUR (Figura 16).

Ainda segundo Cuvelier et al. (1992), as moléculas duplicadas (AR e CUR) tendem a apresentar maior capacidade antioxidante quando comparadas às moléculas simples (AC e AF), fenômeno que pode ser observado em relação ao AF e a CUR, no entanto não é evidente na comparação AC e AR (Figura 16). Contudo, é válido ressaltar que as interferências apresentadas pelos fitoquímicos AF e CUR (Figuras 13 e 14) podem ter influenciado o desfecho deste ensaio.

Figura 16 – Intensidade de fluorescência (%) dos fitoquímicos derivados do ApC e da AG, na presença de BSA + glicose.



% da intensidade de fluorescência obtida pela incubação de AG (0,25; 0,5 mM); AR (0,25; 0,5 mM); AC (0,25; 0,5 mM); CUR (0,25; 0,5 mM); AF (0,25; 0,5 mM) na presença de BSA (10 mg/mL) + GLI (0,5 M), após períodos de 7 e 14 dias. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=2). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$ (One-Way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls). &, diferenças com BSA + GLI; α , diferenças com AG 0,25 + BSA + GLI; β , diferenças com AG 0,5 + BSA + GLI. Fonte: própria autora, 2017.

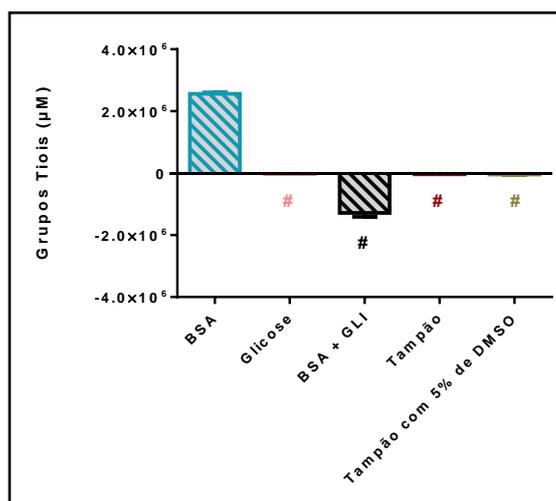
4.5. Quantificação de grupamentos tiol (sulfidrila)

A reação entre AGE e/ou seus produtos intermediários com as moléculas de BSA tem como consequência uma redução na quantidade de grupamentos tiol livres da proteína, resultando em um maior dano glico-

oxidativo ao sistema-modelo de glicação *in vitro* (THORNALLEY, 2007; MEEPROM et al., 2013). Sendo assim, tornou-se importante o monitoramento desses grupamentos para a prospecção do potencial protetor dos fitoquímicos. Conforme demonstrado nos resultados de estimativa de AGE totais, foi estabelecido que o melhor tempo de incubação para este estudo seria 14 dias, visto que o sinal analítico da condição Controle Glicação (+) foi mais evidente (Figura 8).

A Figura 17 demonstra o conteúdo de grupamentos tiol nas condições Controle Glicação (-) (BSA ou Glicose) e Controle Glicação (+), bem como dos solventes dos fitoquímicos (tampão fosfato e tampão fosfato + DMSO 5%). A condição Controle Glicação (+) apresentou uma quantidade relativamente menor de grupamentos -SH em relação à condição Controle Glicação (-) (BSA). Este resultado corrobora a literatura, que representa a perda desses grupos como uma consequência do dano oxidativo envolvido no fenômeno de glicação proteica (FAURE et al., 2005; ZENG et al., 2006; MEEPROM et al., 2013; SOMPONG et al., 2013). Os solventes utilizados no estudo não apresentaram influência no conteúdo de tiol do ensaio, visto que não apresentaram valores significativos de grupamentos sulfidril (Figura 17).

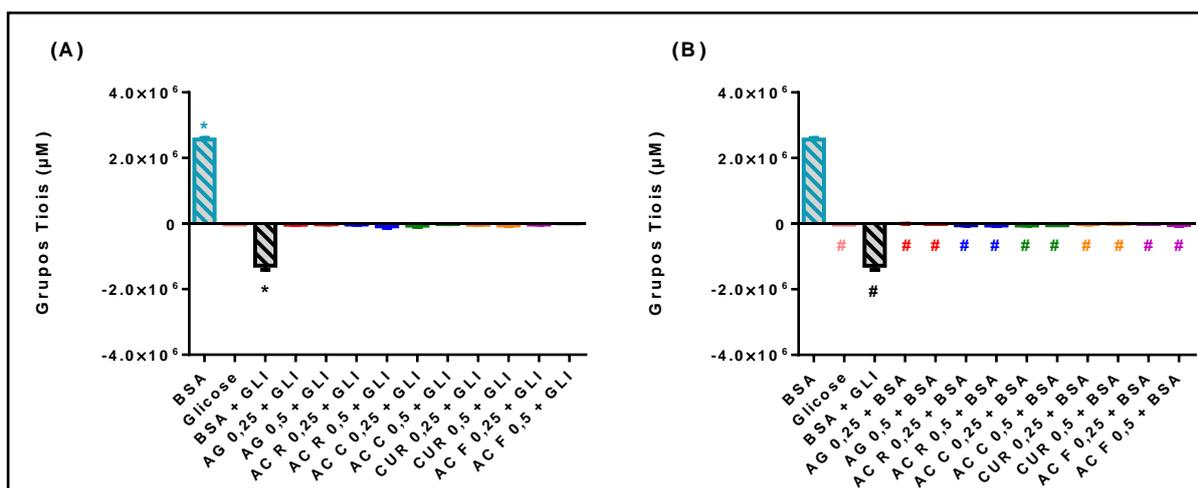
Figura 17 – Quantificação de grupamentos sulfidril no sistema-modelo de glicação *in vitro*.



Quantificação de grupamentos sulfidril obtida pela incubação de BSA (10 mg/mL); Glicose (0,5 M); BSA (10 mg/mL) + GLI (0,5 M); tampão fosfato (0,1 M) ou tampão fosfato (0,1 M) com 5% de DMSO. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=2), após período de 14 dias. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$ (One-Way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls). #, diferenças com BSA. Fonte: própria autora, 2017.

A Figura 18 representa as condições basais de análise do perfil dos fitoquímicos (Controle Fitoquímicos), ou seja, os próprios compostos incubados apenas com BSA ou glicose. Este resultado sugere que, na presença de glicose, os fitoquímicos não interferiram na metodologia utilizada para determinação de grupos tióis (Figura 18 A). Porém, na presença de BSA, é possível observar que todos os fitoquímicos apresentaram algum tipo de influência sobre o conteúdo de grupamentos tiol da proteína (Figura 18 B), inclusive a AG, pois foram capazes de reduzir o sinal analítico da condição Controle Glicação (-) (BSA).

Figura 18 – Quantificação de grupamentos sulfidríla das condições Controle Glicação (-), Controle Glicação (+), e Controle Fitoquímicos (compostos + BSA ou compostos + glicose).



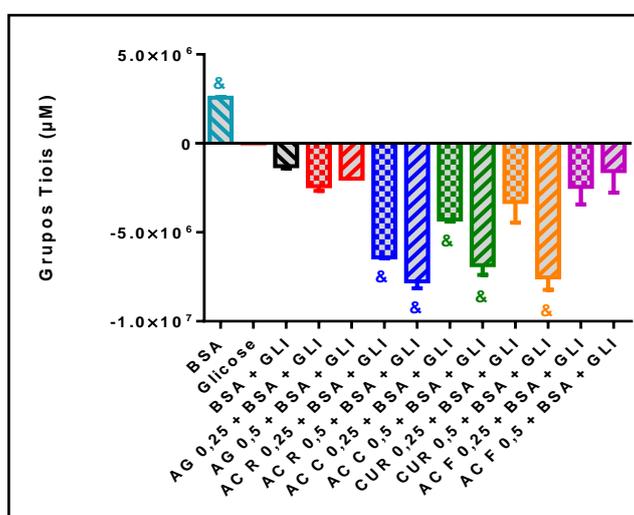
Quantificação de grupamentos sulfidríla obtida pela incubação de AG (0,25; 0,5 mM); AR (0,25; 0,5 mM); AC (0,25; 0,5 mM); CUR (0,25; 0,5 mM); AF (0,25; 0,5 mM) na presença de glicose (0,5 M) ou BSA (10 mg/mL), após período de 14 dias. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=2). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$ (One-Way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls). #, diferenças com BSA; *, diferenças com Glicose. Fonte: própria autora, 2017.

Considerando que a glicação da BSA resulta na redução dos grupamentos sulfidríla da proteína, espera-se que os fitoquímicos sejam capazes de reduzir/prevenir este evento para que apresentem potencial protetor, aumentando (ou até mesmo normalizando) o conteúdo de tiol da molécula. A Figura 19 representa o perfil dos compostos estudados quanto à concentração de grupos sulfidríla.

Apesar dos indícios referentes à capacidade de compostos antioxidantes e anti-glicação em prevenir a diminuição de grupamentos tióis de proteínas

(AHMED, 2005; MEEPROM et al., 2013; SOMPONG et al., 2013), os resultados deste estudo demonstram que nenhum dos fitoquímicos foi eficaz na proteção da redução de tais grupos no sistema de glicação *in vitro*, já que não apresentaram níveis mais altos que a condição Controle Glicação (+). Inclusive, é possível observar uma redução ainda maior do que BSA + GLI por alguns fitoquímicos (AR, AC e CUR 0,5 mM), confirmando a hipótese anterior de que há uma interferência dos compostos nesta metodologia (Figura 19).

Figura 19 - Quantificação de grupamentos sulfidrilas das condições Controle Glicação (-), Controle Glicação (+), e Glicação + Fitoquímicos.

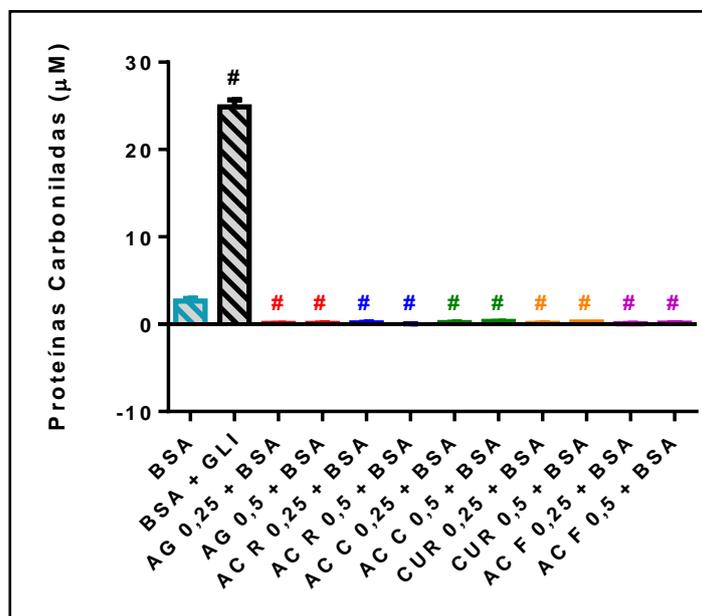


Quantificação de grupamentos sulfidrilas obtida pela incubação de AG (0,25; 0,5 mM); AR (0,25; 0,5 mM); AC (0,25; 0,5 mM); CUR (0,25; 0,5 mM); AF (0,25; 0,5 mM) na presença de BSA (10 mg/mL) + GLI (0,5 M), após período de 14 dias. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=2). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$ (One-Way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls). &, diferenças com BSA + GLI. Fonte: própria autora, 2017.

4.6. Quantificação de proteínas carboniladas (PCO)

Tendo em vista que o aumento de grupamentos carbonila pode ser uma consequência direta da oxidação proteica, a quantificação desses grupamentos no sistema-modelo de glicação também se tornou um importante marcador de dano glico-oxidativo (MEEPROM et al., 2013). A Figura 20 representa as condições basais de análise dos fitoquímicos (condição Controle Fitoquímicos), ou seja, dos próprios compostos incubados apenas com BSA. O resultado sugere que os fitoquímicos estudados interagiram com a própria proteína, reduzindo o sinal analítico basal da mesma.

Figura 20 - Quantificação de proteínas carboniladas das condições Controle Glicação (-), Controle Glicação (+), e Controle Fitoquímicos (compostos + BSA).



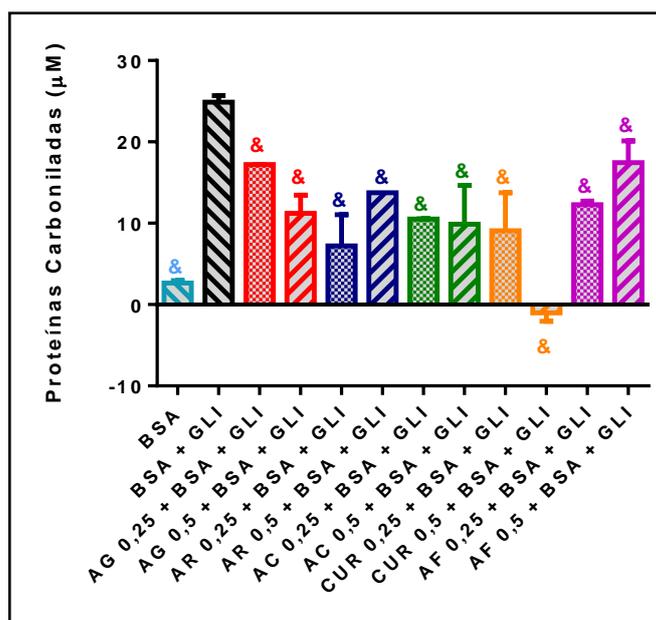
Quantificação de proteínas carboniladas obtida pela incubação de AG (0,25; 0,5 mM); AR (0,25; 0,5 mM); AC (0,25; 0,5 mM); CUR (0,25; 0,5 mM); AF (0,25; 0,5 mM) na presença de BSA (10 mg/mL), após período de 14 dias. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=2). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$ (One-Way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls) #, diferenças com BSA. Fonte: própria autora, 2017.

A Figura 21 representa os resultados referentes à quantificação de proteínas carboniladas nas incubações realizadas na presença de fitoquímicos e BSA + glicose, após o período de 14 dias. Todos os fitoquímicos apresentaram potencial protetor quando comparados com a condição Controle Glicação (+), sendo alguns fitoquímicos com potencial protetor até mais evidente que a AG (AR, AC e CUR 0,25 mM). Este resultado corrobora outros estudos que identificaram tal efeito reproduzido por compostos antioxidantes, tanto em modelos *in vivo* de patologias que apresentam aumento nos níveis de marcadores de lesão oxidativa (ARCARO et al., 2014; ASSIS et al., 2017) quanto de sistemas-modelo *in vitro* (MEEPROM et al., 2013; SOMPONG et al., 2013; HSIA et al., 2016; OU e HUANG et al., 2017).

Porém, o resultado referente à condição CUR 0,5 mM + BSA + glicose parece interferir no ensaio em questão, visto que foram obtidos valores negativos de absorbância. Assim como na quantificação de AGE totais, essa interferência pode ser explicada pelo alto perfil de absorção da CUR no mesmo comprimento de onda utilizado no ensaio (370 nm). É possível notar também

que, diferentemente da AG, os fitoquímicos não apresentaram um perfil dose-resposta, pois em nenhum dos casos a maior concentração (0,5 mM) obteve maior resposta de prevenção na formação de grupamentos carbonila, indicando que a atividade dos compostos não está diretamente relacionada ao aumento dessa relação.

Figura 21 – Quantificação de proteínas carboniladas das condições Controle Glicação (-), Controle Glicação (+), e Glicação + Fitoquímicos.



Quantificação de proteínas carboniladas obtida pela incubação de AG (0,25; 0,5 mM); AR (0,25; 0,5 mM); AC (0,25; 0,5 mM); CUR (0,25; 0,5 mM); AF (0,25; 0,5 mM) na presença de BSA (10 mg/mL) + GLI (0,5 M), após período de 14 dias. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=2). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$ (One-Way ANOVA seguido do teste Newman-Keuls). &, diferenças com BSA + GLI. Fonte: própria autora, 2017.

4.7. Determinação da massa de proteína a ser aplicada na separação eletroforética de proteínas em SDS-PAGE no estudo de *cross-linking*

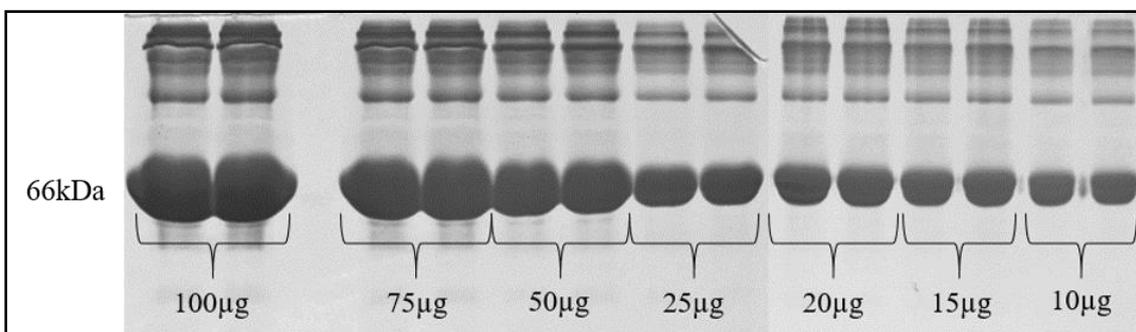
Visando a escolha de uma quantidade ideal de massa proteica para a visualização das bandas após separação eletroforética, foram testadas algumas massas de proteína (10, 15, 20, 25, 50, 75 e 100 µg) em gel do tipo acrilamida/bisacrilamida 10%.

A Figura 22 representa os perfis de separação eletroforética de proteínas nas diferentes massas aplicadas. Observando tais perfis, nota-se que, mesmo preparando-se uma solução que em teoria contém somente

albumina (banda que aparece em 66 kDa), bandas adicionais foram formadas no gel após a eletroforese, e acima da região de 66 kDa. A presença de tais bandas adicionais pode ser uma consequência do nível de pureza da albumina utilizada ($\geq 96\%$), significando, portanto, que esta pode conter até 4% de outras moléculas, incluindo proteínas. Porém, há também a hipótese de que a própria proteína seja capaz de se agregar, formando polímeros de maior peso molecular (BRAHMA et al., 2005; HSIA et al., 2016).

Considerando este resultado, foi tomada a decisão de que a menor quantidade de amostra, ou seja, 10 μg de proteína, seria a ideal para a visualização das bandas separadas na eletroforese. A partir da escolha da massa ideal de proteína para a continuidade dos estudos referentes à separação eletroforética, o mesmo procedimento foi realizado com as amostras incubadas por 14 dias. Cabe lembrar que a eletroforese foi conduzida em condições redutoras, isto é, as amostras aplicadas no gel foram antes preparadas na presença do tampão Laemmli (1:1).

Figura 22 – Bandas proteicas formadas após separação eletroforética do BSA em gel 10% e corado com *Coomassie blue*.



Bandas obtidas pela incubação de BSA (10 mg/mL), após período de 14 dias. Massas de BSA aplicadas no gel: 100, 75, 50, 25, 20, 15 e 10 μg . Fonte: própria autora, 2017.

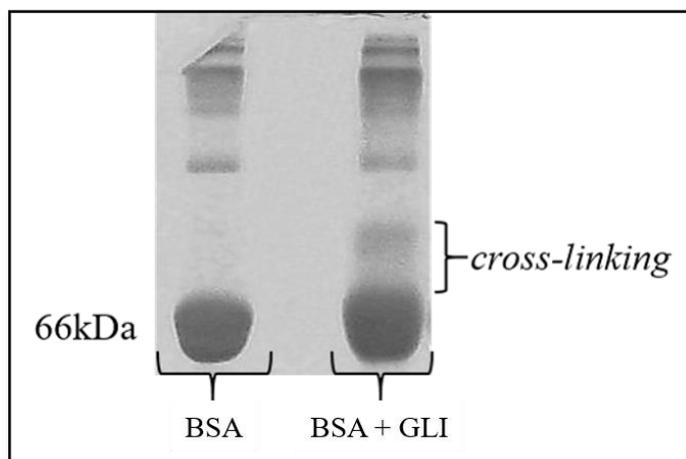
4.8. Verificação da formação de *cross-linking* em amostras de BSA incubadas na presença de glicose

A eletroforese do tipo SDS-PAGE foi empregada com o intuito de investigar a formação das ligações cruzadas (*cross-linking*) entre proteínas a partir da visualização de modificações na banda referente à BSA. Visto que essas ligações cruzadas são uma consequência das reações causadas por intermediários dicarbonílicos envolvidos no estresse glico-oxidativo, são

consideradas como consequências do processo de glicação avançada de proteínas (ULRICH e CERAMI, 2001; LIU e JING, 2016; HSIA et al., 2016). Sendo assim, a densidade referente à banda gerada pelo *cross-linking* está diretamente relacionada à intensidade de glicação proteica e eventos subsequentes.

A Figura 23 representa o estabelecimento do sistema-modelo de glicação *in vitro* após a coloração das proteínas nos géis com o corante *Comassie blue*. Este resultado sugere que o sistema-modelo foi capaz de promover alterações na estrutura da albumina que culminam na formação de *cross-linking*, pois quando comparadas as condições Controle Glicação (-) e Controle Glicação (+), é possível observar a formação de uma “nova banda”, mais espalhada, logo acima da posição usual da albumina (66 kDa). Este fenômeno representa o surgimento de ligações cruzadas entre proteínas (*cross-linking*) (LIU e JING, 2016; HSIA et al., 2016).

Figura 23 – Formação de *cross-linking*, condições Controle Glicação (-) e Controle Glicação (+).



Bandas obtidas pela incubação de BSA (10 mg/mL) e BSA (10 mg/mL) + GLI (0,5 M), após período de 14 dias. Fonte: própria autora, 2017.

4.9. Estudo da formação de *cross-linking* nos ensaios de glicação na ausência e na presença dos fitoquímicos

A Figura 24 representa as condições Glicação + Fitoquímicos após a coloração das proteínas nos géis com o corante *Comassie blue*. Este resultado sugere que, no geral, quando analisadas as condições Glicação + Fitoquímicos é possível observar uma diminuição no surgimento das ligações

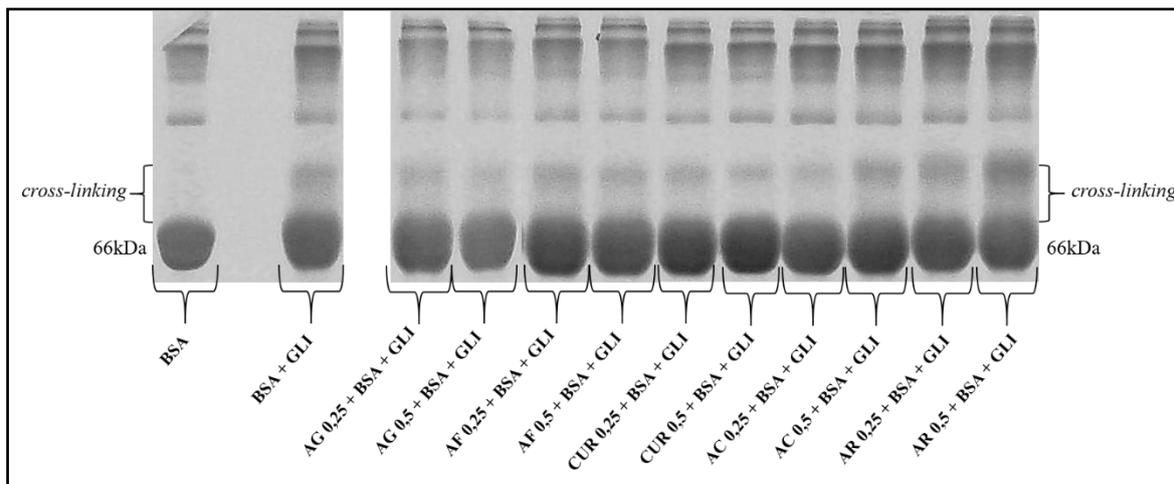
cruzadas entre proteínas, se comparadas com a condição Controle Glicação (+), efeito já investigado por estudos anteriores, sejam eles *in vivo* (SAJITHLAL et al., 1998; RAHBAR et al., 2000) ou *in vitro* (GUGLIUCCI et al., 2009; SOMPONG et al., 2013; HSIA et al., 2016).

A proteção gerada pelos tratamentos com os fitoquímicos pode ser melhor analisada através da representação gráfica da densitometria das bandas, demonstrada pela Figura 25.

De acordo com Fu et al. (1992), a presença de um composto com ação antioxidante eficaz resulta na prevenção do acúmulo de AGE, bem como reduz o *cross-linking* proteico. Sajithlal et al. (1998) investigaram este efeito a partir da quantificação de ligações cruzadas no colágeno de ratos diabéticos após a administração de CUR, observando que o fitoquímico foi capaz de prevenir tais ligações. Os resultados obtidos corroboram este estudo, visto que na presença de CUR (em ambas as concentrações empregadas), assim como da AG, há evidente redução na densidade da nova banda (referente ao cross-linking) em relação ao sistema BSA + GLI (Figura 25), sugerindo então que o composto seja capaz de evitar a formação de ligações cruzadas entre proteínas. O mesmo perfil foi observado em relação ao AF que, segundo Sompong et al. (2013), apresenta eficácia no controle da formação de agregados proteicos, devido à sua atividade antioxidante e anti-glicação.

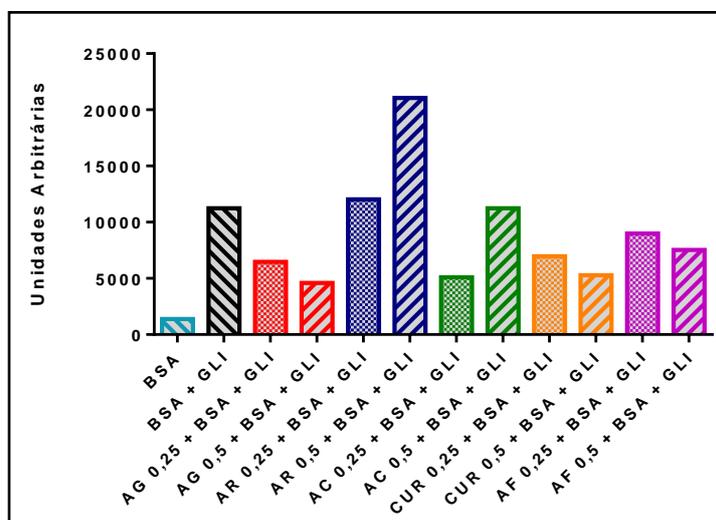
Conforme estudo desenvolvido por Gugliucci et al. (2009), no qual realizou-se incubação de BSA com metilglioxal (principal composto dicarbonílico envolvido na formação de *cross-linking*), foi demonstrado que o AC (0,5 mM, 1,0 mM e 2,0 mM) é capaz de atuar de forma concentração-dependente na prevenção do acúmulo de AGE, bem como na formação das ligações cruzadas entre proteínas. Porém, os resultados obtidos (Figura 25) sugerem que houve proteção apenas na concentração de 0,25 mM, indicando que possivelmente uma maior concentração do AC poderia interferir em sua eficácia. Já quanto ao AR, apesar de ter se comportado como um dos melhores fitoquímicos na proteção contra a formação de AGE totais, não aparentou prevenir o *cross-linking* em nenhuma das concentrações utilizadas, sendo formada a banda indicativo de ligações cruzadas de forma até mais evidente que a condição não protegida (BSA + glicose).

Figura 24 – Níveis proteicos das condições Controle Glicação (-), Controle Glicação (+), e Glicação + Fitoquímicos.



Bandas obtidas pela incubação de AG (0,25; 0,5 mM); AF (0,25; 0,5 mM); CUR (0,25; 0,5 mM); AC (0,25; 0,5 mM); AR (0,25; 0,5 mM) na presença de BSA (10 mg/mL) + GLI (0,5 M), após período de 14 dias. Fonte: própria autora, 2017.

Figura 25 – Variações na densitometria das bandas formadas durante separação eletroforética SDS-PAGE das condições Controle Glicação (-), Controle Glicação (+), e Glicação + Fitoquímicos.



Valores obtidos pela incubação de AG (0,25; 0,5 mM); AR (0,25; 0,5 mM); AC (0,25; 0,5 mM); CUR (0,25; 0,5 mM); AF (0,25; 0,5 mM) na presença de BSA (10 mg/mL) + GLI (0,5 M), após período de 14 dias. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias. Fonte: própria autora, 2017.

5. CONCLUSÃO

Todos os fitoquímicos derivados do ApC foram capazes de promover algum tipo de efeito protetor importante quando submetidos a um sistema-modelo de glicação de albumina *in vitro* (inibição da formação de AGE totais, de proteínas carboniladas e/ou de *cross-linking* proteico). O ensaio de quantificação de grupamentos tiol não obteve resultados fundamentados, pois até mesmo a AG (um agente anti-glicação já conhecido) aparentou interferir na metodologia utilizada.

A partir da análise estrutural dos compostos derivados do ApC, ressalta-se que alguns aspectos químicos podem estar relacionados com os diferentes perfis anti-glicação observados, visto que as moléculas mais hidroxiladas (AC e AR) apresentaram melhor atividade preventiva quanto à formação de AGE totais e PCO, enquanto que as mais metoxiladas (AF e CUR) obtiveram melhor ação protetora em relação à geração de *cross-linking* proteico.

Com base na comparação entre as moléculas simples (AC e AF) com suas respectivas moléculas duplicadas (AR e CUR), pode ser sugerido que: *i*) há uma pequena diferença entre AC e AR quanto à separação eletroforética, de modo que a molécula simples tenha demonstrado melhor atividade (principalmente na concentração de 0,25 mM); *ii*) há diferenças entre AF e CUR quanto à formação de AGE totais e PCO, de forma que a molécula duplicada tenha apresentado melhor atividade (porém este resultado pode ter sofrido influência dos perfis de absorção da CUR e emissão do AF).

Com exceção da quantificação de grupamentos tiol, os métodos utilizados foram responsivos às alterações originadas pelo estresse glicoxidativo neste estudo inicial de prospecção de fitoquímicos; contudo tornam-se necessários maiores avanços quanto ao potencial destes compostos, que poderão ser futuramente empregados como coadjuvantes na terapia convencional utilizada para o tratamento do DM, objetivando prevenção/atenuação das complicações associadas ao estresse glicoxidativo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, G. et al. Antiglycation therapy: Discovery of promising antiglycation agents for the management of diabetic complications. **Pharm Biol**, 54(2), 198-206, 2016.

AHMED, N. Advanced glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract**, 67, 3-21, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, 37(1), S14-S80, 2014.

ANDREASEN, M. F. et al. Antioxidant effects on phenolic rye (*Secale cereal L.*) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. **J Agric Food Chem**, 49(8), 4090-6, 2001.

ARCARO, A. A. et al. Piperine, a Natural Bioenhancer, Nullifies the Antidiabetic and Antioxidant Activities of Curcumin in Streptozotocin-Diabetic Rats. **Plos One**, 9(12), 1-21, 2014.

ARDESTANI, A. et al. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *teucrium polium* on in vitro protein glycooxidation. **Food Chem Toxicol**, 45, 2402-11, 2007.

ASSIS, R. P. et al. Combined Effects of Curcumin and Lycopene or Bixin in Yoghurt on Inhibition of LDL Oxidation and Increases in HDL and Paraoxonase Levels in Streptozotocin-Diabetic Rats. **Int J Mol Sci**, 18, 332, 2017.

BARBOSA, J. et al. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGE) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 52(6), 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29(1), 113-23, 2006.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic Complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, 48(1), 1-9, 1999.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. Glucose and reactive oxygen species. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 5(5), 561-8, 2002.

BRAHMA, A. et al. Characterization of a dimeric unfolding intermediate of bovine serum albumin under mildly acidic condition. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1751(2), 159-69, 2005.

BRASIL. Sociedade Brasileira de Diabetes. XII Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2016. Disponível em: <<http://bibliofarma.com/diretrizes-sbd-2015-2016/>>. Acesso em 10 de agosto de 2017.

CAZZOLA, R.; CAMEROTTO, C.; CESTARO, B. Anti-oxidant, anti-glycant, and inhibitory activity against α -amylase and α -glucosidase of selected spices and culinary herbs. **Int J Food Sci Nutr**, 62(2), 175-84, 2011.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **J Sci Food Agric**, 80, 1033-43, 2000.

COS, P. et al. *In Vitro* Antioxidant Profile of Phenolic Acid Derivatives. **Free Radical Research**, 36, 711-16, 2002.

COURDEROT-MASUYER, C. et al. Antioxidant properties of aminoguanidine. **Fundam Clin Pharmacol**, 13, 535-40, 1999.

CUVELIER, M. et al. Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 56(2), 324-5, 1992.

DONNELLY, R. et al. ABC of arterial and venous disease: Vascular complications of diabetes. **British Medical Journal**, 320(7241), 1062-66, 2000.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, 82(1), 70-7, 1959.

FU, M. X. et al. Role of oxygen in cross-linking and chemical modification of collagen by glucose. **Diabetes**, 4(2), 42-8, 1992.

GOH, S. Y. et al. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, 93, 1143-52, 2008.

HO, S. et al. Comparison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. **Food Chem**, 122, 768-74, 2010.

HSIA, S. M. et al. Capsaicin, an active ingredient from chilli peppers, attenuates glycativ stress and restores sRAGE levels in diabetic rats. **J Funct Foods**, 21, 406-17, 2016.

HUANG, M. T. et al. Inhibitory effects of curcumin on *in vitro* lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. **Cancer Res**, 51, 813-9, 1991.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas. 7^a Edição, 2015. Bélgica. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas>>. Acesso em 10 de setembro de 2017.

KARLI, R. et al. Analysis of the Protective Biochemical and Pathologic Effects of Aminoguanidine on an Experimental Aspiration Pneumonitis Model Induced by Bile Acids. **Current Therapeutic Research**, 73(6), 207-19, 2012.

KIM, J. H. et al. Curcumin stimulates glucose uptake through AMPK-p38 MAPK pathways in L6 myotube cells. **J Cell Physiol**, 223(3), 771-8, 2010.

KONIEV, O.; WAGNER, A. Developments and recent advancements in the field of endogenous amino acid selective bond forming reactions for bioconjugation. **Chem. Soc. Rev.**, 44, 5495-551, 2015.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, 27(4), 969-78, 1988.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, 233, 346-57, 1994.

LIU, J.; JING, H. Glycation of bovine serum albumin with monosaccharides inhibits heat-induced protein aggregation. **RSC Adv.**, 6, 115183-88, 2016.

LUCERI, C. et al. *p*-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity *in vitro* and *in vivo*. **British Journal of Nutrition**, 97, 458-63, 2007.

LYONS, T. J.; JENKINS, A. J. Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of the complications of diabetes: a carbonyl stress hypothesis. **Diabetes Rev (Alex)**, 5(4), 365-91, 1997.

MEEPROM, A. et al. Isoferulic Acid, a New Anti-Glycation Agent, Inhibits Fructose and Glucose-Mediated Protein Glycation *in Vitro*. **Molecules**, 18(6), 6439-54, 2013.

NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications. **Antioxid Redox Sgnial**, 11, 3071-109, 2009.

OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, 2, 411-29, 2014.

OU, J.; HUANG, J. et al. Effect of rosmarinic acid and carnosic acid on AGE formation *in vitro*. **Food Chem**, 221, 1057-61, 2017.

POKORNY, J. Autoxidation of Unsaturated Lipids. **Academic Press**, 141-206, London, 1987.

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

RAMANAKOPPA, H. N. et al. Protein Cross-linking by the Maillard Reaction: isolation, characterization, and *in vivo* detection of a lysine-lysine cross-link derived from methylglyoxal. **J Biol Chem**, 271(32), 19338-45, 1996.

REDDY, A. C. P.; LOKESH, B. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous ion. **Mol Cell Biochem**, 137, 1-8, 1994.

RICE-EVANS, C. A. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad Biol Med**, 20(7), 933-56, 1996.

RODRIGUEZ, A. et al. Establishment of a yeast platform strain for production of p-coumaric acid through metabolic engineering of aromatic amino acid biosynthesis. **Metabolic Engineering**, 31, 181-8, 2015.

SAJITHLAL, G. B. et al. Effect of Curcumin on the Advanced Glycation and Cross-linking of Collagen in Diabetic Rats. **Biochem Pharmacol**, 56, 1607-14, 1998.

SEDLAK, J., LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellmann's reagent. **Anal Biochem**, 25(1), 192-205, 1968.

SÉRO, L. et al. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. **Molecules**, 18, 14320-39, 2013.

SHAN, B. et al. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. **J Agric Food Chem**, 53, 7749-59, 2005.

SHARMA, O. P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. **Biochem Pharmacol**, 25, 1811-2, 1976.

SILVÁN, J. M. et al. Control of Maillard reaction by ferulic acid. **Food Chem**, 128, 208-13, 2011.

SINGH, V. P. et al. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. **Korean J Physion Pharmacol**. 18, 1-14, 2014.

SOMPONG, W.; MEEPROM, A. et al. A Comparative Study of Ferulic Acid on Different Monosaccharide-Mediated Protein Glycation and Oxidative Damage in Bovine Serum Albumin. **Molecules**, 18, 13886-903, 2013.

SRIVASTAVA, R.; SRIMAL, R. C. Modification of certain inflammation induced biochemical changes by curcumin. **Ind J Med Res**, 81, 215-23, 1985.

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

THORNALLEY, P. J. Dietary AGE and ALEs and risk to human health by their interaction with the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) – an introduction. **Mol Nutr Food Res**, 51, 1107-10, 2007.

ULRICH, P.; CERAMI, A. Protein Glycation, Diabetes, and Aging. **Recent Prog Horm Res**, 56, 1-21, 2001.

VINSON, J. A.; HOWARD, T. B.; Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. **J Nutr Biochem**, 7, 659-63, 1996.

YAMAGISHI, S. et al. Agents that block advanced glycation end product (age)-rage (receptor for ages)-oxidative stress system: A novel therapeutic strategy for diabetic vascular complications. **Expert Opin Investig Drugs**, 17, 983-96, 2008.

ZANG, L. et al. Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. **Am J Physiol Cell Physiol**, 279, 954-60, 2000.

ZENG, J. et al. Evidence for inactivation of cysteine proteases by reactive carbonyls via glycation of active site thiols. **Biochem J**, 398, 197-206, 2006.