

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS A.C SIMÕES
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

FELIPE CABRAL DA SILVA

**POTÊNICAL BIOTENOLÓGICO DOS DERIVADOS DE AMINOGUANIDINA NA
INIBIÇÃO DOS ESTRESSES OXIDATIVO E CARBONÍLICO**

MACEIÓ-AL

2022

FELIPE CABRAL DA SILVA

**POTÊN-CIAL BIOTENOLÓGICO DOS DERIVADOS DE AMINOGUANIDINA NA
INIBIÇÃO DOS ESTRESSES OXIDATIVO E CARBONÍLICO**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Química do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Química.

**Orientador: Prof. Dr^a Jadriane de Almeida
Xavier dos Santos**

MACEIÓ-AL

2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586p Silva, Felipe Cabral da.
Potencial biotecnológico dos derivados de aminoguanidina na inibição dos estresses oxidativo e carbonílico / Felipe Cabral da Silva. – 2022.
47 f. : il.

Orientadora: Jadriane de Almeida Xavier.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química: Licenciatura) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 45-47.

1. Aminoguanidinas. 2. Antiglicantes. 3. Estresse carbonílico. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

CDU: 547.495.9:604.2



ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE TCC - IQB

1. Data da apresentação do TCC: 12/12/2022

2. Aluno / matrícula: FELIPE CABRAL DA SILVA

3. Orientador(es) / Unidade Acadêmica:
JADRIANE DE ALMEIDA XAVIER DOS SANTOS
MARÍLIA OLIVEIRA FONSECA GOULART

4. Banca Examinadora (nome / Unidade Acadêmica):

JADRIANE DE ALMEIDA XAVIER DOS SANTOS	(Presidente)	Nota: 09
JARA BARROS VALENTIM	(1º avaliador)	Nota: 09
EDEILDO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR	(2º avaliador)	Nota: 09
	(3º avaliador)	Nota: _____

5. Título do Trabalho:

POTÊNCIAL BIOTENOLÓGICO DOS DERIVADOS DE AMINOGUANIDINA NA INIBIÇÃO DOS ESTRESSES OXIDATIVO E CARBONÍLICO

6. Local: LABORATÓRIO DE ELETROQUÍMICA E ESTRESSE OXIDATIVO - NÚCLEO DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR (SEVERINÃO)

7. Apresentação: Horário início: 14:07 Horário final: 14:37
Arguição: Horário início: 14:40 Horário final: 16:40

8. Nota final: 09

9. Justificativa da nota. Em caso de APROVAÇÃO COM RESTRIÇÕES, indicar as principais alterações que devem ser efetuadas no trabalho para que o mesmo venha a ser aprovado.

Em sessão pública, após exposição do seu trabalho de TCC por cerca de _____ minutos, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca por _____ sessenta (60) minutos, tendo como resultado:

APROVADO

APROVADO COM RESTRIÇÕES – mediante modificações no trabalho que foram sugeridas pela banca como condicional para aprovação.

NÃO APROVADO.



Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)

Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,
Maceió-AL, 57072-970, Brasil.

www.iqb.ufal.br // Tel: (82) 3214-1384/1189



Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo candidato:

Maceió, 12 de DEZEMBRO de 2022

Presidente: JADRIANE DE ALMEIDA XAVIER DOS SANTOS

1º Avaliador: IARA BARROS VALENTIM

2º Avaliador: EDEILDO FERREIRA DA SILVA JÚNIOR

3º Avaliador: _____

Candidato: FELIPE CABRAL DA SILVA

Documento assinado digitalmente
 FELIPE CABRAL DA SILVA
Data: 13/12/2022 14:21:54-0300
Verifique em <https://verificador.it.br>

Documento assinado digitalmente
 EDEILDO FERREIRA DA SILVA JUNIOR
Data: 13/12/2022 10:29:38-0300
Verifique em <https://verificador.it.br>

Documento assinado digitalmente
 JADRIANE DE ALMEIDA XAVIER DOS SANTOS
Data: 02/02/2023 18:44:29-0300
Verifique em <https://verificador.it.br>

Documento assinado digitalmente
 IARA BARROS VALENTIM
Data: 13/12/2022 13:22:50-0300
Verifique em <https://verificador.it.br>

Deem graças em todas as circunstâncias, pois esta é a vontade de Deus para vocês em Cristo Jesus. 1 Tessalonicenses 5:18.

AGRADECIMENTOS

Deus nos amou de tal maneira que deu seu filho unigênito para salvar a todos nós, por um ato de tamanho amor, vem meu sincero agradecimento a Deus, obrigado por ter me dado a dádiva da vida e ter me colocado no meio de pessoas tão especiais, sem ti eu não sou ninguém, obrigado pela sua infinita graça e misericórdia.

Meu imenso agradecimento a Ivonete Maria da Silva Aquino, que tenho a honra de ser filho, muito obrigado por todo seu esforço e dedicação, você foi mãe e pai, foi meu porto seguro e nunca mediu esforços para me dar uma educação de qualidade, eu tenho orgulho de ser teu filho e mais orgulho ainda da senhora ser uma mulher guerreira, forte e corajosa. Tenho muito a caminhar, mas que no final de minha jornada eu possa ser um espelho para meu filho, como a senhora foi para mim. Obrigado por tudo mãe, eu te amo!

Agradeço a minha esposa Jael Alves da Silva Cabral, em que tenho a honra de ser seu companheiro, obrigado por todo amor, todo puxão de orelha e apoio que você me deu a longo desta caminhada. Sou grato pela vida da Maria Claudioneide da Silva Neves que foi como uma segunda mãe, uma mulher que é exemplo de fé e serviço com a obra de Deus, muito obrigado por todo apoio e incentivo.

Obrigado a Professora Dr^a Jadriane de Almeida Xavier, uma mulher muito inteligente, carinhosa e atenciosa com todos, sem seu apoio e cuidado eu não teria chegado ao final deste ciclo, você é uma pessoa muito especial na minha vida, obrigado por todo incentivo e oportunidades que me concedeu, você foi além das barreiras entre aluno e professor, você é uma amiga!

Agradeço imensamente por toda colaboração e oportunidades que a Professora Dr^a Marília Oliveira Fonseca Goulart me concedeu, uma mulher que é exemplo para todos, que me acolheu e me ajudou na caminhada, muito obrigado professora.

Agradeço a Lucas, Tauane, Ana Beatriz, Aline, Dave e André Xavier, companheiros de laboratório com os quais pude aprender muito, resenhar bastante e principalmente fofocar da vida dos outros, muito obrigado.

Um agradecimento especial a uma mulher mais que inteligente, uma amiga que o laboratório me deu, sem você eu não conheceria nada de Recife, muito obrigado Andressa Katherine por todo apoio e incentivo.

E por fim agradeço todos os professores do Instituto de Química e Biotecnologia, que contribuíram para a minha formação.

RESUMO

O consumo de açúcares tem aumentado progressivamente ao longo das últimas décadas, devido à ingestão de alimentos industrializados de redes fast-food, refrigerantes, entre outros. Com base nisso, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e espécies carbonílicas reativas cresceu proporcionalmente ao consumo. Essas espécies têm mecanismos de ação capazes de provocar alterações irreversíveis nas estruturas de proteínas e em diversas biomoléculas, provocando o estresse oxidativo e carbonílico. O objetivo deste estudo é a investigação do potencial inibitório da glicação e potencial antioxidante, de derivados de aminoguanidina. A capacidade antioxidante dos derivados de aminoguanidina foram mensuradas pela captura de ácido hipocloroso (HOCl) e ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A avaliação antiglicante foi mensurada tanto nos estágios iniciais pela glicação da albumina de soro bovino (BSA) na presença de Glicose/Frutose e no estágio intermediário, pela captura de metilglioxal. Todos os derivados apresentaram capacidade antioxidante, no entanto são mais ativos frente o HOCl, com destaque para as LQMs 55, 103, 130 e 137 que apresentaram os melhores resultados nos dois ensaios antioxidantes aplicados. Destas, as duas mais promissoras tem sido a LQM 55 e LQM 137, pois também apresentaram os melhores resultados para os ensaios antiglicantes, com valores de IC_{50} de 60,5 e 33,6 μM , para o estágio inicial, e de 70,5 e 65,3, para o estágio intermediário da glicação, respectivamente. Desta forma, as amostras LQM 55 e LQM 137 possuem maior potencial de atuação frente aos estresses carbonílico e oxidativo, no entanto mais estudos devem ser realizados inclusive relacionados a toxicidade das amostras.

Palavras-chave: Aminoguanidina, Antiglicante. Estresse Carbonílico, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

The consumption of sugars has been progressively increasing over the last few decades, due to the intake of processed foods from fast food chains, soft drinks, among others. Based on this, the accumulation of reactive oxygen species and reactive carbonyl species has grown proportionally to the consumption. These species have action mechanisms capable of causing irreversible changes in protein structures and various biomolecules, causing oxidative and carbonyl stress. The purpose of this study is to investigate the inhibitory potential of glycation and the antioxidant potential of aminoguanidine derivatives. The antioxidant capacity of the aminoguanidine derivatives was measured by capturing hypochlorous acid (HOCl) and superoxide radical anion ($O_2^{\cdot-}$). The antiglycation evaluation was measured both in the initial stages by glycation of bovine serum albumin (BSA) in the presence of glucose/fructose and in the intermediate stage by capturing methylglyoxal. All derivatives showed antioxidant capacity; however, they are more active against HOCl, with emphasis on LQMs 55, 103, 130, and 137, which showed the best results in the two antioxidant assays applied. Of these, the two most promising are LQM 55 and LQM 137, as they also showed the best results for the antiglycation assays, with IC₅₀ values of 60.5 and 33.6 μ M for the initial stage and 70.5 and 65.3 for the intermediate stage of glycation, respectively. Thus, samples LQM 55 and LQM 137 have greater potential for acting against carbonyl and oxidative stress, however, further studies should be carried out, including those related to sample toxicity.

Keywords: Aminoguanidine, Glycation. Carbonyl Stress, Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da interação da Aminoguanidina com outros compostos.	17
Figura 2 - Representação do Estágio Inicial da Reação de Maillard.....	19
Figura 3 - Representação do Estágio Intermediário da Reação de Maillard.....	20
Figura 4 - Representação das moléculas fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina e guanil nucleotídeos do DNA.	21
Figura 5 - Representação dos Principais AGEs formados na Reação de Maillard.....	22
Figura 6 - Representação da reação de formação de ERCs pela via Namiki.	23
Figura 7 - Representação da reação de formação de ERCs pela rota de Wolff.	24
Figura 8 - Representação das Estruturas de espécies carbonílicas mais encontradas em meio biológico.	24
Figura 9 - Representação das espécies carbonílicas classificadas em fontes endógenas e exógenas..	25
Figura 10 - Representação da reação de formação Metilglioxal (MG) pela via da glicólise.	25
Figura 11 - Relação entre os produtos de glicação avançada (AGEs) e as doenças.....	26
Figura 12 - Representação dos Inibidores de AGEs nos estágios da reação de Maillard.....	29
Figura 13 - Retrosíntese do esqueleto base das guanil-hidrazonas.....	30
Figura 14 - Representação da reação entre orto-fenilendiamina e metilglioxal.	34
Figura 15 - Representação da formação de ácido hipocloroso e atuação com a sonda Dihydrorhodamina	34
Figura 16 - Representação da formação de ânion radical superóxido e ação de um antioxidante presente no meio.	35
Figura 17 - Representação das amostras testadas.....	37
Figura 18 - Representação das alterações nas amostras testadas.	38
Figura 19 - Representação dos dados obtidos no ensaio de captura de OPD.	43
Figura 20 - Cromatogramas das amostras testadas.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Representação dos receptores dos AGEs.	27
Tabela 2 - Representação da Estrutura Química e Nomenclatura dos Derivados Aminoguanidínicos.	30
Tabela 3 - Equipamentos utilizados nos testes.	31
Tabela 4 - Reagentes utilizados nos testes.	32
Tabela 5 - Representação dos dados obtidos no método de avaliação antiglicante no estágio inicial.	36
Tabela 6 - Representação dos dados obtidos para avaliação da glicação no estágio intermediário.	39
Tabela 7 - Representação dos dados antioxidantes via eliminação do ácido hipocloroso.	40
Tabela 8 - Representação dos dados obtidos no ensaio do ânion radical superóxido.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3-DG - 3-desoxiglucozona
- AFLD - Doença Hepática Gordurosa Alcoólica
- AGEs - Advanced Products Glycation
- BSA - Albumina Sérica Bovina
- CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
- CMhL - Carboximetil Hidroxi-lisina
- CML - Carboximetil-lisina
- CO₂ - Dióxido de Carbono
- DHR - Dihidrorodamina
- DNA - Ácido Desoxiribonucleico
- DOLD - Dímero 3-dexoglicosona Lisina
- ECM - Matriz Extracelular
- ECRs - Espécies Carbonílicas Reativas
- ERNs - Espécie reativas de nitrogênio
- EROs - Espécies reativas de oxigênio
- GO - Glioxal
- GOLD - Dímero Glioxal Lisina
- H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
- HbA1C - Variante da hemoglobina glicada
- HNO₂ - Ácido nitroso
- HO• - Radial hidroxila
- HOCl - Ácido hipocloroso
- IQB - Instituto de Química e Biotecnologia
- LEEO - Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo
- LQM - Laboratório de Química Medicinal
- MGO - Metilglioxal
- MOLD - Dímero Metilglioxal Lisina
- N₂O₃ - Óxido nitroso
- NaCl - Cloreto de Sódio
- NaOCl - Hipoclorito de Sódio
- NO - Óxido Nítrico
- NO• - Óxido nítrico

NO_2^- - Nitrito

NO_3^- - Nitrato

$\text{O}_2^{\bullet-}$ - Radical ânion superóxido

ONOO^- - Peroxinitrito

OPD - Orto-fenilenodiamina

RAGE – Do inglês: Receptor for Advanced Glycation End-products

$\text{RO}\bullet$ - Radical alcoxila

$\text{ROO}\bullet$ - Radical peroxila

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
SUMÁRIO	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
1. OBJETIVOS	18
1.1. Objetivo Geral	18
1.2. Objetivos Específicos	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. Glicação por via não enzimática	19
2.2. AGEs – Produtos de Glicação Avançada	20
2.3. ECRs e EROs.....	23
2.4. Doenças Relacionadas aos AGEs.....	26
2.5. Inibidores dos AGEs	29
3. METODOLOGIA	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.2. Avaliação da atividade antiglicante no sistema intermediário de glicação	38
4.4. Avaliação da atividade Antioxidante eliminação do ânion radical superóxido.....	41
4.5. Avaliação da capacidade de captura de metilglioxal através de derivatização com OPD.....	42
5. CONCLUSÃO.....	45
6. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

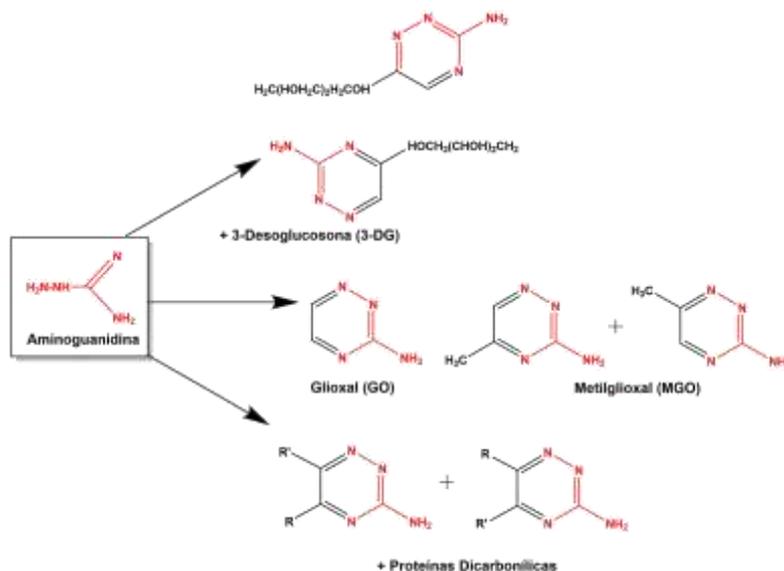
Na atualidade, a uma busca crescente por produtos que possuam propriedades antioxidantes e antiglicante, em consequência dos estudos que relacionam os radicais livres com a progressão ou fator colaborativo para doenças degenerativas como doença de Parkinson, câncer, diabetes e doença de Alzheimer. (HENNING & GLOMB, 2016, URIBARRI et al., 2015). A oxidação é um processo natural do organismo humano na qual resulta em diversas espécies reativas que são denominadas radicais livres, que em altas concentrações podem causar um dano no funcionamento de proteínas e células, este processo é denominado estresse oxidativo e carbonílico. A principal característica dos radicais livres é o elétron desemparelhado que fica em torno de átomos como oxigênio e nitrogênio sendo denominados de EROs (espécies reativas de oxigênio) e ERNs (espécies reativas de nitrogênio). As principais EROs são divididas em dois grupos, não-radicalares que engloba: ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) e os radicalares: hidroxila (HO^{\bullet}), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}) e alcoxila (RO^{\bullet}). As ERNs compreendem o óxido nitroso (N_2O_3), óxido nítrico (NO^{\bullet}), ácido nitroso (HNO_2), nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$). A variados fatores metabólicos e ambientais que viabilizam a produção das espécies reativas, além das EROs e ERNs, à produção das ECRs (Espécies Carbonílicas Reativas) que são produzidas constantemente e detoxificadas. Dentre essas espécies algumas apresentam uma alta reatividade no organismo atacando proteínas, lipídeos, DNA e outros que apresentam uma reatividade seletiva com lipídeos, seus níveis devem ser mantidos sob controle de forma a promover um equilíbrio no organismo, na sua ausência teremos o estado de desequilíbrio que resulta no estresse nitrooxidativo e carbonílico. Estudos apontam que a uma relação entre o aumento das concentrações de ECRs pelo Estresse oxidativo e o mesmo ocorre quando a um aumento no estresse carbonílico a um aumento na geração de EROs. Através da relação entre o estresse carbonílico e oxidativo a um desencadeamento de doenças crônicas e degenerativas. Distúrbios metabólicos diversos tais como diabetes, obesidade, doenças renais e cardíacas, bem como as neurodegenerativas possuem intrínseca relação com o estresse carbonílico/oxidativo.

Diversas vias metabólicas dão origem as ERCs, pois elas podem ser geradas como metabólitos secundários, em vias como (via glicolítica e oxidação de corpos cetônicos) ou absorvidos a partir de fontes exógenas (poluição, fumo ou dieta). Além destas formas de origem, essas espécies podem ser geradas pela glicação não enzimática (Reação de Maillard). Analisando esta reação em duas etapas, temos que seu estágio inicial que é formado pela condensação de grupamentos amino de uma biomolécula como (proteína, fosfolipídeos e ácidos

nucleicos), com um grupamento carbonílico presente em açúcares redutores (frutose, glicose e ribose), promovendo a formação de Bases de Schiff instáveis que, via rearranjo, dão origem aos produtos de Amadori que possuem uma estabilidade maior. No estágio intermediário, os produtos de Amadori podem sofrer oxidação que leva à formação de compostos dicarbonílicos como Metilglioxal (MGO), Glioxal (GO) e 3-Desoxiglicose (3-DG). A etapa final da Reação de Maillard é marcada pela atuação desses ECRs, que acabam fazendo ligações com resíduos de arginina e lisina de proteínas que acaba gerando os produtos de glicação avançada (AGEs). Os AGEs também contribuem de forma direta para desencadear e/ou agravar patologias associadas ao envelhecimento precoce. (BARBOSA, et al., 2016; YEH et al., 2017).

Inibir a reação de glicação é uma estratégia efetiva para retardar processos de progressão de doenças, retardar o envelhecimento e reduzir os avanços de reações inflamatórias. A aminoguanidina é um produto sintético no qual possui um alto poder de prevenção na formação de AGEs, e um agente nucleofílico que possui dois centros reativos: sendo um Hidrazina -NHNH₂ e guanidina -NH-C(=NH)NH₂. Esses dois grupos ligados entre si promovem um sistema de eliminação bifuncional de agentes glicantes como os compostos α,β-dicarbonílicos e α-oxialdeídos como MGO, GO e 3-DG.

Figura 1 - Representação da interação da Aminoguanidina com outros compostos.



Fonte: Autor 2022.

Alguns efeitos colaterais associados ao uso crônico da aminoguanidina incluem a maior incidência de glomerulonefrite e a deficiência da Vitamina B6. (McEniery CM, et al., 2006).

O estudo de derivados de aminoguanidina se mostra promissor, por aproveitar características-chave da molécula que propiciam as características antiglicantes e antioxidantes.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

- Investigar a capacidade antiglicante e antioxidante de produtos sintéticos derivados da aminoguanidina e avaliar seu potencial biotecnológico.

1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade antioxidante das amostras derivadas de aminoguanidina pelo método de Captura do Ácido Hipocloroso e Ensaio de Eliminação do Ânion Radical Superóxido
- Avaliar a capacidade antiglicante das amostras derivadas de aminoguanidina nos estágios iniciais e intermediários.
- Avaliar a capacidade sequestradora de metilglioxal (MG) das amostras através de derivatização com orto-fenilenodiamina (OPD) via CLAE/UV-Vis.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Glicação por via não enzimática

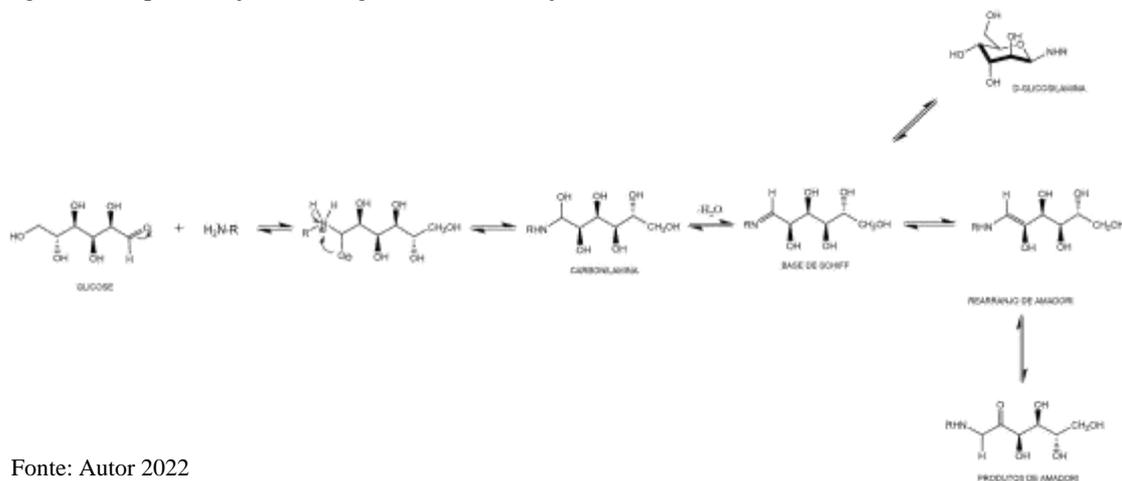
Louis Camille Maillard (1878-1936), bioquímico, em 1912 relatou o primeiro evento observável da glicação via não enzimática que foi denominada reação de Maillard, ao aquecer a mistura glicina e glicose em “banho-maria”, ele observou o aparecimento de substâncias de coloração amarronzadas denominadas de melanoidinas, entretanto esta reação não se limita apenas à interação destas duas substâncias, há aminoácidos, açúcares e peptídeos que sofrem a reação com intensidades diferentes.

A reação tem um grau de complexidade alto em suas três etapas de formação, o que pode levar de alguns dias ou semanas para chegar ao final. Uma gama alta de compostos é formada durante a reação e eles são responsáveis por atribuir algumas características como sabor, aroma e coloração aos alimentos, como também contribuem para a formação de produtos de glicação avançada (AGEs).

A reação de Maillard começa com o ataque nucleofílico do grupo α -carbonílico de um açúcar redutor ao grupamento amina presente nas proteínas. Esta reação é dividida nas etapas (inicial, intermediária e final) conforme o esquema proposto por Hodge em 1953 e citado por Nursten.

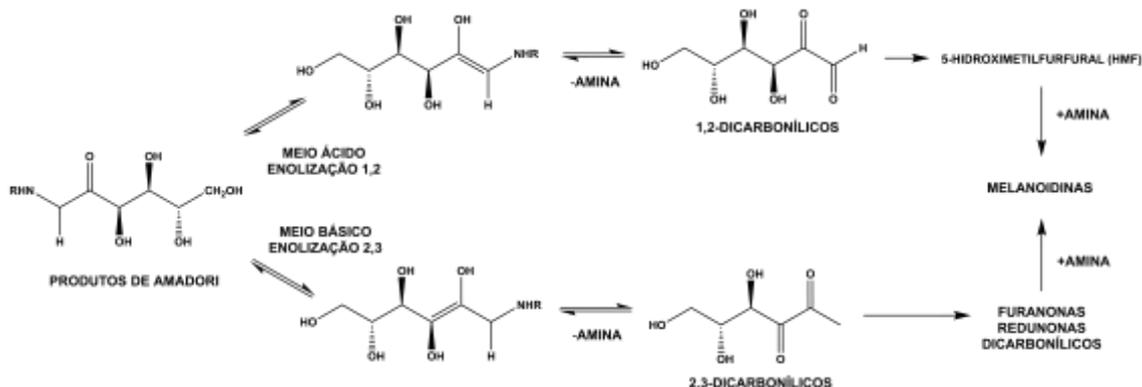
Em seu estágio inicial ocorre a condensação da carbonila pertencente ao açúcar redutor com o grupamento amina advindo das proteínas ou aminoácidos livres que acaba gerando glicosil/frutosilaminas N-substituídas, que são os produtos instáveis gerados nesta etapa que são denominados produtos de Amadori, em proteínas o ataque nucleofílico do açúcar redutor é no grupamento amino do resíduo de lisina, em que os produtos gerados não apresentam cor, absorção na região-UV (Ultravioleta) ou fluorescência.

Figura 2 - Representação do Estágio Inicial da Reação de Maillard.



Na etapa intermediária ocorre uma variedade de reações (desidratação, enolização e retroaldolização) o que gera compostos dicarbonílicos, redutonas e derivados de furfural ou produtos da degradação de Strecker (produtos de degradação de aminoácidos). Essa etapa é caracterizada pelo aumento da fluorescência dos produtos e substâncias que são capazes de absorver a radiação-UV.

Figura 3 - Representação do Estágio Intermediário da Reação de Maillard



Fonte: Autor 2022

Na etapa final os dicarbonílicos formados na etapa intermediária apresentam uma reatividade elevada o que pode levar a interação com resíduos de lisina ou arginina em proteínas que produzem compostos estáveis. As melanoidinas e compostos fluorescentes são gerados nesta etapa devido reações de polimerização ou fragmentação.

2.2. AGEs – Produtos de Glicação Avançada

O termo AGEs (Advanced Glycosylation (Glycation) End Product) foi descrito pela primeira vez por Vlassara (1984) com o intuito de descrever estruturas químicas amarronzadas e fluorescentes que possuem ligações intermoleculares cruzadas entre as cadeias moleculares, que ocasiona em uma complexa rede polimérica que são desenvolvidas na etapa final da reação de Maillard.

Os AGEs capturam quimicamente proteínas solúveis como as lipoproteínas que inativam o óxido nítrico, NO e acaba interagindo com proteínas específicas para contribuir com o estresse oxidativo, acúmulo de matriz extracelular (ECM), induzir permeabilidade vascular e estado de pró-coagulação que evidenciam o papel de ação dos AGEs na disfunção vascular diabética. Essa evidencia foi constatada nos estudos usando inibidores específicos da glicosilação, como a aminoguanidina que previne o acúmulo de AGEs (Cooper, et al., 2001).

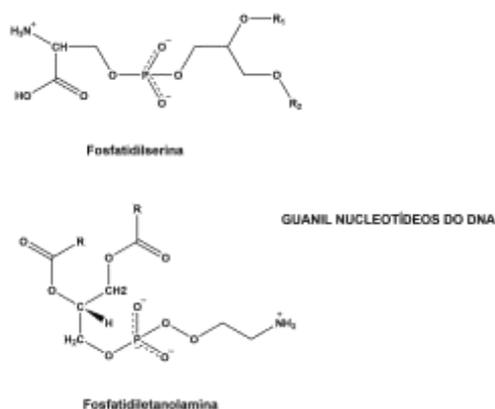
A glicação de proteínas ocorria em sistemas biológicos foi descrita pela primeira vez por 1955 por Kunkel e Wallanius ao demonstrarem a glicação da proteína da hemoglobina que

foi denominada HbA1C (variante da hemoglobina aduto glicação), que é usada atualmente como biomarcador para avaliar a concentração média de glicose no sangue em exame clínico de pacientes diabéticos.

Os produtos advindos dessas reações, via adição nucleofílica, em grupos carbonílicos de açúcares, propiciam à modificação de biomoléculas por grupamentos de amins livres, que estão intimamente relacionados com processos patogênicos, por estarem presente no estresse oxidativo e inflamatórios, que estão correlacionados com um alto índice de distúrbios como, Alzheimer, diabetes *Mellitus* e aterosclerose. (HENNING & GLOMB, 2016, URIBARRI et al., 2015). Esses fatores tornam a reação de Maillard um assunto atual e importante mesmo após 100 anos.

AGEs são formados pela modificação dos resíduos de arginina e lisina, ligados a proteínas que possuem grupamentos amina de fosfolipídios (fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina) e guanil nucleotídeos do DNA.

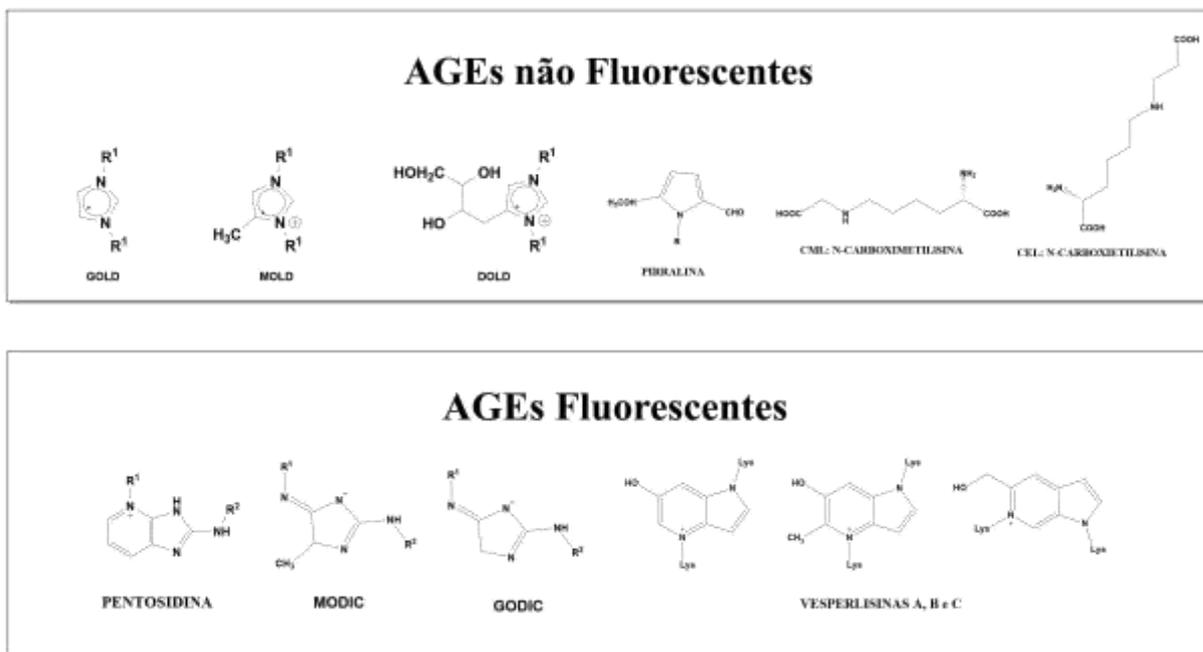
Figura 4 - Representação das moléculas fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina e guanil nucleotídeos do DNA.



Fonte: Autor, 2022.

Eles são hidroimidazolados de proteínas e imidazopurinonas derivados do DNA, bis(lisil)-imidazólio (moléculas agentes de ligação cruzada de proteínas: GOLD, MOLD e DOLD) vesperlisinas A, B e C, produtos fluorescentes de proteínas (pentosidina e argpirimidina), derivados N-(1-carboxalkil)amino (N ϵ -carboxi-metil-lisina e N ϵ - carboxetil-lisina de proteínas; N-carboximetilfosfatidiletanolamina de fosfolipídeos; N2-(1-carboxietil) desoxiguanilato do DNA), pirralina – um derivado pirrol de proteínas, entre outros.

Figura 5 - Representação dos Principais AGEs formados na Reação de Maillard.



Fonte: Autor 2022

A implicação da reação de Maillard *in vivo* foi reconhecida devido a detecção de elevados níveis de hemoglobina no sangue diabético. Evidências consecutivas propõem que os AGEs tinham implicação na etiologia de várias complicações diabéticas e no envelhecimento precoce.

Os AGEs podem ser gerados por uma série de outras reações incluindo a oxidação de açúcares, lipídeos e aminoácidos, e foi elucidado pela primeira vez no trabalho de Vlassara *et al* com intuito de explicar estruturas químicas de coloração amarronzadas, fluorescentes e que possuíam ligações covalentes cruzadas entre as cadeias moleculares, resultando em uma complexa rede polimérica e que são formadas nos estágios da reação de Maillard entre as proteínas que possuem o grupamento amino e os açúcares redutores.

Essa observação já foi comprovada com estudos que utilizaram como inibidores específicos da glicosilação, como a Aminoguanidina que além evitar o acúmulo de AGEs, melhora as complicações do diabético.

A formação de ligações cruzadas covalentes entre as cadeias moleculares das proteínas e a glicolisação, diminuem a sua funcionalidade, além de reduzirem a flexibilidade e sua elasticidade. Essas modificações químicas nas proteínas podem gerar reações inflamatórias e autoimunes.

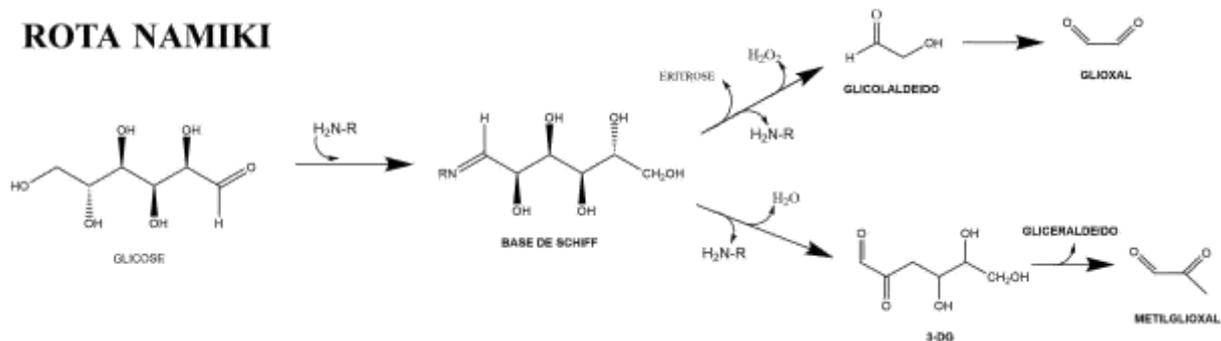
A reação de Maillard pode ser catalisada pela presença de oxigênio entre glicose e proteínas, mas na ausência de oxigênio o processo de formação de alguns compostos como:

pentosidina, CML e CMhL são inibidos, o que ocorre também em condições aeróbicas na presença de agentes quelantes, redutores e bloqueadores de radicais livres (antioxidantes). Logo esses produtos exigem a glicosilação e oxidação, por essa razão são chamados de produtos da glicoxidação, processo complexo *in vitro*, que envolve a oxidação direta glicose (glicosilação autoxidativa) e autooxidação da base de Schiff e produtos de Amadori, as principais rotas conhecidas são a Wolff, Namiki e Hodge, que são vias paralelas a Reação de Maillard.

2.3. ECRs e EROs

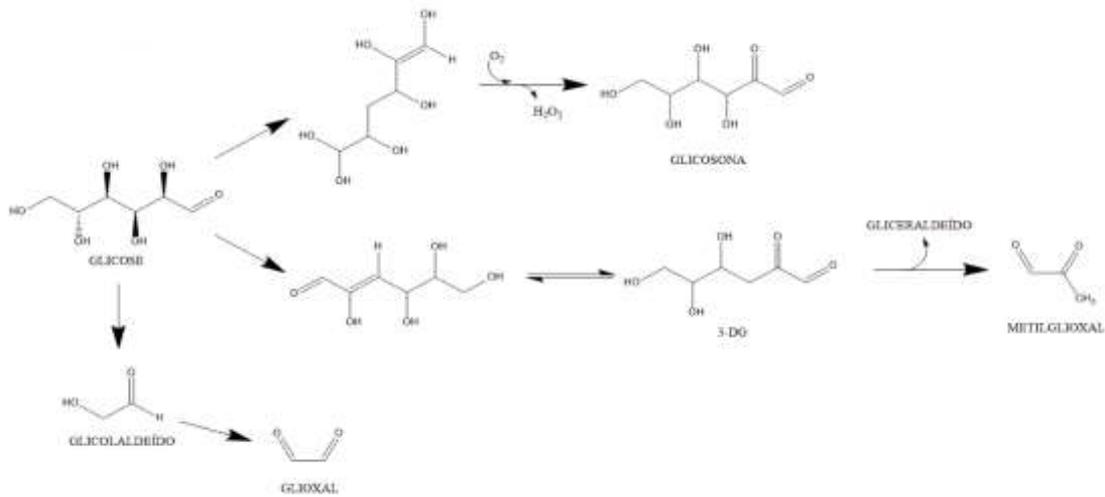
Essas rotas levam a formação de ECRs, em que os α -dicarbonílicos são intermediários com uma reatividade elevada levando assim a participarem na disseminação da reação de glicação. Essas espécies reagem com aminoácidos por meio da reação de Strecker e formar aldeídos de cadeia curta e liberação de dióxido de carbono (CO_2), que acaba gerando uma diversificação nos compostos responsáveis pela formação de aroma em alimentos aquecidos. O processo de caramelização e a oxidação de lipídeos, assim como outros processos podem gerar compostos a partir de carboidratos submetidos a altas temperaturas. Essas ECRs depois de serem geradas podem reagir com biomoléculas levando à formação de AGEs.

Figura 6 - Representação da reação de formação de ERCs pela via Namiki.



Fonte: Autor 2022

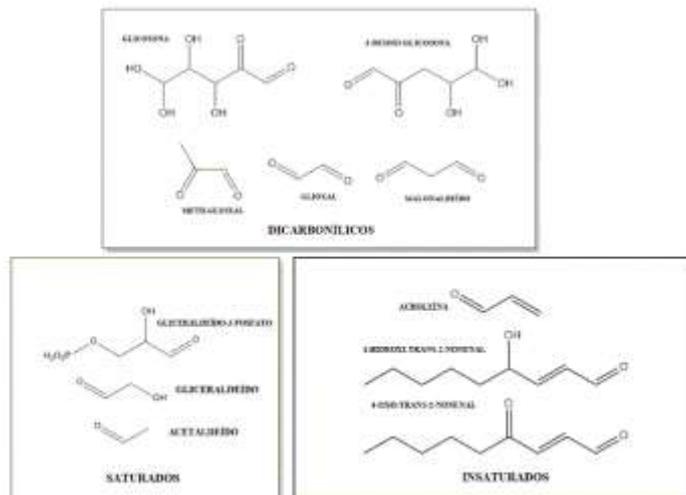
Figura 7 - Representação da reação de formação de ERCs pela rota de Wolff.



Fonte: Autor 2022

As ECRs abarcam um alto teor de compostos biológicos com um ou mais grupos carbonílicos e são geradas *in vivo* como produtos do metabolismo ou derivadas da exposição a fontes ambientais (naturais e/ou antropogênicas), possuem muito efeito nocivo devido à alta reatividade e quando estão em alta concentração, participam de diferentes reações no organismo que acaba contribuindo para o envelhecimento precoce e distúrbios metabólicos.

Figura 8 - Representação das Estruturas de espécies carbonílicas mais encontradas em meio biológico.



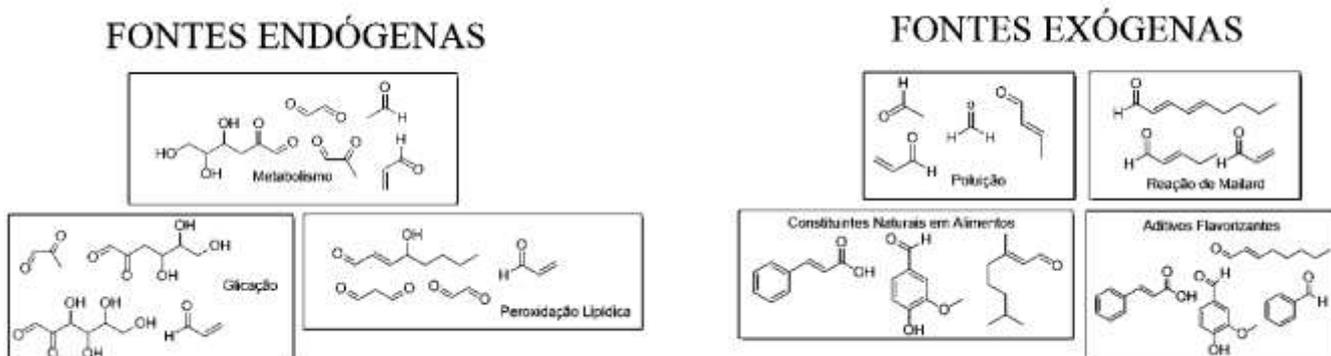
Fonte: Autor, 2022.

Alguns componentes da poluição do ar como (crotonaldeído e acroleína) que são aldeídos insaturados provenientes da fumaça de combustão de indústrias petroquímicas, madeira, cigarros e carvão. Alguns alimentos podem conter ECRs como parte da sua constituição natural (citril, crotonaldeído e cinamaldeído) ou podem ser gerados durante o processamento ou armazenagem como (acroleína, 4-hidroxi-2-nonenal) integrantes intermediários das reações de

Maillard e podem ser adicionados como aditivos para um realce no sabor de alimentos como (trans-2-nomenal).

As ECRs também podem ser encontradas como contaminantes da água ou serem

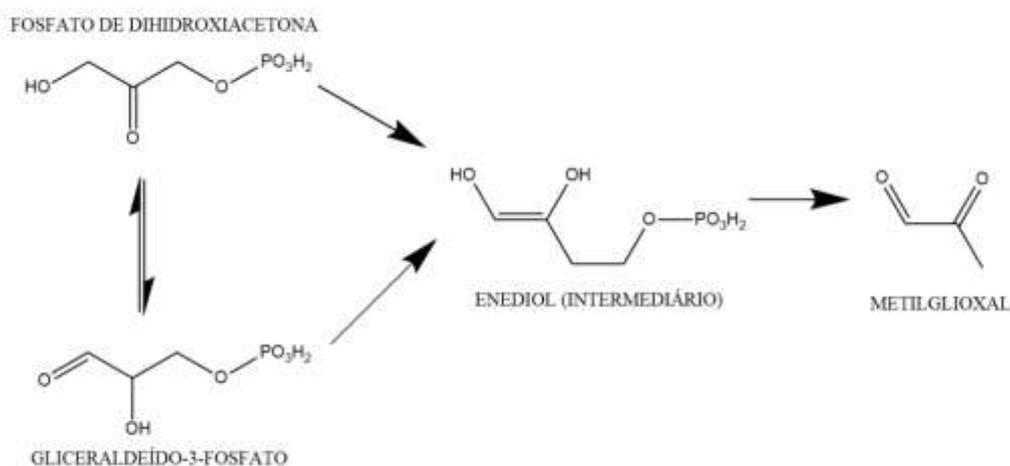
Figura 9 - Representação das espécies carbonílicas classificadas em fontes endógenas e exógenas.



Fonte: Autor 2022

geradas pela via endógena durante o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, catalisadas por enzimas como (metilgloxal sintase, aminas oxidases) que participam da rota glicolítica, e a degradação de aminoácidos. Já em meio intracelular as ECRs são geradas em vias sendo elas enzimáticas ou não enzimáticas, em que pela via enzimática são produzidas pela via glicolítica sendo intermediários ou por subprodutos da conversão por via metabólica de carboidratos e aminoácidos. A fonte principal de MGO *in vivo* é pela eliminação de fosfato por gliceraldeído-3-fosfato e di-hidroxiacetona.

Figura 10 - Representação da reação de formação Metilgloxal (MG) pela via da glicólise.



Fonte: Autor 2022

As ECRs possuem uma estabilidade alta o que possibilita que elas saiam do meio celular e atuem com diversos alvos distantes da região em que foram geradas. É por isso que, sob certas condições, as ECRs podem ter efeitos prejudiciais de grande alcance e, portanto, eles podem

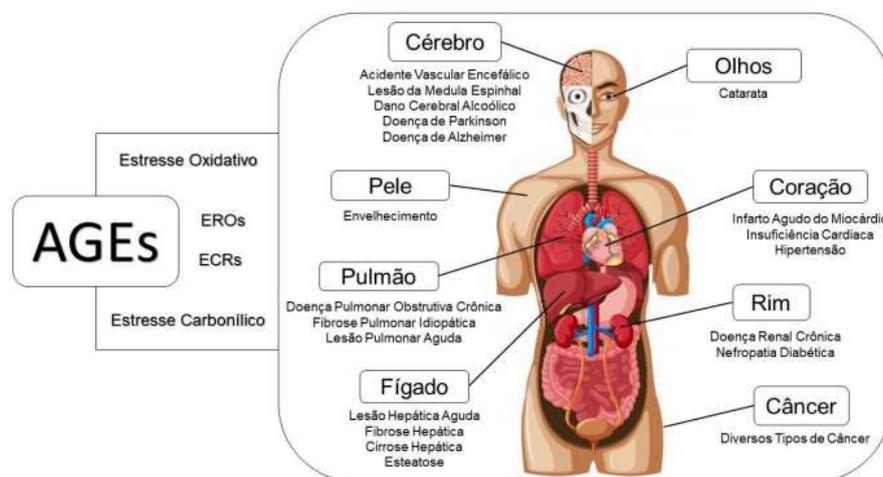
ser mais deletérios do que as EROs (ELLIS, 2011; ZIMNIAK et al., 2011; SEMCHYSHYN & LUSHCHARK, 2012).

2.4. Doenças Relacionadas aos AGEs

A característica de gerar modificações nas propriedades químicas e funcionais das biomoléculas é a principal característica dos AGEs, são compostos altamente tóxicos e que estão associados à inflamação e ao estresse oxidativo. Eles se aglomeram na matriz extracelular (MEC) de vários tecidos e auxiliam e contribuem para o progresso de várias doenças crônicas, como distúrbios neurológicos, diabetes, cânceres, distúrbios cardiovasculares e artrite.

Possuem também a característica de serem antigênicos, logo acabam induzindo respostas imunes. As modificações nas conformações nativas das biomoléculas que provocam alterações nas suas funções biológicas são devido ao mecanismo de formação de ligações cruzadas estáveis entre proteínas intra e extracelulares que os AGEs e acabam promovendo a geração de radicais livres durante esses processos de interação com as biomoléculas.

Figura 11 - Relação entre os produtos de glicação avançada (AGEs) e as doenças



Fonte: Xavier, 2018

O Estresse Oxidativo é induzido pelos AGEs que acabam promovendo a ativação do RAGE (do inglês Receptor for Advanced Glycation End-products), gerando assim uma disfunção mitocondrial. O RAGE é um receptor pertencente à superfamília das imunoglobinas (proteínas ligadas às membranas), e controla a ativação do fator nuclear- κ B responsável pela ação inflamatória. Com o estresse oxidativo e o acúmulo mitocondrial de Ca^{2+} leva a um sinal de morte celular, aumentado por AGEs expelidos por macrófagos ativados, que promovem a disfunção mitocondrial e morte celular.

Estudos extensivos demonstraram que a disfunção mitocondrial é um fator importante na doença de Alzheimer, doença hepática gordurosa alcoólica (SONG et al., 2014), diabetes e degeneração de condrócitos (BYUN et al., 2017) aterosclerose, osteoporose, asma, artrite, sarcopenia (BARBOSA et al., 2016; ABATE et al., 2015), câncer (GOLBIDI; BADRAN; LAHER, 2011) e complicações diabéticas (GOLBIDI; BADRAN; LAHER, 2011; BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

Existem diversos receptores celulares, que possuem capacidades de ligação com os AGEs, alguns foram identificados em diferentes linhagens celulares.

Tabela 1 – Representação dos receptores dos AGEs.

Sigla	Nomenclatura	Função
BIRAGE	AGER	Receptor para produtos de glicação avançada
AGE-R1	OST-48	Oligosacaril transferase-4
AGE-R2	PRKCSH	Substrato da proteína quinase C
AGE-R3	LGAL31	Galectina-3
LOX-1	LOX-1	Lecitina semelhante a lipoproteína LDL oxidada
SR-A	Classe A	Receptor scavenger de macrófagos classe A tipos I e II
SR-BI	---	Receptor que faz a endocitose da LDL acetilada
CD-36	CD-36	Multiligante (ácidos graxos, colágeno, LDL oxidada entre outros)

Fonte: Autor 2022

Concentrações de AGEs já foram encontradas no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer, ligados a placas senis extracelulares e novos neurofibrilares. Essas placas são constituídas por peptídeo A β e emaranhados neurofibrilares pela proteína tau defeituosa. Em que os AGEs agem como neurotoxinas, aumentando os danos nas funções cerebrais e potencializando o processo de demência (YIN, 2012; TORRES et al., 2018).

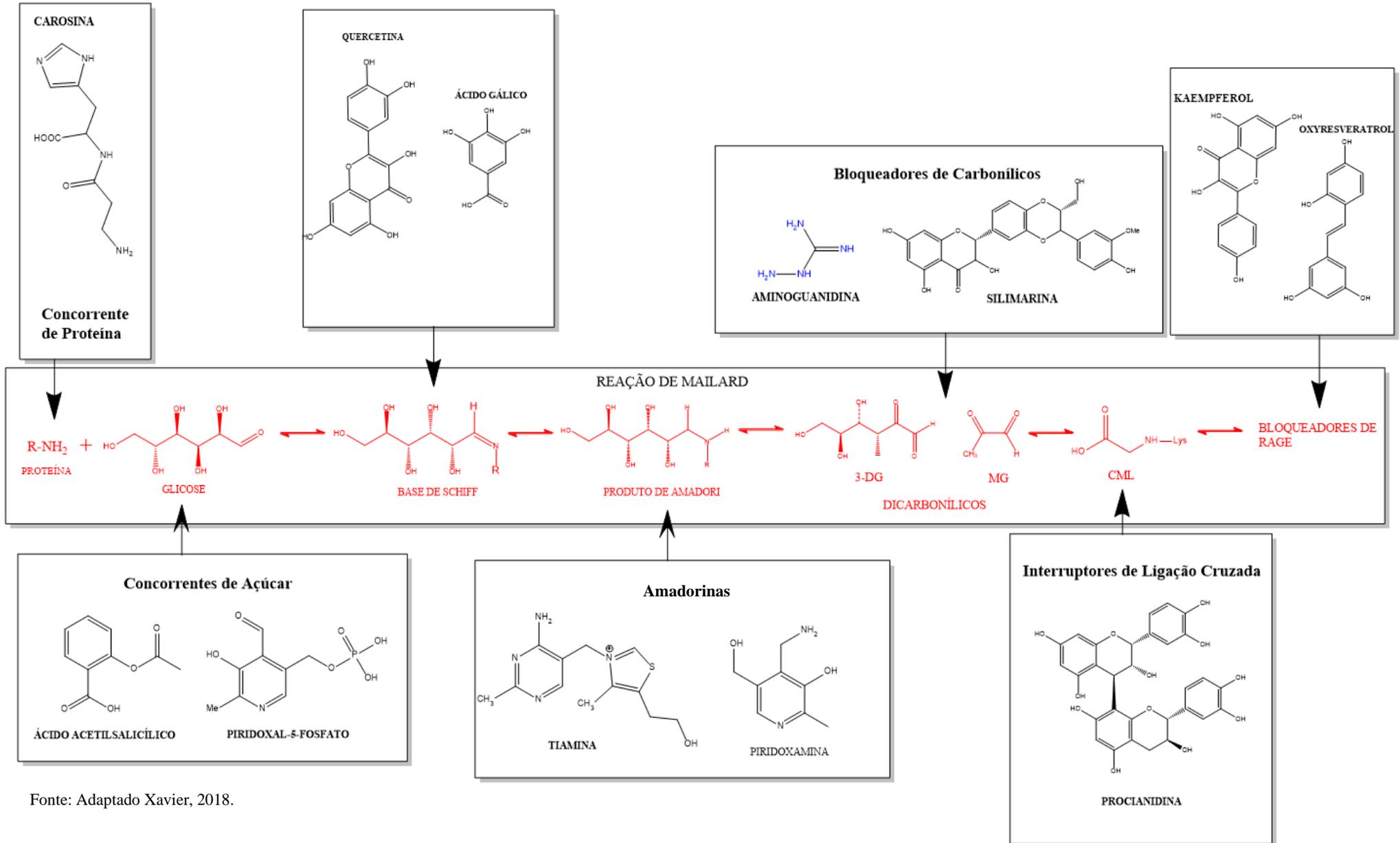
Os AGEs são grandes mediadores patogênicos de complicações advindas da diabetes, como a nefropatia diabética (queda da função renal), a retinopatia diabética (degradação da visão) e a neuropatia diabética (degeneração dos neurônios). Como no sangue de pacientes diabéticos a concentração de glicose é alta, acaba propiciando um aumento na formação dos AGEs e de compostos dicarbonílicos, logo esses pacientes possuem uma taxa de modificações nos resíduos de lisina e arginida de duas a três vezes maior do que uma pessoa normal (HELLWING; HENIE; BAKING, 2014).

Nosso organismo possui alguns mecanismos de ação que atuam na defesa contra os AGEs além dos receptores, como as enzimas aldose redutase e oxaldeído redutase, as quais reagem com os derivados dicarbonílicos reativos e com as glioxilases I e II que são responsáveis por interromper as reações de glicação em estágios diferentes, mas se houver um excesso na

concentração de AGEs esses mecanismos não são tão eficazes na neutralização total dessas espécies reativas, logo a busca por compostos que inibem a formação dos AGEs é de suma importância.

2.5. Inibidores dos AGEs

Figura 12 - Representação dos Inibidores de AGEs nos estágios da reação de Maillard.



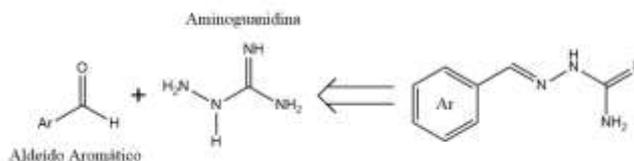
3. METODOLOGIA

Avaliando a alta capacidade antiglicante da aminoguanidina, os derivados foram planejados a síntese das tiossemicarbazonas e guanil-hidrazonas, conhecidos também por derivados aminoguanidínicos (ARAÚJO-JÚNIOR, 2006; ARAÚJO-JÚNIOR, 2007; BENDERITTER, 2007; SCHMITT, 2006).

A geração dos derivados aminoguanidínicos foi realizado através de variações em duas regiões do esqueleto base das guanil-hidrazonas. Partindo de quantidades equimolares de aldeídos aromáticos e cloridrato de aminoguanidina, para obtenção das guanil-hidrazonas.

Este estudo foi utilizado 7 derivados aminoguanidínicos, sintetizados no Laboratório de Química Medicinal – LQM – ICF – Instituto de Ciências Farmacêuticas e codificados com a sigla LQM, seguidos de um número.

Figura 13 - Retrosíntese do esqueleto base das guanil-hidrazonas.



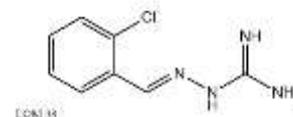
Fonte: Adaptado de Epifânio, 2011.

Tabela 2 - Nomenclatura e estrutura química dos derivados aminoguanidínicos.

CÓDIGO	NOMENCLATURA	ESTRUTURA QUÍMICA
LQM 55	2-(2,3-diclorobenzilidenoamino)guanidina	
LQM 103	2-(piridina-4-il)(metilenoamino)guanidina	
LQM 130	2-(3-fenilpropilidenoamino)guanidina	
LQM 137	2-(ciclopentilmetilenoamino)guanidina	

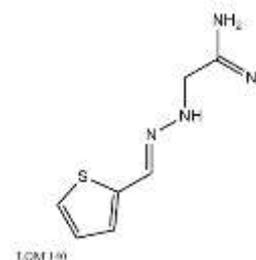
LQM 098

(E)-2-(2-clorobenzilideno)hidrazina-1-carboximidamida



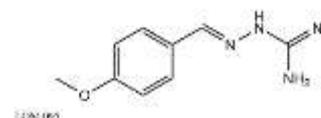
LQM 140

(2-(tiofen-2ilmetileno)hidrazina) acetimidamida



LQM 95

(4-metoxibenzilideno)hidrazina-1-carboximidamida



 Fonte: Autor 2022

Tabela 3 - Equipamentos utilizados nos testes.

EQUIPAMENTO	MARCA
Espectrofotômetro UV-vis	Agilent 8453 (Estados Unidos)
Fluorímetro	Shimadzu, RF-5301PC (Japão)
CLAE	Shimadzu (VP series, Kyoto) (Japão)
Ultrassom	Cristófoli
Agitador de soluções	Phoenex AP-56
Balança analítica (0,01mg/0,1mg)	Mettler Toledo AG 245
pH metro (0,001 pH e 0,1 mV)	Quimis Aparelhos Científicos LTDA
Leitor de microplacas	Infinite M Plex - TECAN
Estufa	TECNAL – TE – 394/1

 Fonte: Autor 2022

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo (LEEO), no Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Tabela 4 - Reagentes utilizados nos testes.

REAGENTES E SOLVENTES	MARCA
Quercetina	Sigma-Aldrich
Aminoguanidina	Sigma-Aldrich
Nicotinamida adenina dinucleotídeo	Sigma-Aldrich
Metassulfato de fenazina	Sigma-Aldrich
Fosfato monopotássio	VetecQuímica Fina Ltda (Brasil)
Fosfato dissódico	VetecQuímica Fina Ltda (Brasil)
Etanol	Sigma-Aldrich
Água purificada	Milli-Q da Millipore Inc

Fonte: Autor 2022

3.1. Avaliação do potencial Antiglicante

3.1.1. Sistema BSA-glicose/frutose

O ensaio foi feito seguindo o método desenvolvido por Melo e colaboradores (2015) com algumas modificações. Inicialmente foram preparadas soluções de Glicose e Frutose a (200 mM) e BSA (Albumina Sérica Bovina) (45 μ M), em sequência a preparação das amostras em uma faixa de 6 concentrações (200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 mM) para avaliação e determinação do IC₅₀. As soluções foram submetidas a um tampão fosfato (50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM e Azida de Sódio 0,02% (m/v)). O sistema reacional é formado por 500 μ L da mistura dos açúcares glicose e frutose e 500 μ L das 6 faixas de concentrações das amostras, em seguida acrescentou-se 500 μ L da solução de proteína BSA. O sistema é submetido a incubação na ausência de luz e uma temperatura de 37 °C com agitação constante por um intervalo de 7 dias. Para determinação do controle negativo (sistema reacional na ausência da amostra) foi utilizado tampão fosfato (pH = 7,4). O controle Positivo foi realizado com a Aminoguanidina e Quercetina. Todo o sistema é realizado em triplicata e neste método a quantificação dos dados se dá pelo monitoramento dos AGEs fluorescentes através de um espectrofluorímetro (λ_{ex} = 360 e λ_{em} = 440 nm). O IC₅₀ foi quantificado graficamente utilizando a curva de calibração e traçando a concentração da amostra pela porcentagem de inibição correspondente (I%). A porcentagem da inibição dos AGEs foi calculada utilizando a seguinte relação.

$$I\% = (F_{\text{controle negativo}} - F_{\text{experimental corrigida}} / F_{\text{controle negativo}}) \times 100$$

Em que a $F_{\text{controle negativo}}$ é a fluorescência para o controle negativo e $F_{\text{experimental corrigida}}$ é a fluorescência do sétimo dia subtraída da fluorescência do primeiro dia.

3.1.2. Sistema BSA-MG

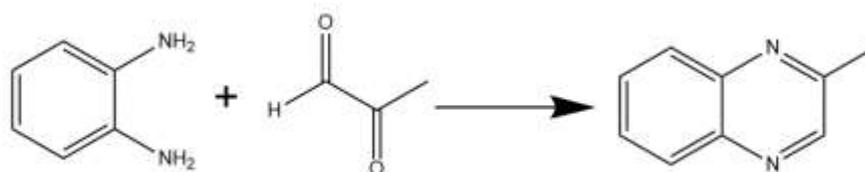
O ensaio tem como objetivo avaliar a etapa intermediária da glicação das proteínas tendo como base a BSA e com o radical Metilglioxal. O método foi baseado no ensaio descrito por Wang e colaboradores (2011) com algumas modificações. inicialmente, foram preparadas soluções de Metilglioxal (1,5 mM), BSA (45 μ M) em concentrações diferentes da amostra teste para determinação do IC₅₀. O sistema reacional foi elaborado sob um tampão fosfato (50 mM, pH = 7,4, NaCl 100 mM e Azida de Sódio 0,02% (m/v)). Para elaboração da reação do sistema, adicionou-se 500 μ L da solução de metilglioxal (1,5 mM) e 500 μ L das amostras sob a temperatura de 37 °C por 1 h. Em sequência foi adicionado nesse sistema a BSA (45 μ M), em que foram incubados na ausência de luz sob a temperatura de 37°C com agitação constante pelo período de 2 dias. O controle negativo foi elaborado sem a amostra teste em que foi trocada pelo tampão fosfato. O controle positivo foi utilizado aminoguanidina. O ensaio foi realizado em triplicata e a quantificação dos AGEs fluorescentes foi realizada na temperatura de 37 °C no espectrofluorímetro (λ_{ex} = 370 e λ_{em} = 440 nm). O IC₅₀ foi determinado graficamente via curva de calibração em que a concentração da amostra teste pela porcentagem de inibição correspondente (I%). O cálculo foi realizado pela mesma fórmula do sistema BSA-Glicose/Frutose.

3.2. Avaliação da capacidade de captura de metilglioxal via derivatização com OPD

A capacidade de captura do radical MGO (metilglioxal) foi elaborada pelo ensaio descrito por Wang e colaboradores (2011) com algumas modificações. A quantificação de MG é baseada na derivatização do OPD (ortofenilenodiamina) que gera o produto 2-metilquinoxalina (2-MQ). Para o preparo das soluções de MGO e OPD foram dissolvidas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) nas concentrações de 5 mM. Como padrão positivo foi utilizada a Aminoguanidina (5 mM) e as amostras teste (derivados de aminoguanidina) a (5mM), todas as soluções passaram por um sistema de filtragem (microfiltro x diâmetro de poro 0,45 μ m). O sistema foi constituído por 125 μ L de tampão (controle negativo) ou da amostra sob incubação à 37 °C por 1 h. Em seguida foi adicionado 250 μ L da solução de OPD e para que a derivatização entre OPD e MGO ocorre-se foi aguardado um tempo de 30 min para interação destes compostos e em sequência a determinação cromatográfica fosse possível de ser realizada. As condições para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram: água deionizada acidificada com ácido fórmico (0,1%) (solvente A) e metanol (solvente

B) foram utilizados como fase móvel, fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume de injeção foi de $20 \mu\text{L}$. A corrida cromatográfica foi realizada em um gradiente linear iniciando em 5 % do solvente B, de 0-3 min, 5 a 50 % B; de 3-16 min, isocrático em 50 % do solvente B; de 16-17 min, 50-90 % B; de 17-19 min isocrático em 90% do solvente B e de 19-19,5 min, 90 a 5 % de B. O produto de derivatização, 2-MQ, foi detectado em 315 nm em um tempo de retenção de 13 min.

Figura 14 - Representação da reação entre orto-fenilenodiamina e metilglioxal.



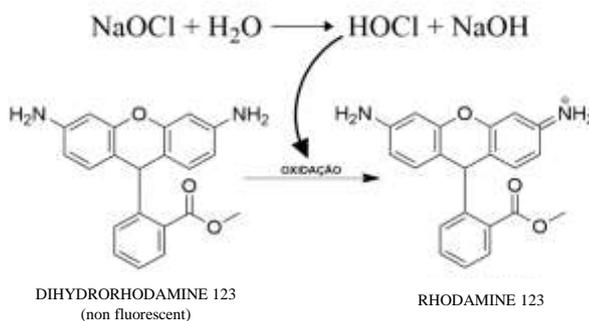
Fonte: Autor, 2022.

3.3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

3.3.1. Ensaio de eliminação do ácido hipocloroso (HOCl)

A capacidade de eliminação do HOCl foi medida monitorando o efeito das amostras (3 - 300 μM) na oxidação da Dihidrorodamina (DHR) induzida pelo HOCl. O HOCl foi preparado ajustando o pH de uma solução de NaOCl a 1% (p/v) para 6,2 com adição de H₂SO₄ a 10% (v/v). A concentração de HOCl foi determinada por espectrofotometria em um comprimento de onda $\lambda = 235 \text{ nm}$, utilizando o coeficiente de absorvidade molar de $100 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados são expressos como a inibição em porcentagem da oxidação induzida via HOCl da sonda DHR.

Figura 15 - Representação da formação de ácido hipocloroso e atuação com a sonda Dihidrorodamina



Fonte: Autor 2022

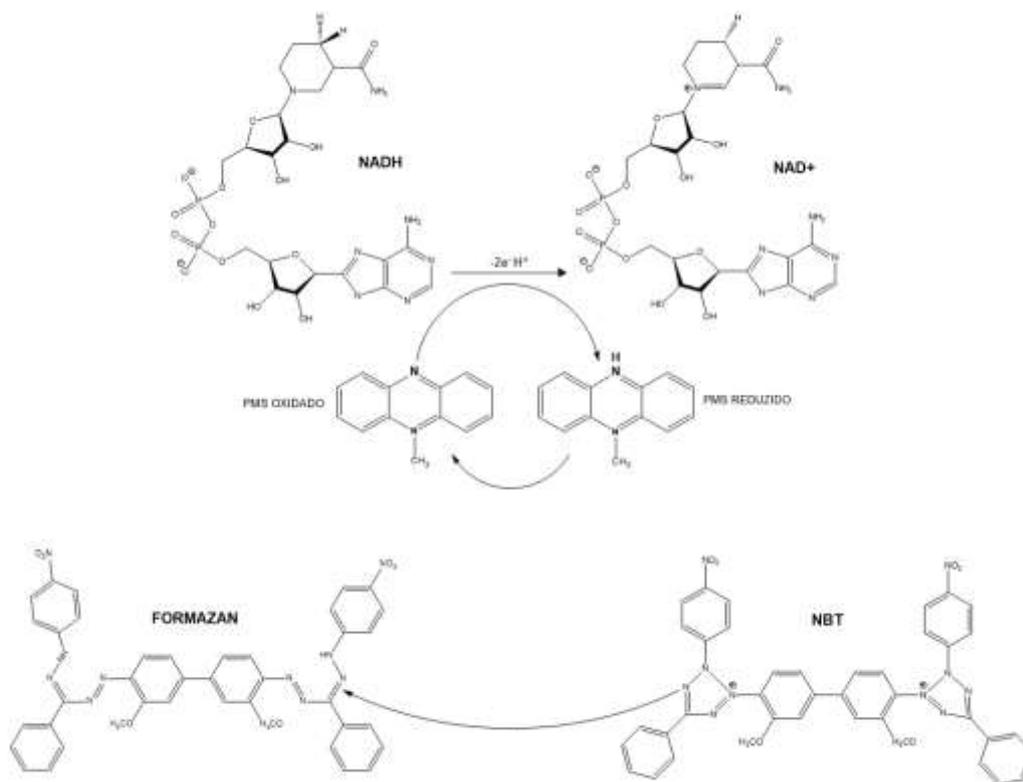
3.3.2. Ensaio de eliminação do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

O ensaio do ânion radical superóxido é uma técnica utilizada para medir a atividade do ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em amostras biológicas. O radical superóxido é um dos radicais

livres mais comuns e é conhecido por causar danos celulares e contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas.

O ensaio de eliminação $O_2^{\cdot-}$ foi gerado pelo sistema NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) / PMS (Metassulfato de Fenazina) / $O_2^{\cdot-}$, capacidade de eliminação foi determinada a partir de espectrofotometria, monitorando o efeito das amostras (3 - 300 μ M) em $O_2^{\cdot-}$, induzida por NBT (Nitrozul de Tetrazólio) (Gomes et al. 2019). Os resultados são expressos como inibição, em porcentagem, a absorvância é medida em um espectrofotômetro a um comprimento de onda específico, geralmente entre 480 e 550 nm, para quantificar o produto formazan.

Figura 16 - Representação da formação de ânion radical superóxido e ação de um antioxidante presente no meio.



4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Avaliação da atividade antiglicante no sistema inicial de glicação

O potencial antiglicante dos derivados aminoguanidínicos foi mensurada por um sistema que engloba o estágio inicial de glicação, na qual a BSA foi submetida à glicação por via dos açúcares glicose e frutose. O sistema (Glicose+Frutose/BSA) é um modelo amplamente difundido para utilização em estudos de glicação via não enzimática (MENDES, 2019).

Tabela 5 – Valores de IC₅₀ para a capacidade antiglicante no estágio inicial (BSA/Glicose+Frutose).

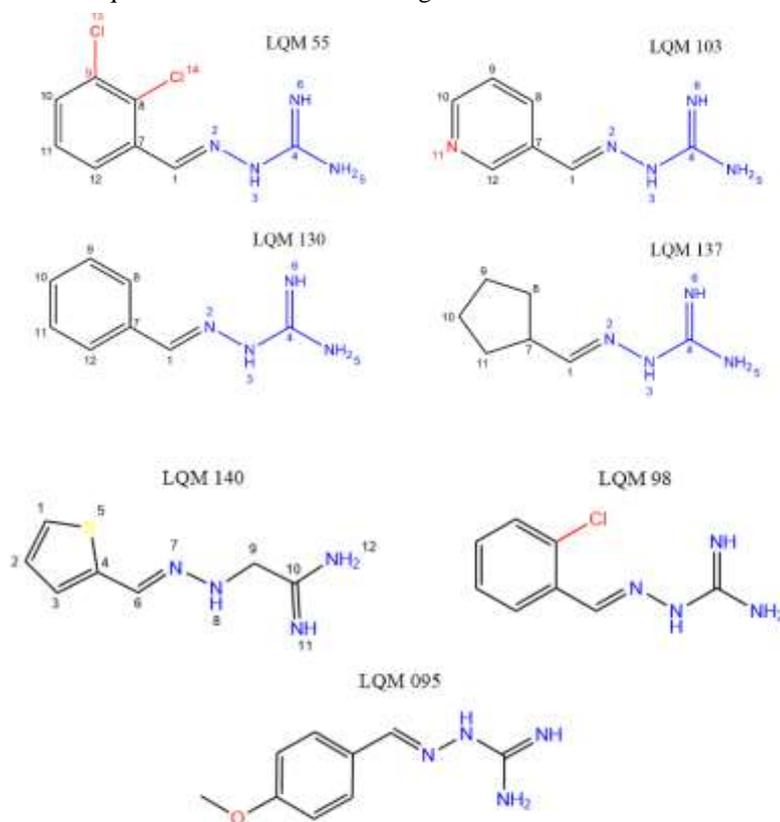
Amostra	Sistema BSA/Glicose+Frutose
	IC ₅₀ (μM)
LQM 55	60,5 ± 0,2
LQM 103	85,8 ± 0,3
LQM 130	174,4 ± 1,0
LQM 137	33,6 ± 0,6
LQM 098	134,6 ± 0,4
LQM 140	290,1 ± 0,7
LQM 95	81,3 ± 0,3
AMINOQUANIDINA	45,2 ± 1,4

Fonte: Autor 2022

As LQM 137 e LQM 55 apresentaram atividade antiglicante promissora com o IC₅₀ de 33,6 e 60,5 μM, respectivamente, para o sistema inicial (BSA/Glicose+Frutose), sendo o segundo melhor potencial avaliado no estudo, o padrão positivo aminoguanidina apresentou valor de IC₅₀ aproximado 45,2 μM, ou seja, o derivado aminoguanidínico LQM 137 conseguiu ser ainda mais ativo do que a aminoguanidina, sendo a amostra que apresentou o melhor resultado, dentre as testadas, apresentando valor menor de IC₅₀ menor que o padrão aminoguanidina.

As amostras LQM 098, LQM 130 e LQM 140 apresentaram os maiores valores de IC_{50} , de 134,6, 174,4 e 290,1 μM , respectivamente, sendo os menos promissores entre os derivados para o estágio inicial da glicação.

Figura 17 – Estrutura química dos derivados aminoguanidínicos testados.



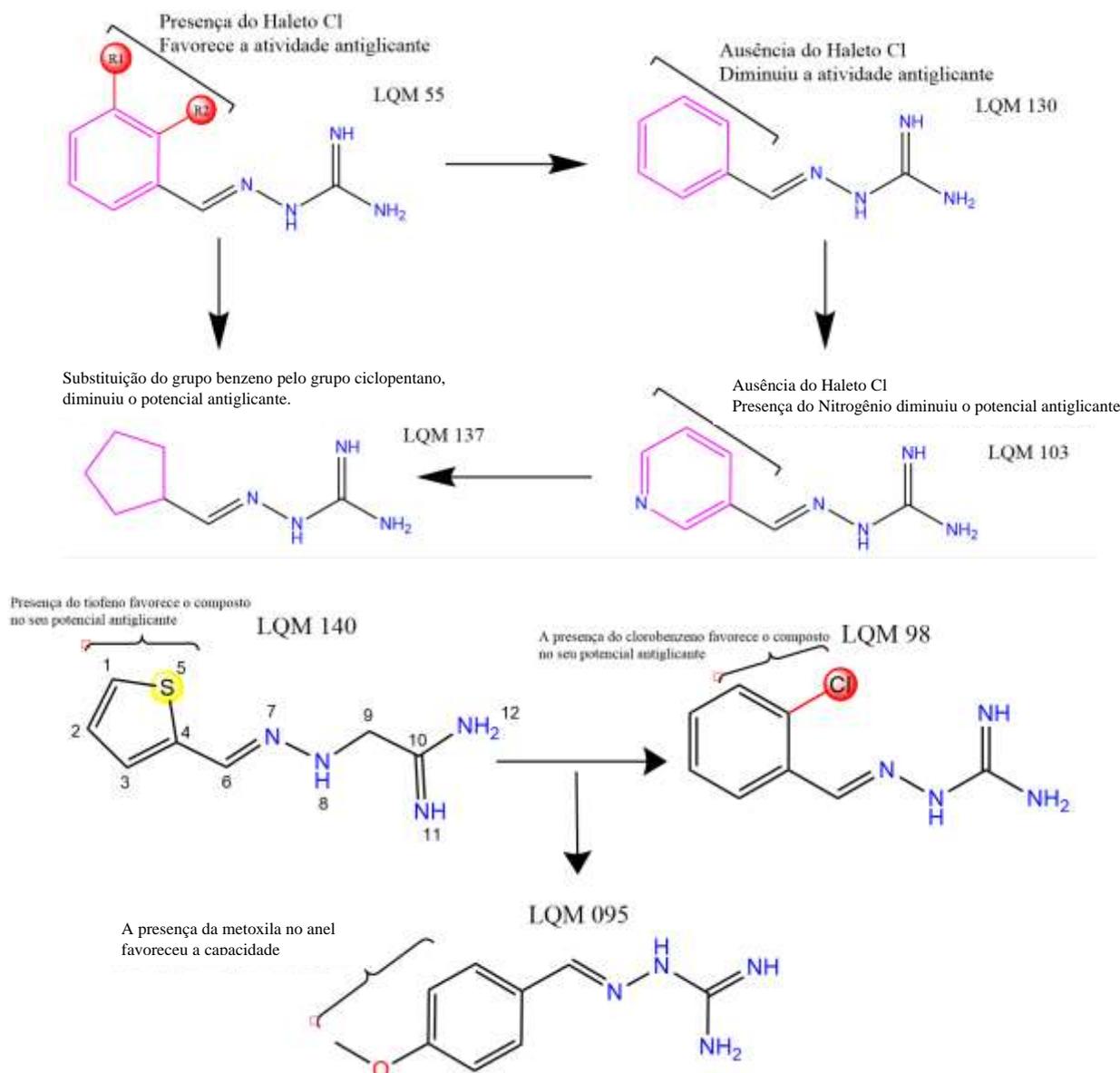
Fonte: Autor 2022

Analisando a estrutura da LQM 55 que possui o orto-diclorobenzeno, que conta com a presença de dois cloros na posição C9 e C8 que tem uma grande eletronegatividade, em relação a LQM 130 que possui o mesmo grupo benzeno com a ausência dos cloros nas posições C9 e C8. Logo, a presença dos dois átomos de cloro aumenta a capacidade antiglicante nessa estrutura base de molécula.

Analisando a estrutura da LQM 103 podemos ver que ligado à sua estrutura base temos uma piridina que atua como mediador das reações de oxirredução, formando ligações NADH que atua no transporte de elétrons. Comparando com a LQM 137 que apresentou resultado superior, mais estudos devem ser realizados com base no mecanismo de atuação da molécula visto que a diferença da LQM 137 para LQM 103 é a substituição da piridina pelo ciclopentano, mas nos resultados este resultado não foi evidenciado, visto que a LQM 137 apresentou resultado acima do IC_{50} da aminoguanidina. Podemos resumir as alterações na seguinte ilustração abaixo.

Analisando as estruturas abaixo podemos evidenciar que a presença ou ausência de átomos eletronegativos geram interferência na capacidade antiglicante da molécula. As estruturas LQM 098 e LQM 095 são bastantes similares na sua estruturação alterando que em uma possui o grupo clorobenzeno e na outra molécula um grupamento éter ligado ao benzeno, vemos que apesar dos átomos possuírem uma eletronegatividade alta, quando o cloro está ligado diretamente no benzeno favorece o potencial antiglicante da molécula. Em contrapartida a LQM 140 no lugar do benzeno possui um tiofeno que não favoreceu o potencial Antiglicante. A LQM 130 em nível estrutural se mostra bastante próxima a estrutura da LQM 095, analisando o potencial antiglicante das duas amostras vemos que a presença da metoxila ligada ao anel favoreceu o potencial antiglicante da LQM 095 com relação a LQM 130.

Figura 18 - Representação das alterações nas amostras testadas.



A atividade antiglicante dos derivados aminoguanidínicos no sistema intermediário da glicação, consiste em avaliar o potencial no estágio da glicação, em que o MG (metilglioxal) é utilizado como ponto de partida para o início da reação. Os dados obtidos através deste experimento estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 - Representação dos dados obtidos para avaliação da glicação no estágio intermediário.

AMOSTRA	BSA/MG IC ₅₀ (μM)
LQM 55	70,5 ± 0,1
LQM 103	100,4 ± 1,1
LQM 130	145,2 ± 1,2
LQM 137	65,3 ± 0,2
LQM 098	85,4 ± 1,1
LQM 140	90,0 ± 1,1
LQM 95	300,0 ± 1,2
AMINOGUANIDINA	35,3 ± 0,4

Fonte: Autor 2022

Os compostos LQM 55 e LQM 137 apresentaram novamente os menores valores de IC₅₀, sendo de 70,5 e 65,3 μM, respectivamente. Evidenciando que esses compostos são os mais ativos para a capacidade antiglicante nos estágios iniciais e intermediários da reação.

No entanto, as LQM 130 e 095 apresentaram alto valores de IC₅₀ sendo de 145,2 μM e 300,0 μM, respectivamente, quando comparadas ao padrão positivo aminoguanidina (IC₅₀:48.24 μM) e aos outros derivados. Logo, as modificações estruturais destas amostras não contribuíram para uma capacidade semelhante à da sua molécula base para captura de espécies carbonílicas reativas como o metilglioxal.

A LQM 098 possui o IC₅₀ mensurado em 85,4 μM evidenciando que a presença do clorobenzênio ligado a estrutura da aminoguanidina favorece o potencial inibitório da glicação, visto que as amostras LQM 103 e LQM 130 não possuem a presença do haleto.

A aminoguanidina possui a capacidade de inibir a formação de AGEs através de vários mecanismos de ação, como através da inibição da reação entre o açúcar redutor e a proteína; na inibição da atividade da enzima glicosiltransferase: que é responsável por adicionar açúcares às

proteínas, impedindo assim a etapa inicial da reação de glicação; através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes, a aminoguanidina pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes que podem ajudar a proteger as células contra danos causados pelas espécies reativas, incluindo a formação de AGEs, que também leva a formação destas espécies; age no estágio intermediário da reação de glicação, nesta etapa ocorre a formação de espécies carbonílicas altamente reativas como o metilglicoxal e o glioxal, que reagem mais rapidamente com biomoléculas levando a formação de AGEs, essa propriedade da aminoguanidina é está relacionada a presença do grupo hidrazina na molécula (BARBOSA, 2012; WANG et al., 2007).

Como as amostras testadas, são produtos derivativos da aminoguanidina, podemos assumir que elas herdaram características da sua molécula base, um fator que pode estar contribuindo para que as moléculas apresentem boa capacidade antiglicante.

4.3. Avaliação da atividade Antioxidante via eliminação do ácido hipocloroso

A determinação da capacidade antioxidante foi avaliada pelo método de eliminação do ácido hipocloroso. Os resultados obtidos para os valores de IC₅₀ da concentração de eliminação de HOCl para os derivados aminoguanidínicos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Capacidade de eliminação de ácido hipocloroso (HOCl).

Amostra	HOCl (IC ₅₀ -µM)
LQM 55	18,8 ± 0,1
LQM 103	9,4 ± 0,1
LQM 130	9,4 ± 0,8
LQM 137	18,8 ± 0,8
LQM 098	18,9 ± 0,2
LQM 140	17,8 ± 0,1
LQM 095	30,7 ± 0,2
QUERCETINA	25,9 ± 0,4

Fonte: Autor 2022

Os resultados de capacidade antioxidante frente ao HOCl (Tabela 7) para todas as LQMs testadas se mostraram promissores, com IC₅₀ menor que o obtido para a quercetina (25,9 µM),

com exceção da LQM 095 (30,7 μM) que apresentou maior valor que a quercetina, mas ainda assim muito próximo do padrão positivo quercetina. A LQM 103 e LQM 130 foram as mais ativas, com IC_{50} de 9,4 μM , quase 3 vezes menor que o padrão positivo.

O potencial antioxidante também é importante para a capacidade antiglicante, visto que o estresse oxidativo pode levar ao estresse carbonílico e vice-versa. Dessa forma a atividade antioxidante também é um dos mecanismos de inibição da glicação.

4.4. Avaliação da atividade Antioxidante eliminação do ânion radical superóxido

A determinação da capacidade antioxidante também foi avaliada pelo método de sequestro do radical ânion superóxido. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para os valores de IC_{30} para eliminação do radical ânion superóxido pelos derivados aminoguanidínicos em comparação com os resultados obtidos com o padrão positivo quercetina, que é um antioxidante amplamente conhecido.

Tabela 8 - Representação dos dados obtidos no ensaio do ânion radical superóxido.

Amostra	$\text{O}_2^{\cdot-}$ ($\text{IC}_{30}\text{-}\mu\text{M}$)
LQM 55	30,3 \pm 0,3
LQM 103	45,8 \pm 0,1
LQM 130	35,5 \pm 0,1
LQM 137	40,2 \pm 0,5
LQM 098	60,2 \pm 1,2
LQM 140	80,4 \pm 0,9
LQM 95	72,4 \pm 0,4
QUERCETINA	36,5 \pm 0,2
AMINOGUANIDINA	50,5 \pm 0,3

Fonte: Autor, 2022.

Durante a experimentação de eliminação do ânion radical superóxidos, não foi possível a quantificação dos resultados até o IC_{50} , pois os compostos não alcançaram 50 % de inibição

revelando que são mais ativos frente ao HOCl do que ao $O_2^{\cdot-}$. Em consequência conseguiu-se mensurar os dados até seu IC_{30} , em que a amostra que obteve maior desempenho foi a LQM 55 (30,3 μM) e LQM 130 (35,5 μM) com valores de melhores que o da quercetina e da aminoguanidina.

Esses resultados evidenciam que os derivados também possuem capacidade antioxidante, no entanto são mais ativos frente o HOCl. Com destaque para as LQMs 55, 103, 130 e 137 que apresentaram os melhores resultados nos dois ensaios antioxidantes aplicados. Destas, as duas mais promissoras tem sido a LQM 55 e LQM 137, pois também apresentaram os melhores resultados para os ensaios antiglicantes, tendo assim maior potencial de atuação frente aos estresses carbonílico e oxidativo.

4.5. Avaliação da capacidade de captura de metilglioxal através de derivatização com OPD

A capacidade de captura de MGO pelos derivados aminoguanidínicos foi mensurada através da reação de derivatização com OPD, possibilitando a avaliação do produto de derivatização 2-MQ, que é produzido em menor extensão, ocorrendo quando a amostra não interage capturando o MGO e o deixa disponível para reação com OPD. Portanto, para a amostra que possui uma maior capacidade de captura de MGO espera-se uma menor intensidade de formação do pico relacionado à 2-MQ, comparando com o sistema padrão que está na ausência da amostra e possui apenas (OPD+MGO).

A Tabela 9 apresenta a porcentagem de captura de MGO para as amostras mais ativas nos ensaios anteriores (LQMs 55, 103, 130 e 137), os resultados foram calculados com base no cromatograma total do sistema (OPD+MGO) como sendo o referencial base sobre a área do sistema OPD, MG + amostra, pela fórmula abaixo onde (AA – Área total do Sistema OPD+MGO+ Amostra, AOM – Área total do Sistema OPD+MGO)

$$\% \text{ Remanescente de MGO} = \frac{AA * 100}{AOM}$$

Tabela 9 - Representação dos dados obtidos no ensaio de captura de OPD.

Amostra	% Remanescente de MGO
LQM 55	34
LQM 103	25
LQM 130	39
LQM 137	62
AMINOGUANIDINA	6

Fonte: Autor, 2022.

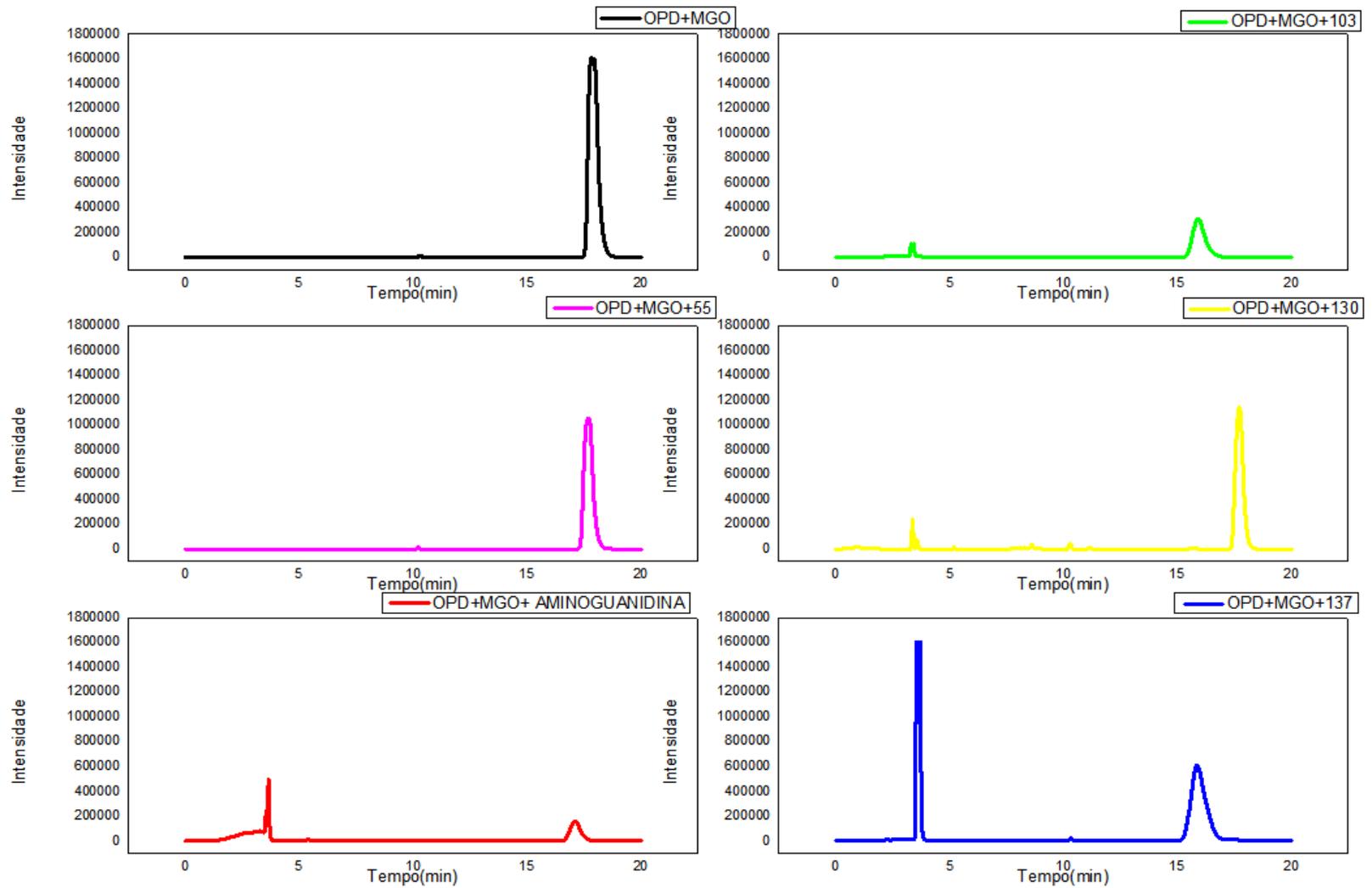
A captura de metilglioxal, um intermediário altamente reativo da glicação não enzimática de proteínas, é um importante parâmetro na avaliação da atividade antioxidante de compostos naturais e sintéticos. Isto, pelo fato de que o metilglioxal é uma espécie carbonílica reativa que reage com biomoléculas para formar AGEs.

Neste estudo, avaliamos a capacidade das quatro amostras mais promissoras nos outros ensaios, a LQM 55, a LQM 103, a LQM 130 e a LQM 137) em capturar metilglioxal em comparação com a aminoguanidina, que já é reconhecida por sua capacidade capturadora de metilglioxal.

Os resultados mostraram que todos os derivados foram capazes de capturar metilglioxal, mas em quantidade diferentes e que nenhum dos derivados apresentou maior capacidade de captura maior que o seu precursor aminoguanidina.

Esses resultados indicam que a atividade capturadora de metilglioxal das amostras pode variar significativamente, mesmo dentro da mesma família de compostos. Além disso, este estudo não fez uma avaliação cinética, onde poderíamos ter avaliado até quanto tempo as amostras continuariam a capturar metilglioxal e o máximo de captura. Por tanto, repetiremos os ensaios variando o tempo de incubação das amostras com metilglioxal para obtenção de mais informações a cerca da reatividade desses compostos frente a espécies carbonílicas reativas.

Figura 19 - Cromatogramas das amostras testadas.



Fonte: Autor, 2022.

5. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que os derivados aminoguanidínicos apresentaram capacidade antiglicante e antioxidante, sendo mais ativos para o HOCl que o padrão positivo utilizado, quercetina e que seu precursor aminoguanidina. Os derivados LQM 55 e LQM 137 foram os mais promissores nos ensaios empregados, podendo atuar na atenuação dos estresses oxidativo e carbonílico. No entanto, mais estudos precisam ser realizados especialmente relacionados a toxicidade das amostras.

6. REFERÊNCIAS

- ABATE, G.; DELBARBA, A.; MARZIANO, M.; MEMO, M.; UBERTI, D. Advanced Glycation End Products (Ages) in Food: Focusing on Mediterranean Pasta. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, v. 05, n. 06, 2015. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/open-access/advanced-glycation-end-products-ages-in-food-focusing-on-mediterranean-pasta-2155-9600-1000466.php?aid=66293>. Acesso em: 06 mar. 2023.
- AHMAD, M. S.; AHMED, N. Antiglycation properties of aged garlic extract: possible role in prevention of diabetic complications. *J Nutr.*, v. 136, n.3, p. S796-2, 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/136/3/796S/4664405>. Acesso em: 06 mar. 2023.
- AHMED, M. U. et al. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Ne-carboxymethyl-lysine- and Ne-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem. J.* v. 364, p. 1-14, 2002. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article/364/1/1/39257/Assay-of-advanced-glycation-end-products-AGEs>. Acesso em: 06 mar. 2023.
- AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005. Disponível em: [https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227\(04\)00243-3/fulltext](https://www.diabetesresearchclinicalpractice.com/article/S0168-8227(04)00243-3/fulltext). Acesso em: 06 mar. 2023.
- ANGUIZOLA, J., MATSUDA, R., BARNABY, O. S., HOY, K. S., WA, C., DEBOLT, E., KOKE, M., HAGE, D. S. Review: Glycation of human serum albumin. *Clinica Chimica Acta*, v. 425, p. 64-76, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898113003066>. Acesso em: 06 mar. 2023.
- ARAGNO, M.; MASTROCOLA, R. Dietary sugars and endogenous formation of advanced glycation endproducts: Emerging mechanisms of disease. *Nutrients*, v. 9, n. 4, p. 1–16, 2017. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/4/385>. Acesso em: 06 mar. 2023.
- BARBOSA, J. H. P.; SOUZA, I. T.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGEs) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 5, n. 39, p. 608-620, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422016000500608&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 06 mar. 2023.

BARBOSA, Júnia H. Porto; SOUZA, Isis T.; SANTANA, Antônio E. G.; et al. Determination of advanced glycation (AGEs) and lipoxidation (ALEs) end products in foods and biological systems: advances, challenges and perspectives. *Química Nova*, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422016000500608&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 06 mar. 2023.

BARBOSA, Júnia H. Porto; SOUZA, Isis T.; SANTANA, Antônio E. G.; et al. Determination of advanced glycation (AGEs) and lipoxidation (ALEs) end products in foods and biological systems: advances, challenges and perspectives. *Química Nova*, v. 39, n. 5, p. 608-620, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422016000500608&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 06 mar. 2023.

BARREIROS, André L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422006000100019&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 06 mar. 2023.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food and Chemical Toxicology*, v. 107, p. 302–317, 2017.

XAVIER, Jadriane de Almeida. Estresse carbonílico: avaliação in vitro de efeitos pró-oxidantes e antiglicantes em sistema modelo. 2018. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, 2018.

FAVRE, Leonardo Cristian; ROLANDELLI, Guido; MSHICILELI, Ndumiso; et al. Antioxidant and anti-glycation potential of green pepper (*Piper nigrum*): Optimization of β -cyclodextrin-based extraction by response surface methodology. *Food Chemistry*, v. 316, p. 126280, 2020.

HODGE, J. E. Dehydrated foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 1, n. 15, p. 928–943, 1953.

HUNT, J. V.; DEAN, R. T.; WOLFF, S. P. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochemical Journal*, v. 256, n. 1, p. 205–212, 1988.

JEDSADAYANMATA, Arom. In Vitro Antiglycation Activity of Arbutin. *Naresuan University Journal*, v. 13, n. 2, p. 35–41, 2005.

- KISLINGER, Thomas; HUMENY, Andreas; PISCHETSRIEDER, Monika. Analysis of Protein Glycation Products by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Current Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 16, p. 2185-2193, 2004.
- KUO, Chiung-Tsun et al. Antioxidant and antiglycation properties of different solvent extracts from Chinese olive (*Canarium album* L.) fruit. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 8, n. 12, p. 1013-1021, 2015.
- NAMIKI, M.; HAYASHI, T. A new mechanism of the Maillard reaction involving sugar fragmentation and free radical formation. In: WALLER, G.R.; FEATHER, M.S. (orgs.) *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*. ACS Symposium Series. American Chemical Society, 1983. p. 215.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, v. 115, p. 469-475, 2009.
- SHEN, I.; 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.
- STAROWICZ, Małgorzata ; ZIELIŃSKI, Henryk. Inhibition of Advanced Glycation End-Product Formation by High Antioxidant-Levelled Spices Commonly Used in European Cuisine. *Antioxidants*, v. 8, n. 4, p. 100, 2019.
- WANG, W.; YAGIZ, Y.; BURAN, T. J.; NUNES, C. N.; GU, L. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food Research International*, v. 44, p. 2666-2673, 2011.
- WOLFF, S.P.; CRABBE, M.J.C.; THORNALLEY, P.J. The autoxidation of glyceraldehydes and other simple monosaccharides. *Experientia*, v. 40, p. 244–246, 1984.
- WU, C.-H.; YEN, G. C. Inhibitory Effect of Naturally Occurring Flavonoids on the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 8, p. 3167–3173, 2005.