

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
QUÍMICA LICENCIATURA

Lucas Antonio Ferreira da Rocha

**Avaliação da capacidade antioxidante e antiglicante do extrato etanólico das folhas da  
Espinheira Santa (*Maytenus Illicifolia*)**

Maceió - AL  
2024

Lucas Antonio Ferreira da Rocha

**Avaliação da capacidade antioxidante e antiglicante do extrato etanólico das folhas da  
Espinheira Santa (*Maytenus Ilicifolia*)**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Jadriane de Almeida Xavier

Maceió - AL

2024

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

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

L695u Rocha, Lucas Antonio Ferreira da.

Avaliação da capacidade antioxidante e antiglicante do extrato etanólico das folhas da Espinheira Santa (*Maytenus Illicifolia*) / Lucas Antonio Ferreira da Rocha. – 2024.

69 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, 2024.

Bibliografia: f. 62-69.

1. Espinheira Santa. 2. Antioxidantes. 3. Agentes antiglicação. I. Título.

CDU: 542.943'78:582.766

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado determinação e forças durante todo meu período de graduação.

Agradeço à minha família, em especial a minha Mãe Simone, pelo incentivo no ingresso da vida acadêmica e o apoio demonstrado durante todo o curso.

Ao meu amigo e companheiro Pedro Mendes pela cumplicidade e apoio durante os momentos mais difíceis do curso e da vida acadêmica.

Aos meus amigos e amigas Wanne, Cecília, Franciele, Laura, Larissa, Vitor, Allan e Felipe por suas amizades durante minha vida, por compartilharem comigo as experiências acadêmicas, pelo incentivo demonstrado e pelo companheirismo nessa jornada.

Aos meus amigos e companheiros de gestão do centro acadêmico de química, Richard, Vitória, Monyque e Victor pela troca de experiências, companheirismo e trabalhos desenvolvidos.

Aos meus amigos, Felipe, Ana Beatriz, Tauane, Jessica, Flávia e Aline do Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo, pelo auxílio prestado, trabalhos desenvolvidos, amizades e troca de experiências.

Agradeço em especial à minha orientadora professora Dra. Jadriane Xavier pela orientação prestada, pela paciência, respeito, dedicação, por seus conhecimentos compartilhados que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho e principalmente por sua amizade.

A todos os professores e professoras do Instituto de Química e Biotecnologia, que ajudaram e contribuíram para a minha formação acadêmica.

A todos aqueles que fizeram parte dessa jornada e que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Aos órgãos financiadores CNPq, CAPES e UFAL, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A geração de espécies reativas no organismo, quando em excesso, são capazes de causar danos à saúde através de mudanças e alterações na conformação e estruturas de proteínas e outras biomoléculas, levando ao desenvolvimento e/ou progressão de doenças degenerativas por meio de processos conhecidos como estresse nitro-oxidativo (ENO), estresse carbonílico (EC), peroxidação lipídica e glicação. Nesse sentido, a busca por compostos naturais capazes de reduzir as espécies reativas e as suas consequências se faz necessária. Alimentos e plantas possuem estruturas antioxidantes e antiglicantes capazes de reagir com as espécies reativas reduzindo suas consequências e diminuindo os produtos de glicação avançada (AGEs) provenientes da reação de glicação. As folhas da espécie *Maytenus ilicifolia*, popularmente conhecida como espinheira santa, são utilizadas pela medicina popular no tratamento de inflamações gastrointestinais e possui em sua composição estruturas polifenólicas pertencentes aos flavonóides como as catequinas, sendo capazes de atuar na redução das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) e espécies reativas carbonílicas (ECRs). Deste modo, a presente proposta determinou, através do extrato etanólico das folhas da espécie *Maytenus ilicifolia*, as capacidades antioxidantes (pelos ensaios DPPH•, FRAP, sequestro do radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e do Ácido Hipocloroso (HOCl)) e as capacidades antiglicantes (pelos sistemas de glicação com glicose e frutose (GLI+FRU) ou com metilglioxal (MGO) e a captura de MGO através de derivatização com ortofenilenodiamina (OPD)). Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram a capacidade antiglicante do extrato, no sistema GLI+FRU com  $IC_{50}$  em 140  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto no sistema com MGO o valor de  $IC_{50}$  foi de 120  $\mu\text{g/mL}$ . Os ensaios antioxidantes corroboraram com os dados da literatura, com  $IC_{50}$  de 27,7  $\mu\text{g/mL}$  para o ensaio do DPPH• e 0,95  $\mu\text{g}$  de ET (Equivalente de Trolox) para o ensaio do FRAP. Para as espécies reativas HOCl e  $O_2^{\bullet-}$  foi identificado  $IC_{40}$  nas concentrações aproximadas de 1  $\mu\text{g/mL}$  e 110  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O ensaio de captura de MGO evidenciou um potencial de captura desse dicarbonílico em 50% pelo extrato. Esses resultados destacam o potencial promissor do extrato das folhas de *Maytenus ilicifolia* para aplicações em condições de saúde associadas ao estresse oxidativo e carbonílico, contribuindo para estratégias terapêuticas que visam a mitigação dos danos causados pelas espécies reativas.

**Palavras-chave:** *Maytenus ilicifolia*, Atividade antioxidante, Atividade Antiglicante.

## ABSTRACT

The generation of reactive species in the body, when in excess, can cause damage to health through changes and alterations in the conformation and structures of proteins and other biomolecules, leading to the development and/or progression of degenerative diseases through processes known as nitro-oxidative stress (ENO), carbonyl stress (CE), lipid peroxidation and glycation. In this sense, the search for natural compounds capable of reducing reactive species and their consequences is necessary. Foods and plants have antioxidant and antiglycant structures capable of reacting with reactive species, reducing their consequences and reducing advanced glycation end products (AGEs) resulting from the glycation reaction. The leaves of the species *Maytenus ilicifolia*, popularly known as espinheira santa, are used in folk medicine in the treatment of gastrointestinal inflammations and have in their composition polyphenolic structures belonging to flavonoids such as catechins, being capable of acting in the reduction of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) and reactive carboline species (RCS). Thus, the present proposal determined, through the ethanolic extract of the leaves of the species *Maytenus ilicifolia*, the antioxidant capacities (by the DPPH<sup>•</sup>, FRAP, scavenging of the superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) and hypochlorous acid (HOCl) assays) and the antiglycation capacities (by the glycation systems with glucose and fructose (GLI+FRU) or with methylglyoxal (MGO) and the capture of MGO through derivatization with orthophenylenediamine (OPD)). The results obtained in this study demonstrated the antiglycation capacity of the extract in the GLI+FRU system with IC<sub>50</sub> of 140 µg/mL, while in the system with MGO the IC<sub>50</sub> value was 120 µg/mL. The antioxidant assays corroborated the literature data, with IC<sub>50</sub> of 27.7 µg/mL for the DPPH<sup>•</sup> assay and 0.95 µg of ET (Trolox Equivalent) for the FRAP assay. For the reactive species HOCl and O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, IC<sub>40</sub> was identified at approximate concentrations of 1 µg/mL and 110 µg/mL, respectively. The MGO capture assay showed a capture potential of this dicarbonyl in 50% by the extract. These results highlight the promising potential of *Maytenus ilicifolia* leaf extract for applications in health conditions associated with oxidative and carbonyl stress, contributing to therapeutic strategies aimed at mitigating the damage caused by reactive species.

**Keywords:** *Maytenus ilicifolia*, Antioxidant activity, antiglycation activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Produtos intermediários do processo de glicação gerados pelos ENO e EC. ....	16
Figura 2 - Estrutura química da catequina, epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina e galato de epigallocatequina, respectivamente. ....	18
Figura 3 - Representação esquemática das principais fontes exógenas das espécies reativas, das principais ERONs e ECRs e o ataque dessas espécies a uma célula saudável.....	21
Figura 4 - Formação das principais EROs e ERNs provenientes da conversão biológica do oxigênio formando os radicais anion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) como provedores das demais espécies reativas.....	23
Figura 5 – Representação do processo de fagocitose onde ocorre a formação de $O_2^{\cdot-}$ , HOCl e $H_2O_2$ por ativação das NOXs na membrana celular. ....	24
Figura 6 - Mecanismo da reação do ácido linoleico iniciada com o radical $HO\cdot$ .....	26
Figura 7 - Estágio inicial da reação de Maillard.....	30
Figura 8 - Estágio Intermediário da Reação de Maillard. ....	31
Figura 9 - Estrutura dos principais produtos de glicação avançada (AGEs).....	32
Figura 10 - Diferentes rotas de formação das Espécies Carbonílicas Reativas (ECRs). ....	33
Figura 11 - Principais doenças degenerativas causadas pelos AGEs no organismo humano. .	35
Figura 12 - Principais compostos inibidores do processo de glicação e formação dos AGEs.	37
Figura 13 - Estrutura química geral de um flavonoide e da molécula da quercetina. ....	38
Figura 14 - Ocorrência da espinheira santa na américa do sul.....	40
Figura 15 - Características morfológicas das folhas da <i>Maytenus Illicifolia</i> .....	41
Figura 16 - Reação de redução do radical DPPH $\cdot$ por um antioxidante genérico RH. ....	47
Figura 17 - Reação de redução do complexo TPTZ [Fe(III)/Fe(II)]. ....	48
Figura 18 - Representação esquemática da geração do ânion radical superóxido e ação de um antioxidante presente no meio. ....	50
Figura 19 - Esquema da oxidação da di-hidrorodamina 123 (DHR) à rodamina 123.....	50
Figura 20 - Potencial de redução dos AGEs pelo EETES expresso em porcentagem de inibição.....	57
Figura 21 - Potencial de redução dos AGEs pelo EETES expresso em porcentagem de inibição de metilglioxal.....	59
Figura 22 - Cromatograma em CLAE da formação da 2-metilquinoxalina e cromatograma em CLAE da captura de metilglioxal pela aminoguanidina (padrão positivo) respectivamente. ....	60

Figura 23 - Cromatograma em CLAE da captura de metilglioxal pelo extrato das folhas da Espinheira Santa ..... 60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reatividade do HOCl com espécies oxigenadas e nitrogenadas.....	25
Tabela 2 - Reagentes e solventes utilizados no trabalho desenvolvido. ....	43
Tabela 3 - Equipamentos utilizados no trabalho desenvolvido. ....	44
Tabela 4 - Rendimento da extração etanólica da espinheira santa. ....	54
Tabela 5 - Teste de Solubilidade do extrato etanólico da espinheira santa (EETES).....	54
Tabela 6 – Capacidade Antioxidante do DPPH• (IC <sub>50</sub> ) e FRAP pelo EETES.....	55
Tabela 7 - Potencial de captura do radical DPPH• pelo EETES expresso em porcentagem de redução .....	55
Tabela 8 - Dados de IC <sub>40</sub> do O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> e HOCl do extrato EETES e padrão.....	56
Tabela 9 - Potencial de redução dos AGEs pelo EETES expresso em porcentagem de inibição .....	57
Tabela 10 - Potencial de captura de metilglioxal pelo EETES expresso em porcentagem de inibição de metilglioxal.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-MQ	2-Metilquinoxalina
3-DG	3-desoxiglucosona
$\alpha$ -DC	$\alpha$ -dicarbonílicos
ADP	Adenosina difosfato
AFLD	Doença hepática gordurosa alcoólica
AM	Aminoguanidina
AGEs	Advanced Glycation Endproducts (Produtos finais de glicação avançada)
ALEs	Advanced Lipoxidation Endproducts (Produtos finais de lipoxidação avançada)
ArgP	Argpirimidina
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Catalase
CEL	Carboxietil lisina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CML	Carboximetil-lisina
CTe-	Cadeia transportadora de elétrons
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DHR	Dihidrorodamina
DPPH <sup>*</sup>	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECG	Epigalocatequina
EGCG	Epigalocatequina-3-galato
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Estresse Carbonílico
ECRs	Espécies carbonílicas reativas
EETES	Extrato Etanólico da Espinheira Santa
ENO	Estresse nitro-oxidativo
ERONs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power (Capacidade antioxidante redutora de íon férrico)
FRU	Frutose
GLI	Glicose
GCG	Galocatequina-galato
GO	Glioxal

GOLD Dímero de glioxal lisina  
GPx Glutaciona peroxidase  
GSH Glutaciona reduzida  
GSSG Glutaciona oxidada  
H<sup>+</sup> Gradiente de Próton  
HbA1C Hemoglobina glicosilada  
IC<sub>50</sub> Concentração que inibe 50% de determinada atividade  
IV Infravermelho  
MEC Matriz extracelular  
MG-H1 Metilglioxal hidroimidazolona isômero 1  
MGO Metilglioxal  
MOLD Dímero de meilglioxal lisina.  
MPO Mieloperoxidase  
NADH Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido  
NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido  
NADP<sup>+</sup> Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado  
NBT Cloreto de tetrazólio-nitroazul  
NOXs NADPH oxidase  
NOS Nitric Oxide Synthase (Óxido nítrico sintase)  
OPD o-fenilenodiamina  
PMS Metassulfato de fenazina  
RNA Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)  
RAGE Receptor for Advanced Glycation End-products (Receptores sensíveis a AGEs)  
RH Grupo carboxila de ácido graxo ou cadeias lipídicas  
S-H Sulfidrila  
SOD Superóxido dismutase  
TPTZ 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina  
Trolox Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico  
UV Ultravioleta  
UV-vis Ultravioleta visível

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	19
2.1 O estresse oxidativo, nitrosativo e carbonílico .....	19
2.1.1 A natureza das espécies reativas: fontes exógenas e endógenas.....	19
2.1.2 Formação e características das espécies reativas .....	22
2.2 A geração dos Produtos de glicação avançada – AGEs .....	28
2.2.1 A história e definição de glicação .....	28
2.2.2 As etapas da reação de Maillard e a formação dos AGEs .....	29
2.2.2 A glicação e sua relação com as espécies carbonílicas reativas (ECRs).....	32
2.2.3 Os AGEs e sua relação com as Doenças degenerativas .....	34
2.2.4 O papel dos antioxidantes na redução dos ERONs, ERCs e AGEs .....	35
2.3 <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	39
2.3.1 A espinheira santa e suas características principais .....	39
2.3.2 Aplicações e Uso medicinal.....	41
2.4 Objetivos.....	42
2.4.1 Objetivo Geral.....	42
2.4.2 Objetivos Específicos .....	42
3 EXPERIMENTAL E MÉTODOS .....	43
3.1 Experimental.....	43
3.1.1 Reagentes, solventes e equipamentos.....	43
3.2 Métodos .....	44
3.2.1 Obtenção da planta para análise.....	45
3.2.2 Obtenção do extrato etanólico das folhas da <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	45
3.2.3 Ensaio Antioxidantes .....	46
3.2.3.2 Ensaio da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• .....	46
3.2.3.3 Determinação do Potencial redutor de ferro – FRAP.....	47
3.2.3.4 Avaliação da eliminação do radical ânion superóxido (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ).....	48
3.2.3.5 Ensaio de Eliminação do Ácido Hipocloroso (HOCl) .....	50
3.2.4 Ensaio antiglicantes .....	51
3.2.4.1 Sistema com açúcares redutores (FRU+GLI) e BSA.....	51
3.2.4.2 Sistema com MGO e BSA.....	52
3.2.4.3 Captura de MGO através de derivatização com OPD.....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	54
4.1 Rendimento do extrato .....	54
4.2 Testes de Solubilidade do Extrato.....	54

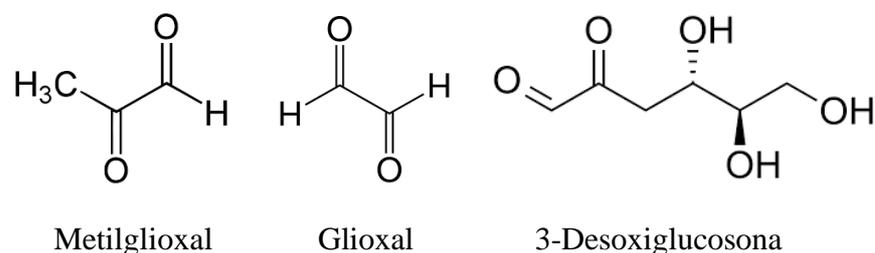
4.3 Capacidades antioxidantes do extrato .....	55
4.4 Capacidade Antiglicante do Extrato.....	56
4.5 Capacidade de captura de metilgloxal através de derivatização com OPD .....	59
5 CONCLUSÃO .....	61
6 REFERÊNCIAS.....	62

## 1 INTRODUÇÃO

Hábitos alimentares baseados no consumo de carboidratos excessivos, alimentos embutidos, ultra processados, com alto teor de açúcar adicionado e o grande aumento da poluição através da liberação de gases poluentes são os principais fatores para o aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), e espécies carbonílicas reativas (ECRs) no organismo (VELLOSA et al., 2021). Estes compostos são os principais responsáveis por encadear o estresse nitro-oxidativo (ENO) e carbonílico (EC), que consiste no desequilíbrio entre as espécies reativas e os agentes antioxidantes capazes de capturá-las, interferindo nas funções biológicas podendo gerar doenças degenerativas e crônicas como a diabetes, obesidade, doenças cardíacas, doenças renais, entre outras (SEMCHYSHYN et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2014).

As espécies reativas participam de diversos processos no organismo, como a lipoperoxidação e a glicação, reagindo com lipídeos, proteínas e outras biomoléculas podendo ainda gerar produtos pelo estresse nitro-oxidativo/carbonílico, tais como: metilglioxal (MGO), glioxal (GO) e 3-desoxiglucosona (3-DG) conforme estruturas representadas na Figura 1. Esses produtos funcionam como compostos intermediários na reação de glicação sendo um dos caminhos reacionais para formação dos produtos de glicação avançada (AGEs), sendo estes comprovadamente associados ao envelhecimento precoce da pele, doença de Parkinson, Mal de Alzheimer e outras doenças degenerativas (BARBOSA, et al., 2016; YEH et al., 2017).

**Figura 1- Produtos intermediários do processo de glicação gerados pelos ENO e EC.**



**Fonte:** AUTOR, 2024.

A geração dos AGEs é proveniente da reação de Maillard que é também a responsável pela formação das ECRs, consistindo na reação iniciada pelo ataque nucleofílico de um grupo amino de um aminoácido ao grupo carbonílico de um açúcar redutor ou lipídio oxidado, gerando uma molécula intermediária chamada de produtos de Amadori que, por sua vez,

reage com dicarbonílicos, como o MGO, GO e 3-DG, e por fim gera os AGEs. (URIBARRI et al., 2015).

De forma natural nosso organismo evita o processo de glicação por meio de reações que envolvem enzimas (oxaldeído redutase e aldose redutase) capazes de capturar os intermediários da glicação, além de eliminar os AGEs formados nos componentes teciduais a partir da proteólise extracelular ou por meio de macrófagos que endocitam os AGEs por receptores, liberando-os como AGE-peptídeos que são por fim excretados pelos rins. Contudo, com excesso dos AGEs esse tipo de mecanismo é insuficiente para evitar a glicação (BARBOSA et al., 2008).

Além disso, nosso organismo gera espécies antioxidantes que são capazes de capturar espécies reativas evitando o desequilíbrio redox e o ENO e EC. Porém, a geração de espécies reativas se torna superior a quantidade de antioxidantes gerados, necessitando de obtenção de antioxidantes por fontes exógenas. A obtenção de antioxidantes é feita através de alimentos que possuem em sua composição estruturas polifenólicas como os flavonoides que são as principais substâncias capazes de capturar os produtos intermediários da oxidação e os AGEs (YEN et al., 2017)

Os flavonoides são obtidos em vegetais, frutas, cereais, chás, legumes e outros alimentos. Suas estruturas são caracterizadas pela presença de anéis aromáticos, carbonilas e a presença de radicais hidroxila, sendo excelentes estabilizadores das espécies reativas formando produtos mais estáveis e menos prejudiciais. Por isso, a busca por vegetais, frutas e plantas antioxidantes tem sido objeto de estudo por pesquisadores no mundo todo buscando fontes de biomoléculas que evitem as consequências do ENO, EC e dos AGEs.

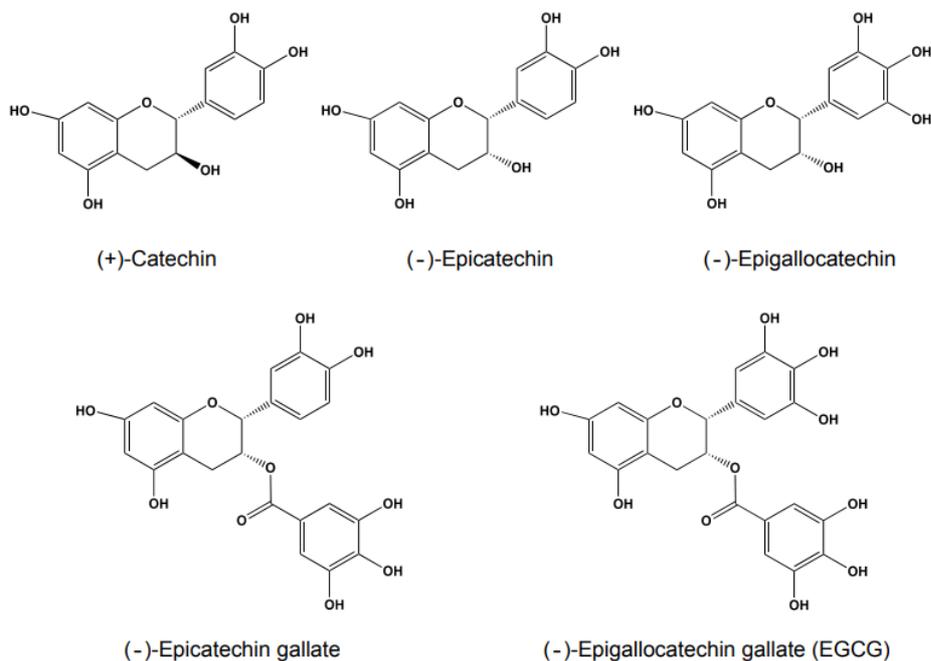
A espinheira santa faz parte da família botânica Celastraceae, tendo seu nome científico *Maytenus ilicifolia*, conhecido por esse nome devido suas folhas que apresentam espinhos e ser conhecido como um “santo remédio” no tratamento de diversas doenças (RAMALHO, 2014). Atualmente é aplicada para tratamento de inflamações gastrointestinais, como úlceras, gastrite, azia, gases e queimação no estômago. Estudos comprovaram ações benéficas da *Maytenus ilicifolia*, como sua ação curativa no tratamento de úlceras e gastrites (CIPRIANI et al., 2004; RAMALHO, 2014).

A identificação da composição química da *Maytenus ilicifolia* decorre de alguns estudos e foram identificados compostos como os pertencentes ao grupo dos terpenos, os triterpenos, taninos gálicos, flavanóis (epicatequina, epigalocatequina e galato de epigalocatequina),

glicolípídeos e os alcaloides (ALONSO, 1998; CARLINI & FROCHTENGARTEN, 1988; MENDES et al., 2006).

Os flavanóis são uma das classes de flavonoides que possuem capacidade antioxidante e incluem as catequinas, epicatequinas, epigalocatequinas, galato de epicatequinas e galato de epigalocatequinas, conforme estruturas mostradas na Figura 2. Além de incluírem as proantocianidinas, as teaflavinas e as tearrubiginas, sendo uma das classes de flavonoides mais abundante na natureza e podendo ser obtida em folhas, chás, chocolates e no vinho. As catequinas são substâncias compostas de vários grupos fenólicos responsáveis por reduzir a formação de produtos oriundos de processos como o de oxidação, inflamação e glicação no nosso organismo, desse modo a presença de taninos gálicos formados por polímeros de flavanóis na *Maytenus ilicifolia* pertencentes a classe das catequinas, podem atribuir um potencial antiglicante e antioxidante a planta. (KAHN & MUKHTAR, 2018; ISEMURA, 2019).

**Figura 2 - Estrutura química da catequina, epicatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina e galato de epigalocatequina, respectivamente.**



**Fonte:** ISEMURA, 2019.

Devido a composição e estrutura das substâncias encontradas na *Maytenus ilicifolia* é atribuída a esta propriedades como anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngica, antioxidantes entre outras, capazes de evitar reações no organismo desequilibradas por fatores genéticos ou adquiridos como no caso de processos neoplásicos. Dentre esses compostos destaca-se os fenólicos e os nitrogenados responsáveis pela redução e cura de processos

inflamatórios, oxidantes, neoplásticos, microbianos, entre outros. (ALONSO, 1998; CARLINI & FROCHTENGARTEN, 1988; MENDES et al., 2006).

A função gastroprotetora da *Maytenus ilicifolia* está associada aos taninos gálicos (PEREIRA et al., 1993; MING et al., 1998), desse modo podemos afirmar que a *Maytenus ilicifolia* tem capacidade anti-inflamatória, por isso age na cura da gastrite e úlceras (doenças associadas a inflamação das paredes do estômago).

Além disso, os compostos triterpenóides estão associadas a atividade citóxica frente células tumorais apresentando atividade antineoplástica (SANTANA et al., 1971; VECHIA, et al., 2009; SILVA et al., 2018). A neoplastia está associada a formação de tumores e cânceres, os casos de tumores malignos têm sido tratados principalmente por complexos presentes em quimioterápicos apresentando diversos efeitos colaterais e algumas complicações, com estudos a respeito da atividade antineoplástica da *Maytenus ilicifolia* alternativas no tratamento do câncer com menos efeitos colaterais podem ser desenvolvidos e ser material de estudo dos cientistas no futuro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Por fim, LIMA et al. (1969) em estudos observou a capacidade antimicrobiana do extrato das folhas da *Maytenus ilicifolia*, constatando sua atividade frente patógenos como a *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus sp.* (LIMA et al., 1969).

Assim, o presente trabalho busca identificar o potencial da *Maytenus ilicifolia*, em diferentes metodologias, para reduzir o processo de glicação e oxidação, baseado nas substâncias presentes na planta que servem como antioxidantes e aniglicantes em estudos dos processos citados.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 O estresse oxidativo, nitrosativo e carbonílico**

#### **2.1.1 A natureza das espécies reativas: fontes exógenas e endógenas**

A geração de espécies reativas está associada a processos que ocorrem naturalmente no organismo. Estes mecanismos ocorrem normalmente nas células, especificamente na mitocôndria, membranas celulares e citoplasma. A mitocôndria é a principal geradora de espécies reativas, por meio do transporte de elétrons. A mitocôndria metaboliza cerca de 85% a 90% do oxigênio através de processos aeróbicos, enquanto a porcentagem de oxigênio

remanescente desse processo é utilizada por enzimas oxidases e oxigenases, em processos de oxidação na célula. (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004; HYBERSON et al., 2011)

As espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e carbono desempenham um importante papel biológico no fornecimento de energia, em processos de desintoxicação, como sinalizadores químicos e no auxílio do sistema imunológico. A produção dessas espécies, contudo, ocorre em duplo sentido fisiológico podendo também ser nociva ao organismo. Essa dualidade recebe o nome de "*Janus faced*" e depende da concentração entre essas espécies e a formação dos antioxidantes (ALI et al., 2008; WANG, 2016). As espécies reativas causam morte celular através do estresse oxidativo, consistindo no desequilíbrio entre espécies oxidativas e substâncias antioxidantes, gerando danos a macromoléculas biológicas (SIES, 2015).

As espécies reativas são formadas no organismo através de diferentes mecanismos de reação e fontes distintas, além de serem formadas por reações enzimáticas ou não enzimáticas, as espécies reativas podem ter sua origem por meio da ação de citocinas, estímulos e fontes exógenas. São formados principalmente espécies reativas oxigenadas (EROs), espécies reativas nitrogenadas (ERNs) e espécies reativas de cloro e mistas, além dos produtos obtidos por meio da reação de Maillard formando as espécies carbonílicas reativas (ECRs) (COTINGUIBA et al., 2013; MARTELLI, NUNES, 2014).

As fontes endógenas de espécies reativas incluem os peroxissomos e as células inflamatórias. Os peroxissomos são organelas celulares que desempenham um papel importante no estresse oxidativo. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é um composto oxidante causador de danos às células sendo responsável pela geração de espécies reativas, além disso nos processos inflamatórios são produzidas espécies reativas como resposta biológica a inflamação através de um processo autoimune do organismo aumentando a concentração de espécies reativas e aumentando o desequilíbrio redox no organismo. Essas espécies reativas podem danificar as células e tecidos saudáveis, levando a uma série de doenças crônicas (IGHODARO & AKINLOYE, 2018).

Desse modo, nosso organismo de forma natural gera agentes antioxidantes capazes de evitar a alta concentração de espécies reativas e os danos causados pelo estresse oxidativo e carbonílico, O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e reduzir os danos causados pela ação deletéria das espécies reativas. Esse sistema é dividido em enzimático e não-enzimático. O primeiro é composto por superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. O segundo é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética (WANG, 2016).

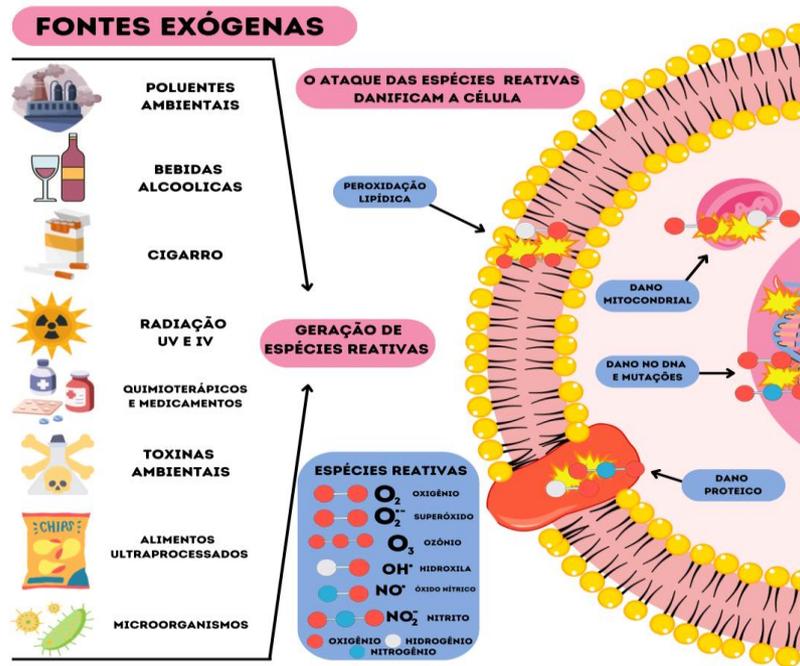
O nível de espécies reativas e agentes antioxidantes devem ser mantidos em equilíbrio dentro do organismo em um processo chamado de homeostase para que seja mantida constantes as condições necessárias para a vida. Os mecanismos homeostáticos garantem que os efeitos causadores das espécies reativas e agentes oxidantes sejam mínimos ao organismo evitando que funções biológicas sejam prejudicadas, que ocorra disfunção no sistema imunológico, defeitos na vasodilatação e a geração de doenças autoimunes\_(WANG, 2016).

Contudo, fontes exógenas são responsáveis em aumentar os níveis de espécies reativas no organismo, a Figura 3 representa as principais fontes exógenas geradoras de espécies reativas e os danos causados nas células ocasionando a morte celular. As fontes exógenas incluem poluentes ambientais de modo que a exposição a esses poluentes como a fumaça do cigarro e a poluição do ar podem levar à geração de radicais livres e espécies reativas não radicalares (SANTOS, 2013; SILVA, FERRARI, 2011; VASCONCELOS et al., 2014).

Alguns medicamentos como o paracetamol e a quimioterapia, podem gerar espécies reativas como subproduto do seu metabolismo. Alimentos ultra processados, como fast food, refrigerantes e doces, contêm altas quantidades de açúcar, gordura e aditivos químicos que aumentam a concentração de glicose e o metabolismo mitocondrial aumentando a concentração de espécies reativas. Toxinas ambientais, como mercúrio, chumbo e outros metais pesados, além da exposição à radiação ionizante, como a radiação UV e IV, são também fontes para geração de espécies reativas em grande quantidade e o desequilíbrio redox no organismo (SANTOS, 2013; SILVA, FERRARI, 2011; VASCONCELOS et al., 2014).

As espécies reativas atacam as células causando danos celulares na membrana plasmática por meio da peroxidação lipídica atacando os lipídeos formadores da membrana plasmática além de causar danos em proteínas, mitocôndrias e outras organelas e causar danos e mutações no DNA celular ocasionado processos neoplásticos e inflamatórios (Figura 3) (SANTOS, 2013; SILVA, FERRARI, 2011; VASCONCELOS et al., 2014).

**Figura 3 - Representação esquemática das principais fontes exógenas das espécies reativas, das principais EROs e ECRs e o ataque dessas espécies a uma célula saudável.**



Fonte: AUTOR, 2024.

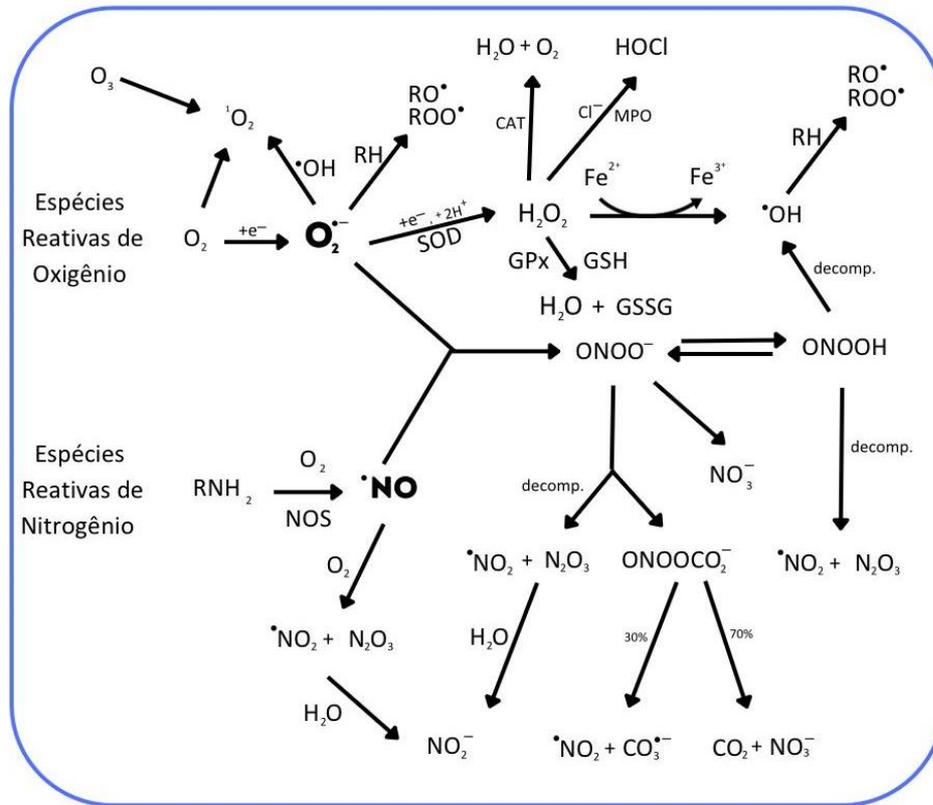
### 2.1.2 Formação e características das espécies reativas

As espécies reativas podem ser radicalares e não radicalares. A forma radicalar é definida como uma espécie atômica ou molecular que contém um ou mais elétrons não emparelhados em um dos seus orbitais moleculares. Dentre as formas radicalares incluem-se:  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ ,  $ROO^{\cdot}$ ,  $RO^{\cdot}$ ,  $\cdot NO$  e  $\cdot NO_2$ , enquanto as não radicalares são  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ ,  $HOCl$ ,  $ONOO^-$ ,  $N_2O_3$ ,  $HNO_2$ ,  $NO_2^-$  e  $NO_3^-$  (BARREIROS et al., 2006; LUSHCHAK, 2014).

Dentre as EROs, podem ser destacados o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), além dos radicais peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ) e alcoxila ( $RO^{\cdot}$ ).

Dentre as ERNs, destacam-se o monóxido de nitrogênio, mais conhecido como óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), entretanto há também muitas outras ERNs advindas de rearranjo ou decomposição dessas, como trióxido de dinitrogênio ( $N_2O_3$ ), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), dióxido de nitrogênio e ânion nitrito ( $\cdot NO_2$ ,  $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ). Além das EROs e ERNs, são relevantes fisiologicamente, ECRs (ex. glicoxal, metilglicoxal e outras), espécies reativas de carbono, enxofre, halogenadas, mistas e outras. A Figura 4 resume os processos de formação dos EROs e ERNs (BARREIROS et al., 2006; LUSHCHAK, 2014).

**Figura 4 - Formação das principais EROs e ERNs provenientes da conversão biológica do oxigênio formando os radicais ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) como provedores das demais espécies reativas.**



Legenda: CAT = catalase, GPx = glutatona peroxidase, GSH = glutatona reduzida, GSSG = glutatona oxidada, MPO = mieloperoxidase, NOS = óxido nítrico sintase,  $R-NH_2$  = grupo amina de aminoácidos,  $RH$  = grupo carboxila de ácido graxo ou cadeias lipídicas,  $RO\cdot$  = radical alcoxila,  $ROO\cdot$  = radical peroxila, SOD = superóxido dismutase.

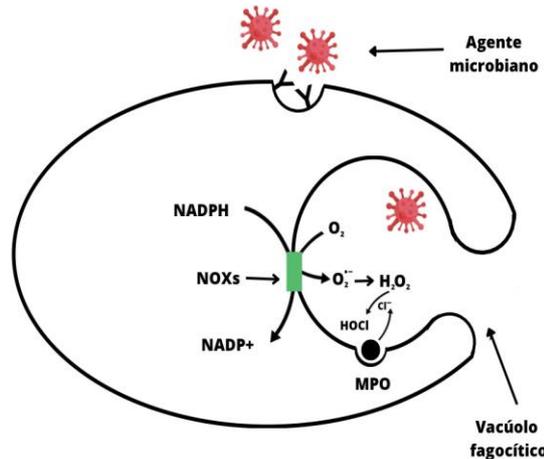
Fonte: Adaptado de CAMATARI, 2017.

A espécie reativa de oxigênio responsável em desencadear a formação das demais EROs, o  $O_2^{\cdot-}$  é gerado por processos que ocorrem na membrana plasmática por ação dos NOXs (NADPH oxidase) no processo de fagocitose de agentes microbianos, como também através da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias (CTe-) (WANG, 2016; JAKUBCZYK et al., 2020).

O nosso sistema imunológico durante o processo de defesa através de monócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, fagocita agentes microbianos com o objetivo de degradar e eliminar tais agentes do organismo. Durante esse processo é formado o vacúolo fagocítico em que os micro-organismos invasores são englobados pelas células de defesa na membrana plasmática. A formação de  $O_2^{\cdot-}$  tem o intuito de desencadear o processo de degradação dos agentes microbianos invasores conforme demonstrado na Figura 5. Além da

geração de  $O_2^{\cdot-}$  é possível obter HOCl e  $H_2O_2$  decorrentes da geração do  $O_2^{\cdot-}$  (KALYANARAMAN, 2013).

**Figura 5 – Representação do processo de fagocitose onde ocorre a formação de  $O_2^{\cdot-}$ , HOCl e  $H_2O_2$  por ativação das NOXs na membrana celular.**



**Fonte:** Adaptado de KALYANARAMAN, 2013.

Apesar da obtenção de  $O_2^{\cdot-}$  pelo processo de fagocitose, a principal fonte de obtenção de  $O_2^{\cdot-}$  consiste na cadeia transportadora de elétrons através do processo metabólico na mitocôndria. Esse processo ocorre em etapas através de complexos em que tal transferência de elétrons consiste na formação de um gradiente de prótons ( $H^+$ ) que são utilizados para conversão de ADP (adenosina difosfato) em ATP (adenosina trifosfato) no processo de respiração celular (LI et al., 2016).

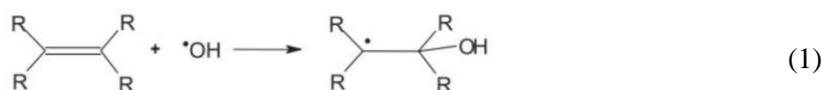
O  $O_2^{\cdot-}$  é uma espécie altamente reativa de modo a causar sérios danos a biomoléculas, além de sofrer rapidamente desmutação espontânea ou ser catalisada em diferentes sistemas dentro do organismo. Desse modo é convertida rapidamente em  $H_2O_2$  em sistemas enzimáticos localizados em partes diversas no corpo (BARREIROS et al., 2006; GOMES et al., 2007; KALYANARAMAN, 2013; NELSON; COX, 2011; YU; BENNETT, 2014).

Como demonstrado na figura 4, o  $H_2O_2$  através da catalase (CAT) ou ainda por meio da Glutathiona peroxidase (GPx) pode ser reduzida em água ( $H_2O$ ). Contudo, devido à baixa eficiência dessa redução por meio das enzimas, grandes quantidades de  $H_2O_2$  acabam indo para as células danificando-as (BARREIROS et al., 2006). O  $H_2O_2$  apresenta baixa reatividade em relação a outras espécies reativas presentes no organismo, mas ainda assim tem capacidade de transpor membranas celulares e reagir com tióis, iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas por meio de reações com proteínas heme e peroxidases e reagir com sais de ferro e cobre reduzidos. Além disso, pode interagir com íons de metais de transição, formando  $HO\cdot$ , principalmente com  $Fe^{2+}$  pela reação de Fenton (BARREIROS et al., 2006;

FREITAS et al., 2009; GOMES et al., 2007; KALYANARAMAN, 2013; NOGUEIRA et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007; JAKUBCZYK et al., 2020).

O HO• é uma espécie altamente oxidante, participando ativamente do processo de fagocitose na eliminação de agentes estranhos no organismo. O fato de o corpo não conseguir defender-se dessa espécie agrava ainda mais seu potencial degenerativo, causando danos severos a moléculas. Além disso, reage de forma não seletiva com compostos químicos circundantes, aumentando assim a formação de produtos indesejáveis. (GLIGOROVSKI et al., 2015)

Modificações nas estruturas moleculares também são observadas na presença de HO•, como a alteração das bases e quebra das fitas que formam o DNA. Tendo consequências genotóxicas, inativação de enzimas e danos às estruturas de proteínas. A reatividade do HO• ocorre por adição radicalar em duplas ligações de ácidos graxos poli-insaturados, formando radicais orgânicos conforme mostrado na equação 1. (NOGUEIRA et al., 2007)



**Fonte:** NOGUEIRA et al., 2007.

A enzima MPO (mieloperoxidase) catalisa a reação de íons cloreto com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formando à espécie reativa HOCl (ácido hipocloroso) conforme mostra a Figura 4. A enzima MPO é encontrada em leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos, basófilos e eosinófilos. (GOMES et al., 2007). O HOCl é cerca de 100 a 1000 vezes mais tóxico do que O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo o mais importante agente bactericida com capacidade de oxidar proteínas, DNA e lipídeos. As proteínas são o principal alvo do HOCl devido sua alta reatividade com essas moléculas, além dos ataques biológicos o HOCl reage com outras espécies reativas conforme mostrado na Tabela 1 (HAWKINS et al., 2003).

**Tabela 1 - Reatividade do HOCl com espécies oxigenadas e nitrogenadas.**

Espécie	Reagente	Espécie formada	Reação
HOCl	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	HO•	HOCl + O <sub>2</sub> <sup>-</sup> → HO• + O <sub>2</sub> + Cl <sup>-</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	HOCl + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → <sup>1</sup> O <sub>2</sub> + Cl <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O
	•NO	Cl•	HOCl + •NO → HNO <sub>2</sub> + Cl•
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HOCl + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + Cl <sup>-</sup> + H <sup>+</sup>

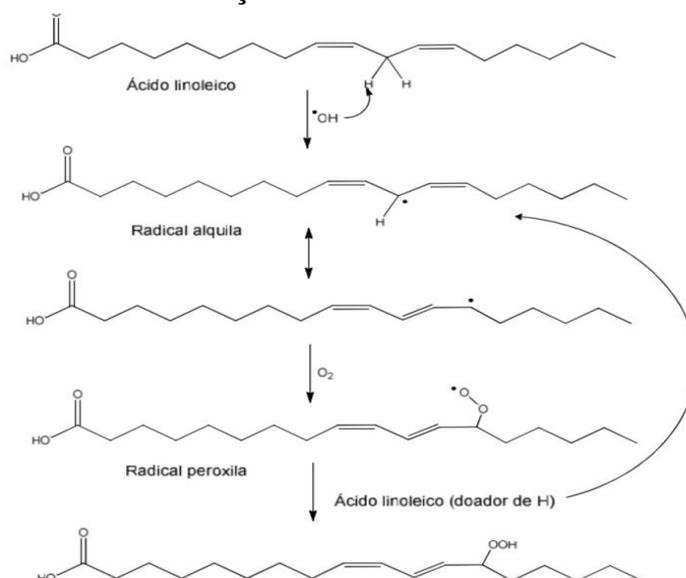
**Fonte:** Adaptado de PANASENKO et al., 2013.

O estresse clorativo que ocorre no cérebro está diretamente associado a reações envolvendo o HOCl causando desordens neurodegenerativas. O HOCl clora porções amina e catecol da dopamina produzindo derivados de clorados. Estes por sua vez são chamados de clorodopamina sendo tóxicos aos neurônios, gerando toxinas que matam os neurônios dopaminérgicos, associados diretamente à doença de Parkinson (JEITNER et al., 2016; KALOGIANNIS et al., 2016).

Para formar a espécie  $^1\text{O}_2$  (oxigênio singlete) de forma natural no organismo, ocorrem reações entre o radical ânion superóxido e o radical hidroxila (Figura 4). Além de reações com o ozônio ou durante a peroxidação lipídica. (GOMES et al., 2007). O  $^1\text{O}_2$  é altamente reativo, superando mais de 1500 vezes o  $\text{O}_2$  formando hidroperóxidos lipídicos iniciando a peroxidação lipídica (PANASENKO et al., 2013).

Por fim, as espécies reativas formadas por cadeias carbônicas ( $\text{ROO}\cdot$  e  $\text{RO}\cdot$ ) são provenientes do processo da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é um processo em que as ligações duplas carbono-carbono de lipídeos passam por deterioração oxidativa como por exemplo em ácidos graxos insaturados, fosfolipídios, glicolipídeos e o colesterol. Reações em cadeia de peroxidação radical ocorrem com o ataque de EROs a ácidos graxos insaturados em ligações duplas e grupos metileno como o exemplo da reação entre ácido linoleico iniciada com o radical  $\text{HO}\cdot$  conforme representado na Figura 8 (LÜ et al., 2010).

**Figura 6 - Mecanismo da reação do ácido linoleico iniciada com o radical  $\text{HO}\cdot$**



**Fonte:** LÜ et al., 2010.

Além do desequilíbrio redox estar associado ao aumento e a ação das EROs, as ERNs, causam perturbações na biossíntese e no metabolismo sendo causas principais das consequências do desequilíbrio redox. A formação das ERNs está associada a uma série de

reações indicadas pela espécie  $\bullet\text{NO}$ . Diferentes tipos de células são responsáveis pela formação do  $\bullet\text{NO}$  incluindo células endoteliais e macrófagos através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e a partir de L-arginina, oxigênio e NADPH, tendo como produtos  $\text{NADP}^+$ , L-citrulina e  $\bullet\text{NO}$  (Figura 4) (BARREIROS et al., 2006; NELSON et al., 2011; NIJVELDT et al., 2001; OLMOS et al., 2007; ZAGO et al., 2006).

O óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) desempenha um papel crucial em diversos processos biológicos, incluindo relaxamento muscular, neurotransmissão e regulação imune. Inicialmente reconhecido como um potente vasodilatador envolvido na regulação da pressão arterial, o  $\bullet\text{NO}$  é um radical que, surpreendentemente, não é tão reativo quanto se poderia pensar. No entanto, ele se difunde nas células sem sofrer alterações e reage rapidamente com moléculas circundantes, especialmente aquelas que possuem elétrons desemparelhados, como o  $\text{O}_2$ . (FREITAS et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2007; OLMOS et al., 2007).

A partir dessa reação, surge o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), uma espécie altamente citotóxica e mutagênica. O  $\text{ONOO}^-$  tem reatividade semelhante à do  $\text{HO}\bullet$  e pode danificar biomoléculas, incluindo grupos sulfidrila (S-H) das proteínas, além de causar hidroxilação e nitração de compostos aromáticos (BARREIROS et al., 2006; FREITAS et al., 2009). Apesar de sua vida curta (10-20 ms), o  $\text{ONOO}^-$  causa danos significativos a várias moléculas biológicas.

O  $\text{ONOO}^-$  também é capaz de formar o  $\text{HO}\bullet$  independentemente da presença de metais de transição (Figura 4) (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2007). Além disso, após protonação, o  $\text{ONOO}^-$  rearranja-se para formar íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e interage com bicarbonato, gerando o peroxicarboxilato nitroso ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ). A decomposição do  $\text{ONOO}^-$  resulta na formação de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), sendo que cerca de 70% dos produtos são  $\text{CO}_2$  e  $\text{NO}_3^-$ , enquanto os outros 30% incluem o radical nitrito ( $\bullet\text{NO}_2$ ) e o ânion radical carbonato ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ) (FREITAS et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2007). Além disso, há a formação de íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), principalmente a partir do  $\bullet\text{NO}$ . O  $\bullet\text{NO}$  reage com  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , resultando na formação de  $\text{NO}_3^-$ . Esse íon nitrato é considerado um metabólito estável final da decomposição do  $\text{ONOO}^-$  (Figura 4).

Além do estresse nitro-oxidativo causado pelas ERONs destaca-se também o Estresse Carbonílico (EC) causado pelo desequilíbrio das espécies carbonílicas reativas (ECRs). A geração das ECRs ocorre a partir da reação de glicação e lipoperoxidação, sendo espécies intermediárias dos produtos de glicação avançada (AGEs, do inglês, *Advanced Glycation*

*Endproducts*) e de lipoxidação avançada (ALEs, do inglês *Advanced Lipoxidation Endproducts*) (BARBOSA et al., 2016).

As ECRs possuem grupamentos carbonílicos eletrofílicos capazes de “atacar” regiões nucleofílicas de biomoléculas modificando conformações de proteínas, do RNA e do DNA, levando juntamente com o estresse oxidativo e nitrosativo a disfunções celulares e teciduais ocasionando de forma natural o envelhecimento e, quando em desequilíbrio, inúmeras patologias (LOPACHIN & GAVIN, 2014). O estresse carbonílico ocorre com o desequilíbrio entre a formação e a destoxificação enzimática das ECRs, além da exposição a agentes exógenos provenientes de uma dieta baseada em ultraprocessados, a poluição ambiental e a química farmacêutica (medicamentos e cosméticos) (RABBANI et al., 2016).

Algumas substâncias antioxidantes capazes de reduzir o estresse oxidativo podem ser também capazes de inibir a formação de ECRs por meio de algumas vias não-enzimáticas. Desse modo, existe importante relação direta entre o estresse oxidativo e o estresse carbonílico. Um exemplo dessa relação é o uso de antioxidantes utilizados para a prevenção da formação de ECRs como a acroleína, o malondialdeído, o GO e o 4-hidroxi-2-nonenal a partir da peroxidação de lipídeos induzida por EROs (ERGIN, 2013). Além disso, as ECRs são os principais intermediários no processo de formação dos AGEs e ALEs.

## **2.2 A geração dos Produtos de glicação avançada – AGEs**

### **2.2.1 A história e definição de glicação**

O processo de formação dos AGEs é obtido por meio de uma reação denominada glicação não enzimática e foi postulada pela primeira vez pelo bioquímico francês Louis Camille Maillard (1878-1936), em 1912 e por este motivo é denominada também como reação de Maillard.

Maillard descobriu o processo de glicação não enzimática ao realizar a mistura de glicina com glicose e aquecer a solução obtendo uma coloração final marrom intensa. Além disso, Maillard observou o mesmo processo ao misturar outros compostos além da glicina e glicose, estendendo a quantidade de substâncias e compostos que passam pela reação de glicação como aminoácidos, peptídeos e açúcares estes com temperaturas diferentes da submetida no experimento inicial. Desse modo, Maillard contribuiu para a compreensão do processo de escurecimento dos alimentos durante o processamento térmico e a estocagem em armazéns (ARAGNO & MASTROCOLA, 2017; YEH et al., 2017; HELLWING & HENLE 2014).

A reação de glicação se trata de uma reação em etapas e devido a sua complexidade leva vários dias e até mesmo semanas para obtenção final de seus produtos. As etapas da glicação envolve a formação de compostos variados que conferem aroma, sabor e coloração característico dos alimentos e por consequência leva a formação dos AGEs (YEH et al., 2017). A reação de glicação tem consequências negativas a saúde devido a perda de aminoácidos essenciais e a progressão de doenças relacionadas ao envelhecimento da pele.

Em 1955, Kunkel e Wallenius descobriram que era possível observar a glicação de proteínas em sistemas biológicos. A comprovação se deu pela glicação da hemoglobina formando uma variante que contém um aduto de glicação denominada hemoglobina glicosilada ou HbA1C. A HbA1C é usada atualmente para avaliar a concentração média de glicose sérica nos últimos 3 a 4 meses em pacientes diabéticos ou com suspeita de diabetes (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017-2018).

Devido a tal descoberta, a reação de Millard tem sido cada vez mais investigada e analisada de modo que nos últimos 30 anos houve um aumento e um foco crescente em descobrir o papel dessas reações na patogênese de doenças *in vivo*, bem como em suas implicações e características específicas. Além disso, há comprovações de que as reações de glicação estão associadas ao estresse oxidativo, a geração de espécies reativas e a inflamação, processos que tem papel significativo em distúrbios crônicos como a diabetes, a aterosclerose e a doença de Alzheimer. Assim, fica evidente que mesmo após mais de um século de sua descoberta a reação de Maillard permanece sendo relevante a estudos relacionados ao desenvolvimento de doenças crônicas e a saúde (HENNING & GLOMB, 2016; URIBARRI et al., 2015).

### 2.2.2 As etapas da reação de Maillard e a formação dos AGEs

Apesar de ser complexa podemos resumir a reação de Maillard como sendo a reação entre um grupo  $\alpha$ -carbonílico de um açúcar redutor ou lipídeo oxidado pelo ataque nucleofílico de um grupo amina de uma proteína (aminoácido) formando uma base de Schiff altamente instável que por sua vez sofre rearranjo formando os chamados produtos de Amadori que possui uma estabilidade bem maior (URIBARRI et al., 2015).

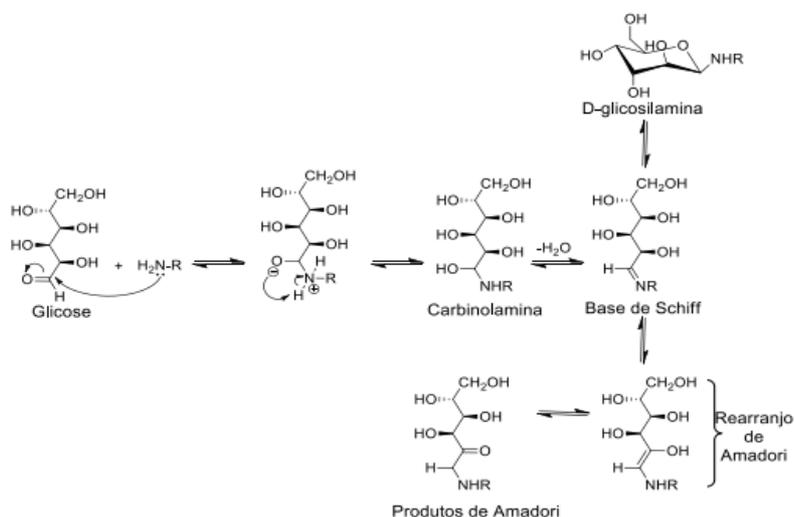
A interação amino-carbônica é o processo inicial da reação de Maillard que devido a sua complexidade em 1953 foi dividida por Hodge em 3 estágios (Inicial, Intermediário e final) sendo a formação do grupo amino-carbônica a etapa inicial da reação e conhecida

como glicação não-enzimática, sendo os resíduos de aminoácidos e proteínas os sítios principais da reação (HODGE, 1953).

Após o rearranjo da base de Schiff e a formação dos produtos de Amadori é observada a ocorrência de várias reações de oxidação e desidratação gerando compostos dicarbonílicos reativos como o Metilglioxal e o glioxal. Os compostos dicarbonílicos possuem reatividade muito superior aos açúcares redutores podendo atacar grupos amino em proteínas levando a formação dos AGEs (Figura 7) (BARBOSA et al., 2016). Além disso durante a progressão reacional são formados diversos intermediários de composição e tamanhos diferentes favorecendo a formação dos AGEs.

A figura 7 mostra o estágio inicial da reação de Maillard consistindo no ataque nucleofílico de um grupo amina de uma proteína a um grupo carbonila (eletrófilo) de um açúcar redutor, formando uma carbinolamina intermediária. Posteriormente a carbinolamina pode sofrer desidratação dando origem a uma imina, também conhecida como base de Schiff, esta por ser instável pode formar uma cadeia cíclica gerando D-glicosilamina, que pode também, em temperatura ambiente e pH fisiológico, sofrer espontaneamente o rearranjo de Amadori formando compostos com maior estabilidade (VISTOLI et al., 2013).

**Figura 7 - Estágio inicial da reação de Maillard**

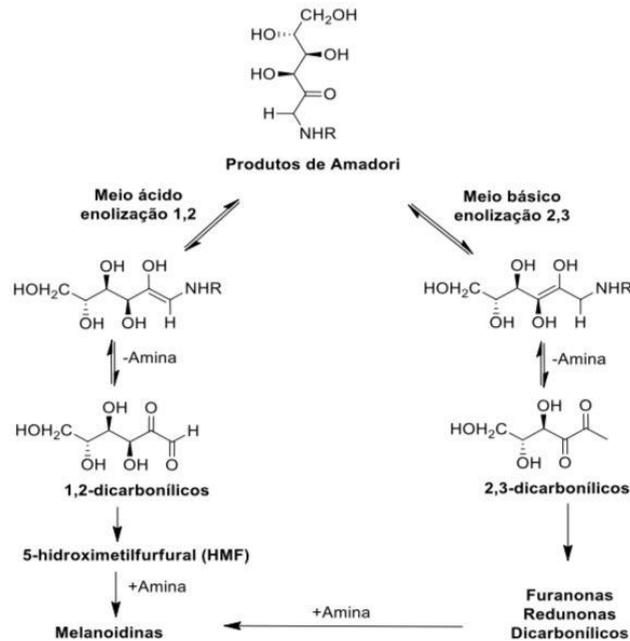


**Fonte:** XAVIER, 2018.

Durante o estágio intermediário da glicação os produtos de amadori formados podem reagir por dois caminhos reacionais que dependem do pH do meio reacional. No primeiro caminho a reação ocorre em pH baixo sofrendo enolização e formando 1,2-dicarbonílicos que por desidratação formam derivados de furfural. No segundo caminho reacional em pH mais elevado a reação de enolização forma 2,3-dicarbonílicos que por desidratação forma redutonas conforme representado na Figura 8. Os derivados de furfural e as redutonas por sua

vez, podem sofrer ciclização tendo como possíveis produtos as furanonas e as piranonas que incluem importantes compostos flavorizantes de alimentos. (BARBOSA et. al., 2016).

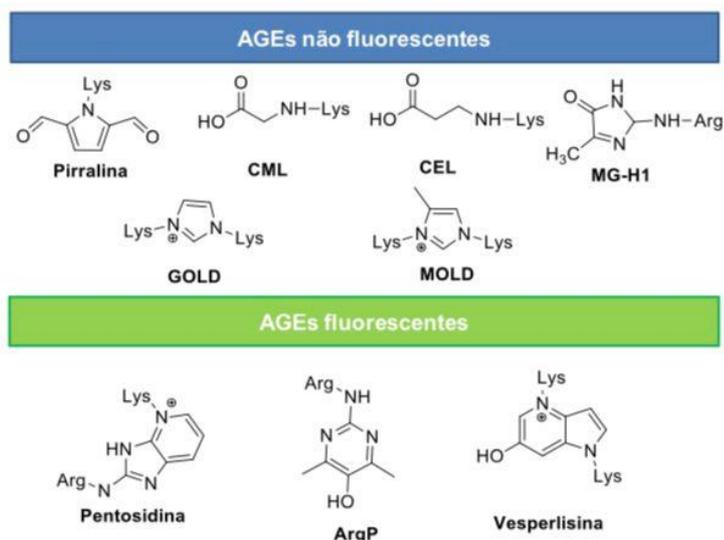
**Figura 8 - Estágio Intermediário da Reação de Maillard.**



**Fonte:** XAVIER, 2018.

Por fim, em sua última etapa reacional são formados os AGEs por meio da reação dos dicarbonílicos com resíduos de proteínas de arginina e lisina formando adutos. Os AGEs são classificados em três grupos e possuem estabilidade térmica. O primeiro é composto por AGEs de reticulação fluorescente como vesperlisina e pentosidina, enquanto o segundo grupo inclui os de reticulação não-fluorescente como reticulantes de metilglíxal e hidroimidazolona (MG-H1) e o terceiro grupo são os não-fluorescentes não reticulantes como o carboxietil lisina (CEL) e carboximetil-lisina (CML) de modo que são demonstradas suas estruturas na Figura 9. Os AGEs são produtos irreversíveis com exceção da pirralina e da pentosidina (YEH et al., 2017).

**Figura 9 - Estrutura dos principais produtos de glicação avançada (AGEs).**



Legenda: CML = carboximetil-lisina, CEL = carboxietil lisina, MG-H1 = metilglixal hidroimidazolona isômero 1, ArgP = argpirimidina, GOLD = dímero de glioxal lisina, MOLD = dímero de meilglioxal lisina.

Fonte: XAVIER, 2018.

### 2.2.2 A glicação e sua relação com as espécies carbonílicas reativas (ECRs)

A formação dos AGEs ocorre também por outras reações como a oxidação de lipídeos, açúcares e aminoácidos formando as ERCs que por sua vez fazem ligações covalentes com proteínas. As ERCs assim como as demais espécies reativas estão diretamente associadas ao estresse oxidativo e o desequilíbrio redox fazendo assim com que a reação de glicação esteja diretamente associada a geração de espécies reativas e contribuindo para o estresse oxidativo no organismo. Investigar as ECRs e os AGEs nos fornece informações quanto aos compostos que podem ocasionar a progressão de doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo.

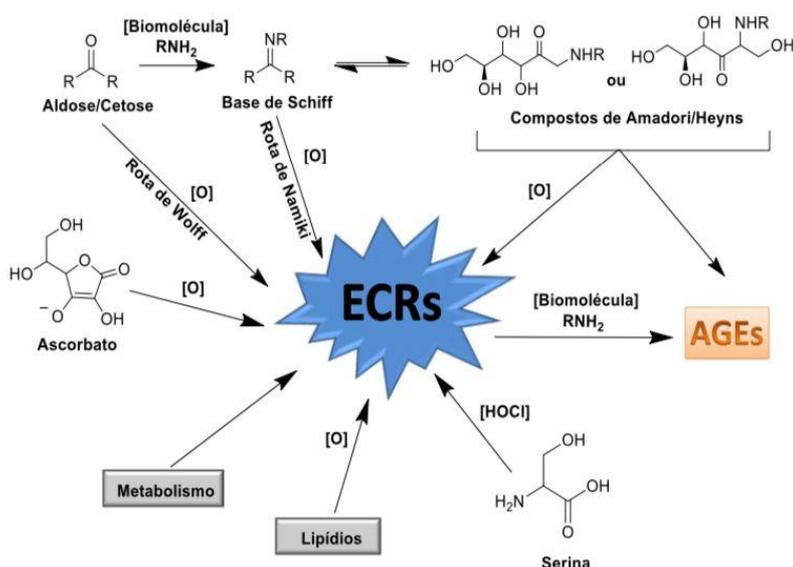
Entre as espécies reativas carbonílicas, destaca-se as  $\alpha$ -dicarbonílicas que são altamente reativas por possuírem carbono mais elerofílico devido ao efeito eletroretirador das carbonilas vizinhas, tendo papel crucial na propagação da reação de glicação. Os  $\alpha$ -dicarbonílicos reagem por meio da reação de Strecker com aminoácidos para formar aldeídos de cadeia curta e gerar gás carbônico durante a reação, aumentando a variedade de composos que conferem aroma aos alimentos quando aquecidos. A reação de Strecker consiste na síntese de aldeídos a partir da reação de  $\alpha$ -dicarbonílicos com aminoácidos, podendo ainda gerar pirazinas. As ERCs podem reagir ainda com biomoléculas para progressão da glicação e a formação dos AGEs (SEMCHYSHYN & LUSHCHARK, 2012).

A formação das ECRs pode ocorrer por duas rotas reacionais além da reação de Maillard. A rota de Namiki ocorre a partir da formação de  $\alpha$ -dicarbonílicos como o metilgloxal e o glixal através da quebra oxidativa da base de Schiff gerando  $\alpha$ -oxaldeídos, enquanto a rota de Wolff consiste na degradação oxidativa lenta (auto-oxidação) de monossacarídeos levando também a formação de  $\alpha$ -oxaldeídos e o peróxido de hidrogênio. Além disso, ERCs podem ser formadas a partir da oxidação de lipídeos e da caramelização de carboidratos submetidos a altas temperaturas (NAMIKI et al., 1983; WOLFF et al., 1984)

Devido as diferentes formas e caminhos reacionais para serem obtidas as ERCs, representadas na Figura 10, é possível formar compostos altamente reativos incluindo muitos compostos biológicos com um ou mais grupos carbonílicos geradas *in vivo* como resultado do metabolismo ou derivados de fontes exógenas. Os ERCs são intermediários reativos do processo de glicação, que gera ainda os AGEs, dentre os ERCs os  $\alpha$ -dicarbonílicos ( $\alpha$ -DC) são os intermediários centrais mais importantes a serem estudados e avaliados, contudo sua análise para obtenção de sua completa identificação enfrenta grandes dificuldades, sua alta reatividade dificulta a avaliação analítica dos compostos necessitando da sua derivatização em compostos mais estáveis para sua captura (HODGE, 1953).

É possível obter compostos mais estáveis utilizando a derivatização de  $\alpha$ -DC com o-fenilenodiamina (OPD) para produzir as suas correspondentes quinoxalinas sendo este o procedimento mais utilizado. Além disso, as análises *in vitro* das amostras necessitam de um rigoroso controle e manipulação com o mínimo de etapas possíveis evitando influências nos resultados esperados (HODGE, 1953).

**Figura 10 - Diferentes rotas de formação das Espécies Carbonílicas Reativas (ECRs).**



As ECRs possuem severos danos ao organismo quando em excesso contribuindo para o envelhecimento e suas doenças relacionadas como também com distúrbios metabólicos. Entretanto, podem trazer benefícios ao organismo quando em equilíbrio como por exemplo regular a transdução de sinal celular e expressão gênica e sua implicação na resposta autoimune (SEMCHYSHYN & LUSHCHARK, 2012).

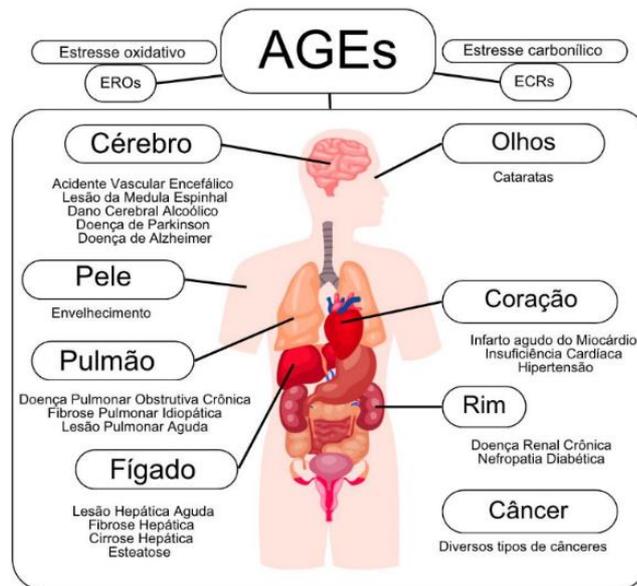
As ECRs são geradas no organismo por via metabólica, reação de glicação e a peroxidação lipídica, contudo fontes exógenas interferem na produção desenfreada de ECRs no organismo favorecendo a formação dos AGEs e a progressão de doenças degenerativas. Poluição, constituintes naturais de alimentos, reação de Maillard e aditivos flavorizantes são exemplos de fontes exógenas na formação dos ECRs.

### 2.2.3 Os AGEs e sua relação com as Doenças degenerativas

A capacidade que os AGEs possuem em modificar as propriedades químicas e as funções biológicas de diversas biomoléculas faz com que sua formação apresente caráter tóxico representando um grupo de compostos potencialmente prejudiciais contribuindo em processos inflamatórios, neoplásticos e a indução do estresse oxidativo/carbonílico no organismo (ABATE et al., 2012). Desse modo, os AGEs possuem capacidade de causar mudanças nas funções biológicas do corpo quando em excesso alojando-se e acumulando-se na matriz extracelular (MEC) de diversos tecidos, sendo responsável e contribuindo para progressão de doenças crônicas como distúrbios neurológicos, distúrbios cardiovasculares, diabetes, artrite e cânceres (BYUN et al., 2017). Na Figura 11 é possível observar as doenças degenerativas associadas aos AGEs e os órgãos que são acometidos.

A geração de radicais livres e a formação de ligações cruzadas estáveis entre proteínas intra e extracelulares que ocasionam alterações nas conformações nativas de biomoléculas comprometendo as suas funções biológicas são os grandes prejuízos fisiológicos causados pelos AGEs, além do fato dos AGEs serem antigênicos, ou seja, induzirem respostas imunes (ANGUIZOLA et al., 2013).

**Figura 11 - Principais doenças degenerativas causadas pelos AGEs no organismo humano.**



**Fonte:** Adaptado de XAVIER, 2024.

A indução ao estresse oxidativo provocado pelos AGEs geram a ativação do RAGE (do inglês *Receptor for Advanced Glycation End-products*), causando assim uma disfunção mitocondrial, sendo esta segundo estudos extensivos um fator responsável pela doença de Alzheimer, aterosclerose, osteoporose, asma, artrite, sarcopenia (BARBOSA et al., 2016; ABATE et al., 2015), doença hepática gordurosa alcoólica (AFLD) (SONG et al., 2014), diabetes e degeneração de condrócitos (BYUN et al., 2017), câncer (GOLBIDI et al., 2011) e complicações diabéticas (GOLBIDI et al., 2011; BARBOSA et al., 2008).

As complicações diabéticas são ampliadas com a presença dos AGEs de modo que eles são os principais mediadores patogênicos de complicações como a retinopatia diabética (deterioração da visão), a nefropatia diabética (declínio da função renal) e a neuropatia diabética (degeneração dos neurônios). Ademais, pessoas diabéticas tendem a ter uma alta concentração de glicose no sangue aumentando a geração dos AGEs e de compostos dicarbonílicos (HELLWING et al., 2014).

#### 2.2.4 O papel dos antioxidantes na redução dos EROs, ERCs e AGEs

De forma natural o organismo inibe a geração dos AGEs seja por meio da RAGE ou ainda pela ação de enzimas catalíticas como as enzimas oxaldeído redutase e aldose redutase, que reagem com os derivados dicarbonílicos, e as glioxilases I e II que podem interromper as

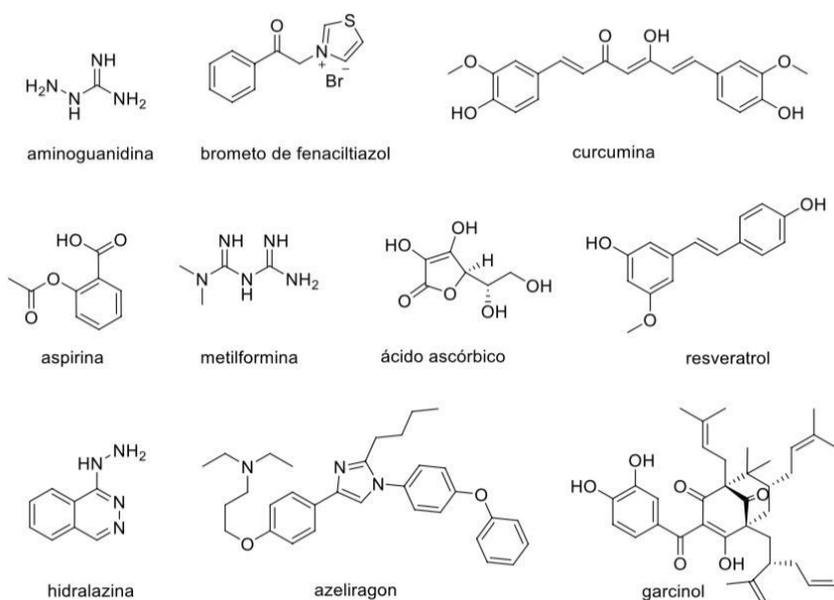
reações de glicação em estágios diferentes. Contudo, devido ao desequilíbrio e a geração exagerada dos AGEs por influência de fatores exógenos, sua inibição não é suficiente assim aumentando sua geração e suas consequências nocivas a biomoléculas. Desse modo, faz-se necessário a descoberta de compostos inibidores dos AGEs evitando seus danos, além disso pacientes diabéticos tem redução das funções inibidoras das enzimas catalíticas ampliando ainda mais as consequências dos AGEs, necessitando de preventivos inibidores dos AGEs (TORRES et al., 2018).

Espécies reativas são formadas e eliminadas constantemente no nosso organismo incluindo as ECRs e ERONs que quando estão em alta concentração ocasionam o desequilíbrio redox em um processo conhecido como estresse carbonílico e estresse nitro-oxidativo respectivamente. Desse modo, assim como os AGEs faz-se necessário antioxidantes capazes de reequilibrar e evitar as consequências danosas das espécies reativas que incluem a obesidade, aterosclerose, diabetes, doenças renais e cardíacas e doenças neurodegenerativas (BARBOSA et al., 2016; AHMAD et al., 2017).

De modo geral, como as ECRs são intermediárias do processo de glicação e da formação dos AGEs, utilizar compostos antioxidantes capazes de reduzir as espécies reativas também é favorecer a redução dos AGEs ao passo que compostos inibidores dos AGEs são ainda mais eficazes sendo estes considerados antiglicantes, ou seja, inibidores do processo de glicação.

Por conseguinte, foram desenvolvidas diversas moléculas capazes de inibir e degradar a formação dos AGEs e impedir a ação das espécies reativas. São destacadas as amadoriases (enzimas que catalisam a degradação dos produtos de Amadori), agentes capazes de coletar grupos amino tais como aspirina, que é um composto capaz de quebrar ligações cruzadas de  $\alpha$ -dicarbonílicos como o brometo de fenaciltiazólio, fármacos utilizados no tratamento de diabetes tipo 2, como por exemplo a metformina e a pioglitazona, capazes de bloquear receptores de angiotensina e inibir a enzima conversora de angiotensina, aminoguanidina e piridoxamina (YEH et al., 2017). A Figura 12 apresenta as estruturas moleculares dos principais compostos antiglicantes.

**Figura 12 - Principais compostos inibidores do processo de glicação e formação dos AGEs.**



**Fonte:** TORRES et al., 2018.

O primeiro agente antiglicante a ser utilizado em testes clínicos em humanos foi a Aminoguanidina, uma hidrazina que é seletiva para dicarbonílicos como o glicoxal (GO) formando triazinas. Porém, seu uso crônico causa efeitos colaterais como maior incidência de glomerulonefrite e a deficiência da vitamina B6, por isso sua dosagem vem sendo testada sendo um grande desafio aos pesquisadores para que seja possível estabelecer dosagens seguras para sua utilização terapêutica em portadores de diabetes (BARBOSA et al., 2008).

A metformina se trata de um fármaco utilizado para o tratamento da diabetes tipo II atuando na redução da glicemia e diminuindo a concentração de MG no sangue através da captura de MGO para formar heterociclos como a imidazolidina, a di-hidroimidazolona e a triazepinona (TORRES et al., 2018). Outro importante agente antiglicante é o ácido acetilsalicílico sendo um medicamento comercial bastante utilizado, conhecido também como aspirina. A aspirina não captura dicarbonílicos e ECRs porém tem capacidade de reagir com o grupo amino livre de biomoléculas, tendo sua ação no processo inicial de glicação inibindo assim a modificação da proteína por um açúcar redutor (KESAVAN et al., 2013).

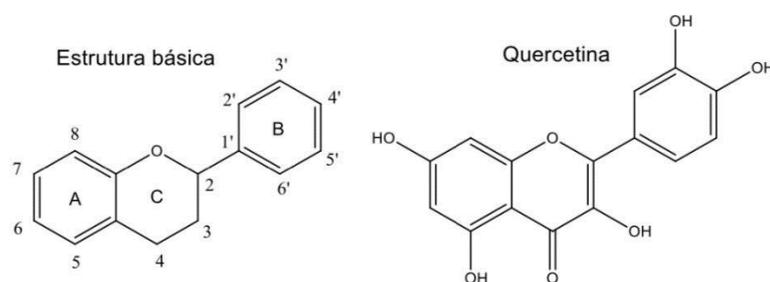
Dentre as substâncias capazes de capturar as EROs e ECRs evitando a degradação celular e aumento do estresse nitro-oxidativo e carbonílico, sendo este último formador dos intermediários para formação dos AGEs, destacam-se os polifenóis que são compostos capazes de realizar atividade quelante de metais e captura de radicais livres. Como o estresse oxidativo acompanha o estresse carbonílico a utilização de antioxidantes é um potencial

inibidor da glicação e formação dos AGEs, ou seja, podem ser antiglicantes. Desse modo a análise do potencial antiglicante de substâncias comprovadamente antioxidantes é de alto interesse. Estudos afirmam a relação direta entre a estrutura molecular de polifenóis na quelação de metais, principalmente os flavonoides (XAVIER, 2018).

Dentre os fenóis, os flavonoides são os maiores grupos existentes e são considerados os compostos fenólicos naturais mais importantes estando presentes principalmente em ervas (folhas e caule), frutas (cascas, polpas e suco), legumes, grãos e bebidas. Os flavonoides possuem baixa massa molar e tem papel crucial nas funções químicas e biológicas do corpo humano e na ecologia das plantas, como a ação antioxidante, proteção contra micro-organismos e inibição enzimática (SAEWAN et al., 2013; STEVANATO et al., 2014; ZILLICH et al., 2015). Diversas propriedades de caráter farmacológico são comprovadamente associadas aos flavonoides incluindo sua capacidade anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, vasodilatadora, citotóxica e antioxidante (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011; SANTOS et al., 2017).

Algumas características dos flavonoides são consensuais quanto a sua potencial capacidade antioxidante, dentre essas características é possível destacar a presença da estrutura de um grupo catecol no anel B, uma ligação dupla na posição 2,3 (anel C) e grupos hidroxilas na posição 3 (anel C) e 5 (anel A) conforme destacado na Figura 13. A quercetina, um tipo de flavonoide, possui a estrutura molecular ideal para ser um antioxidante altamente eficiente tendo seu potencial comprovado pela literatura (YEH et al., 2017).

**Figura 13 - Estrutura química geral de um flavonoide e da molécula da quercetina.**



**Fonte:** XAVIER, 2018.

Flavonoides como a luteolina, rutina e quercetina são comprovadamente eficazes ao reagir com MGO e inibir os AGEs ao quebrar as ligações cruzadas entre os AGEs e as proteínas (WU et al., 2005). A quercetina é um composto pertencente a classe dos flavonóis sendo o mais abundante e principal flavonoide consumido na dieta humana proveniente dos alimentos. Tem por características a presença de açúcares em sua estrutura e o fato de ser

lipossolúvel, consistindo em um dos antioxidantes mais eficazes por conseguir eliminar radicais livres e quelar metais de transição capazes de formar radicais hidroxila pela reação de Fenton, como os íons Fe (II) e Cu (II) (ALVES et al., 2010).

Dentre os grupos de flavonoides são destacadas também as catequinas que consistem em fitonutrientes classificadas como flavanóis, são geralmente encontradas de forma natural em frutas, folhas como o chá verde e preto, vinho tinto e chocolate (cacau) (CORTI et al., 2009; ISEMURA, 2019; MANACH et al., 2004). As catequinas possuem diferentes variações estruturais e entre as mais eficientes quanto seu potencial antioxidante destacam-se a epicatequina, epigalocatequina (ECG), epigalocatequina-3-galato (EGCG), galocatequina-galato (GCG) e as galocatequinas (KAHN & MUKHTAR, 2018; ISEMURA, 2019).

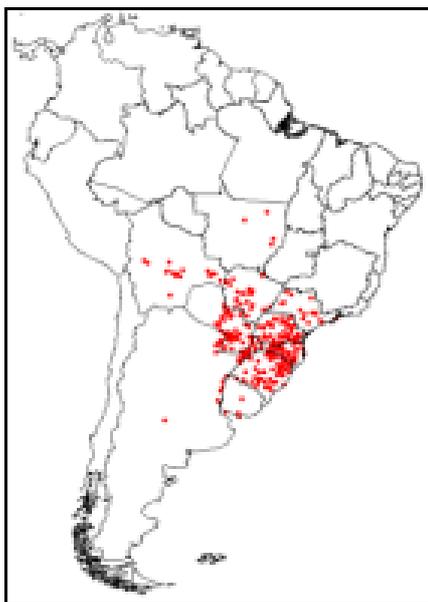
Assim, a busca por substâncias derivadas das catequinas e quercetina tem sido material de estudos científicos para obtenção de potenciais antioxidantes que por conseguinte podem se tornar possíveis antiglicantes por evitar as ECRs, nesse sentido análises *in vitro* e *in vivo* são feitas constantemente identificando e catalogando frutas, folhas, cascas e sementes capazes de inibir a formação de AGEs e capturar espécies reativas sendo possíveis bases para formação de fármacos e utilizadas no tratamento de pacientes diabéticos e como preventivo das doenças degenerativas.

## **2.3 *Maytenus ilicifolia***

### **2.3.1 A espinheira santa e suas características principais**

A espinheira santa é uma planta encontrada na América do Sul, em países como Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia. Oriunda da região sul do Brasil, a planta tem sua ocorrência frequente na região sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e em menor grau, em São Paulo, no Mato Grosso e no Mato Grosso do Sul, A Figura 14 expõe a região nativa com ocorrência da planta (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2007; CALOU et al., 2014; BARBOSA et al., 2024).

**Figura 14 - Ocorrência da espinheira santa na américa do sul**



**Fonte:** CAMASSOLA et al., 2017.

Apesar da região sul ser o território originário dessa espécie de planta e seu cultivo e comercialização ser vasto nessa região, é comum encontrarmos a planta citada em todas as regiões do país, visto que Magalhães (2002), em artigo desenvolvido, analisou suas características ecológicas, informando que o seu desenvolvimento é favorecido em solos úmidos e ricos em matéria orgânica, se adaptando facilmente no interior de matas nativas e em matas ciliares, com clima subtropical e temperado (MAGALHÃES, 2002).

O Brasil com seu vasto e diversificado território é perfeito para a disseminação e utilização da espinheira santa, que teve seu consumo ampliado pela população por acreditar-se ter propriedades curativas e medicinais, sendo objeto de estudo até hoje pelos cientistas buscando isolar e identificar as substâncias e os benefícios que se acredita que ela tem (BRASIL, 2019; BARBOSA et al., 2024)

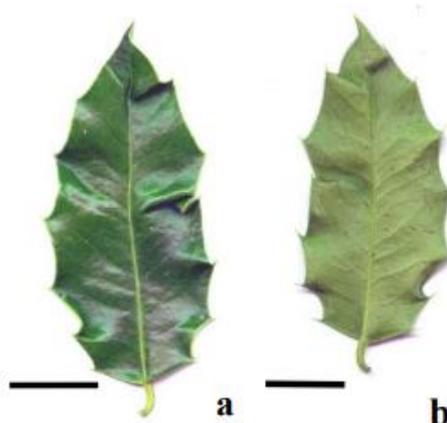
A espinheira santa faz parte da família botânica *Celastraceae* e do gênero *Maytenus* tendo seu nome científico *Maytenus ilicifolia*, pode também ser conhecida por cancerosa, cancerosa-de-sete-espinhos, cancosa, espinheira divina, espinho-de-Deus, maiteno, erva-cancrosa e erva-santa (RAMALHO, 2014; BARBOSA et al., 2024). O gênero *Maytenus* é constituído por cerca de 225 espécies catalogadas, incluindo a espécie *Maytenus ilicifolia*.

No Brasil, é possível encontrar 77 espécies e 14 variedades do gênero e apesar da *Maytenus ilicifolia* ser facilmente distinguível das outras espécies pelos seus ramos angulosos tetra ou multicarenados e seus frutos orbiculares de coloração vermelho-alaranjada, é constantemente confundida e identificada como *Maytenus aquifolia*, uma espécie-tipo da mesma seção, cujo nome mais comum também é o de espinheira-santa.

Mesmo sendo espécies taxonomicamente bem definidas devido a forma de seus ramos, há uma grande semelhança entre suas folhas e flores (CARVALHO-OKANO, 1992; BARBOSA, et al., 2024).

O nome genérico *Maytenus* provém de maitén, termo aborígene chileno (mapuche), que designa uma celastrácea arbórea do Chile (*Maytenus boaria* L.). O epíteto específico *ilicifolia* é porque a planta apresenta folhas semelhantes às do gênero *Ilex* (MARCHIORI, 1995). Tem seu nome popularmente conhecido como espinheira santa devido o formato das suas folhas que apresentam espinhos conforme demonstra a Figura 15 e por ser conhecido como um “santo remédio” no tratamento de diversas doenças, tendo sua origem medicinal datada antes do descobrimento do Brasil com os índios da região que utilizavam as folhas para tratamento de tumores, originando uns de seus nomes: “cancerosa” (BARBOSA et al., 2024; SCHEFFER, 2004).

**Figura 15 - Características morfológicas das folhas da *Maytenus ilicifolia***



Legenda: a: face adaxial; b: face abaxial.

Fonte: MACHADO, 2002.

### 2.3.2 Aplicações e Uso medicinal

Atualmente ela é aplicada pela população para tratamento de inflamações gastrointestinais, como úlceras, gastrite, azia, gases e queimação no estômago, além disso é utilizada no tratamento de infecções e constipação intestinal. Estudos foram capazes de comprovar as diferentes ações benéficas da *Maytenus ilicifolia*, dentre elas a sua ação curativa no tratamento de úlceras e gastrites (SILVA et al., 2022; CIPRIANI et al., 2004).

Antes mesmo das suas ações comprovadas cientificamente, a espinheira-santa já era utilizada na medicina popular graças as suas propriedades curativas. Não sendo limitado apenas ao combate de problemas relacionados ao trato digestivo, os índios de várias etnias no Paraná e em Santa Catarina utilizavam as folhas, casca do caule e raiz dessa planta no

tratamento de doenças do trato urinário, câncer de pele, distúrbios relacionados ao ciclo menstrual (como amenorreia e dismenorreia), diarreia (com cólicas intestinais e presença de sangue nas fezes) e também em lavagens de feridas e úlceras, devido as suas propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias (BARBOSA et al., 2024; MARQUESINI, 1995).

Além disso, no Paraguai a população rural costumava usar a espinheira-santa como anticoncepcional, e na Argentina, como antiasmática e antisséptica. No Rio Grande do Sul, a espinheira santa pode ser, por exemplo, misturada ao chimarrão, para aliviar gastrite, azia e úlcera gástrica ou duodenal (SIMÕES et al., 1998). Em países como os Estados Unidos, são utilizados extratos de suas folhas para o tratamento de úlceras, utilizada como laxante para recomposição da flora intestinal e na inibição de bactérias patogênicas, para eliminar toxinas através dos rins e da pele, para regular a produção do ácido clorídrico do estômago e para o tratamento de outras doenças (CALOU et al., 2014; TAYLOR, 1998; LORENZI & MATOS, 2002).

## 2.4 Objetivos

### 2.4.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial antioxidante e antiglicante do extrato etanólico de folhas da espécie *Maytenus ilicifolia*, por mecanismos conhecidos no processo de ENO e EC, visando a obtenção de dados suficientes para aproveitamento desses extratos como ingredientes ativos em formulações suplementares/farmacêuticas.

### 2.4.2 Objetivos Específicos

- Obter extrato etanólico das folhas da espécie *Maytenus ilicifolia*;
- Investigar a capacidade antiglicante do extrato etanólico das folhas da espinheira santa pelas metodologias em sistemas de glicação com açúcares redutores (Glicose e Frutose) e o produto intermediários do processo de glicação (Metilglicoxal) por diferentes métodos.
- Avaliar a capacidade antioxidante em sistemas com radicais sintéticos (FRAP e DPPH•) e radicais de importância biológica como o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e ácido hipocloroso (HOCl).

### 3 EXPERIMENTAL E MÉTODOS

#### 3.1 Experimental

##### 3.1.1 Reagentes, solventes e equipamentos

Nas Tabelas 2 e 3 são listados todos os reagentes, solventes e equipamentos necessários para realização das análises.

**Tabela 2 - Reagentes e solventes utilizados no trabalho desenvolvido.**

Reagente	Marca
Radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (DPPH <sup>•</sup> )	Sigma-Aldrich
2,4,6-tris (2-piridil)-5-triazina (TPTZ)	Sigma-Aldrich
Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2carboxílico (Trolox)	Sigma-Aldrich
Quercetina	Sigma-Aldrich
Cloreto férrico	VetecQuímica Fina Ltda
Acetato de sódio	CRQ Cromato ProdutosQuímicos Ltda
Carbonato de sódio anidro	ReagenQuímibras Indústrias Químicas S/A – RJ
Cloreto de tetrazólio-nitrozul	Sigma-Aldrich
Nicotinamida adenina dinucleotídeo	Sigma-Aldrich
Metassulfato de fenazina	Sigma-Aldrich
Fosfato monopotássio	VetecQuímica Fina Ltda
Fosfato dissódico	VetecQuímica Fina Ltda
Ácido acético glacial	Labsynth – Ltda.
Ácido Fórmico	Cromoline Química Fina – Ltda
Ácido clorídrico	Cromoline Química Fina – Ltda
Metanol	Merck KGaA
Etanol	Sigma-Aldrich
Hexano	Panreac Química S. A. U
Dimetilsulfóxido	Merck KGaA
Água purificada	Milli-Q da Millipore Inc

Ácido sulfúrico	Cromoline Química Fina – Ltda
Aminoguanidina	Sigma-Aldrich
Albumina sérica bovina	Sigma-Aldrich
Glicose e Frutose	Cromoline Química Fina – Ltda
Di-hidrorodamina 123	Sigma-Aldrich
Cloreto de sódio	Sigma-Aldrich
Azida de sódio	Sigma-Aldrich
Metilglioxal	Sigma-Aldrich
Orto-fenilenodiamina	Sigma-Aldrich

**Fonte:** AUTOR, 2024.

**Tabela 3 - Equipamentos utilizados no trabalho desenvolvido.**

<b>Equipamento</b>	<b>Marca/Modelo</b>
Agitador de soluções (vortéx)	Phoenex AP-56
Aquecedor	BiomiXer 78 HW-1
Banho de água termostatzada	Buchi, heatingbath B-491
Bomba de vácuo	Emerson – Motor Division ST Louis, MO - USA – CASSKXDJW – 2137 CAT
Balança analítica (0,01mg / 0,1mg)	Mettler Toledo AG 245
Espectrofotômetro UV-vis	Multispec - 1501 Shimadzu, Japão
Estufa	TECNAL – TE – 394/1
Leitor de microplacas	Infinite M Plex - TECAN
pHmetro	Putek
Rotaevaporador	BUCHI R-210
Ultrassom	Cristófoli
Fluorímetro	Shimadzu, RF-5301 PC (Japão)
CLAE	Shimadzu (VP series, Kyoto) (Japão)

**Fonte:** AUTOR, 2024.

### 3.2 Métodos

As análises experimentais foram realizadas no Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo (LEEO), no Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). A partir da obtenção do extrato, as análises realizadas foram: ensaios antiglicantes (Sistema com açúcares redutores frutose e glicose, sistema com o intermediário do processo de glicação - metilglioxal e análise por cromatografia líquida de alta eficiência com orto-fenilenodiamina - OPD e metilglioxal - MGO); e avaliação antioxidante (FRAP, DPPH•, HOCl e O<sub>2</sub><sup>-</sup>).

### 3.2.1 Obtenção da planta para análise

As folhas da espécie *Maytenus ilicifolia* foi obtida em uma loja de produtos naturais localizada na cidade de Maceió em Alagoas. As folhas vieram secas e foram separadas após processo de catação. Após separação as folhas pesaram 28g e foram devidamente conservadas em armário fechado para evitar umidade, exposição a luz e a proliferação de fungos e bactérias.

### 3.2.2 Obtenção do extrato etanólico das folhas da *Maytenus ilicifolia*

O processo de extração das folhas foi realizado de acordo com OLIVEIRA e colaboradores (2009), com modificações. As folhas foram previamente separadas, estas folhas foram trituradas em liquidificador e peneiradas obtendo um pó pesando 21 g. Após a obtenção do pó, pesou-se 10 g e colocou-se em cartucho de papel filtro em sistema de extração continua em aparelho de Soxhlet para obtenção de um extrato com os componentes presentes na planta. A extração durou 6 horas ininterruptas com o uso de uma manta de aquecimento para evaporação do solvente. Foi evitada temperaturas muito elevadas que pudessem degradar os compostos fenólicos existentes nas folhas da planta (OLIVEIRA et., al. 2009).

A extração ocorreu devido a condensação dos vapores do solvente necessitando assim de sistema de circulação de água para resfriamento estabelecida em 23°C. Foram utilizados 200 mL de hexano como solvente, com objetivo de retirar os óleos, gorduras e substâncias apolares. Posteriormente, o mesmo cartucho foi utilizado para extração em álcool etílico absoluto - PA na mesma condição experimental da extração realizada em hexano, o extrato passou por rota-evaporação (Buchi) a vácuo em banho maria a 37°C para evitar degradação dos compostos fenólicos e retirada do solvente, assim foi obtido o extrato seco das folhas da espinheira santa decodificado como EETES – Extrato Etanólico da Espinheira Santa. O

extrato foi pesado, teve seu rendimento calculado e foi armazenado em vidro âmbar sob refrigeração.

### 3.2.3 Ensaio Antioxidantes

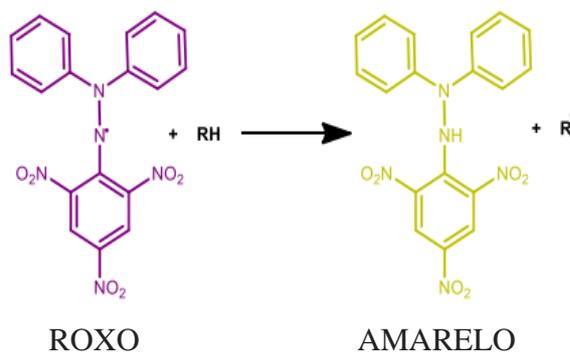
#### 3.2.3.1 Ensaio da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•

Nesse método foi analisado a capacidade antioxidante da *Maytenus ilicifolia* frente ao radical DPPH•, em que foi realizada baseada no método de XAVIER (2018), com algumas alterações, consistindo na capacidade das substâncias antioxidantes presentes na *Maytenus ilicifolia* capturar o DPPH•. A estrutura molecular do DPPH• é formada por grupos nitrogenados e um nitrogênio radicalar sendo assim uma espécie reativa que é estabilizada quando capturada por compostos fenólicos conforme representado na figura 16.

Assim, é possível avaliar a capacidade do extrato em capturar espécies reativas de nitrogênio ao capturar o DPPH•, assim como as espécies nitrogenadas que iniciam o estresse nitrosativo e o processo de glicação e formação dos AGEs no corpo. Primeiramente preparou-se uma solução de DPPH• na concentração de 40 µg/mL em metanol, a solução então foi armazenada em gelo e na ausência de luz por se tratar de um radical que reage com a luz UV (XAVIER, 2018; SAÂNCHEZ-MORENO et., al., 1999).

Posteriormente, preparou-se sete concentrações diferentes do extrato obtido da espinheira santa a partir de uma solução estoque de 500 µg/mL. O sistema reacional foi preparado com 2,7 mL da solução metanólica de DPPH• e 300 µL das soluções da amostra em cada concentração, para o branco utilizou-se metanol e para controle negativo dos resultados a solução de DPPH•, para controle positivo utilizou-se trolox nas mesmas faixas de concentração preparadas para amostra. Após 30 minutos de reação do sistema, realizou-se a análise em espectrofotômetro UV-Vis na faixa de 516 nm considerando-se a redução da absorbância caracterizada pela captura de hidrogênio pelo radical formando DPPH-H como ilustrado abaixo na Figura 16.

**Figura 16 - Reação de redução do radical DPPH• por um antioxidante genérico RH.**



**Fonte:** XAVIER, 2018.

Os resultados expressos em porcentagem de inibição (I%) do radical DPPH• foram calculados baseados na seguinte equação:

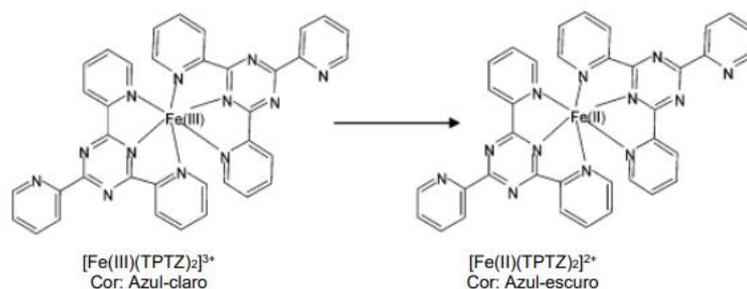
$$\%I = [Abs_{controle} - Abs_{amostra}] / Abs_{controle} \times 100 \quad (2)$$

Em que  $Abs_{controle}$  corresponde a análise da solução de DPPH•, e  $Abs_{amostra}$  corresponde a análise da concentração da amostra após 30 minutos de reação. O sistema foi preparado em diferentes replicadas e os resultados foram expressos em tabela e graficamente baseados no cálculo do  $IC_{50}$ .

### 3.2.3.2 Determinação do potencial redutor de ferro – FRAP

O método consiste na transformação do complexo de ferro III:  $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ , em ferro II:  $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ , em que o ligante principal é o TPTZ(2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) conforme ilustrado abaixo na Figura 17 por PRIOR et al. (2005). Foi realizado por meio de metodologia de MELO e colaboradores (2015) com adaptações, em que foi analisada a capacidade antioxidante da espinheira santa em reduzir ferro (FRAP) com a solução FRAP em condições ácidas com pH 3,6.

**Figura 17 - Reação de redução do complexo TPTZ [Fe(III)/Fe(II)].**



**Fonte:** PRIOR et al., 2005.

Primeiramente foi preparado tampão acetato 300 mM com pH 3,6, em seguida preparou-se soluções de cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 20 mM e solução TPTZ 10 mM em HCl 40mM como solvente da solução, por fim no momento da análise foi feita a solução FRAP misturando 25 mL do tampão acetato, 2,5 mL da solução de cloreto férrico e 2,5 mL de TPTZ. O extrato foi preparado em uma concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ . O sistema reacional foi feito com 2,7 mL da solução FRAP, 270  $\mu\text{L}$  de água deionizada e 90  $\mu\text{L}$  do extrato, reagindo por 30 minutos em banho maria a 37°C na ausência de luz. Após os 30 minutos da reação foi realizada análise em espectrofotômetro UV-Vis na faixa de 595 nm expressando a redução na absorbância pelo potencial antioxidante do extrato, foi utilizado a solução FRAP para controle negativo, para padrão antioxidante utilizou-se trolox em preparações na faixa de 0 a 30  $\mu\text{g/mL}$ .

O cálculo da metodologia foi realizado com a curva de trolox transformada em gráfico, considerando a absorbância observada na faixa de 595 nm e a concentração, assim obtendo uma equação da reta em que X expressa concentração e Y absorbância. O método utiliza resultados expressos em massa, portanto converteu-se a curva de trolox em mg servindo de base para o cálculo da massa expressa da amostra equivalente a massa de trolox, assim é feito a divisão da massa correspondente a amostra na determinada concentração e dividida pela massa de trolox (padrão) correspondente. Por fim, foi considerada a massa de amostra equivalente à de trolox capaz de reduzir 50% do complexo de ferro ( $\text{IC}_{50}$ ) utilizando a mesma equação do método com DPPH $^{\bullet}$ .

### 3.2.3.3 Avaliação da eliminação do radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )

Diferentemente dos métodos com radical DPPH $^{\bullet}$  e redução de ferro (FRAP) que consiste em sistemas radiculares não biológicos, o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  faz parte dos ERONs, consistindo

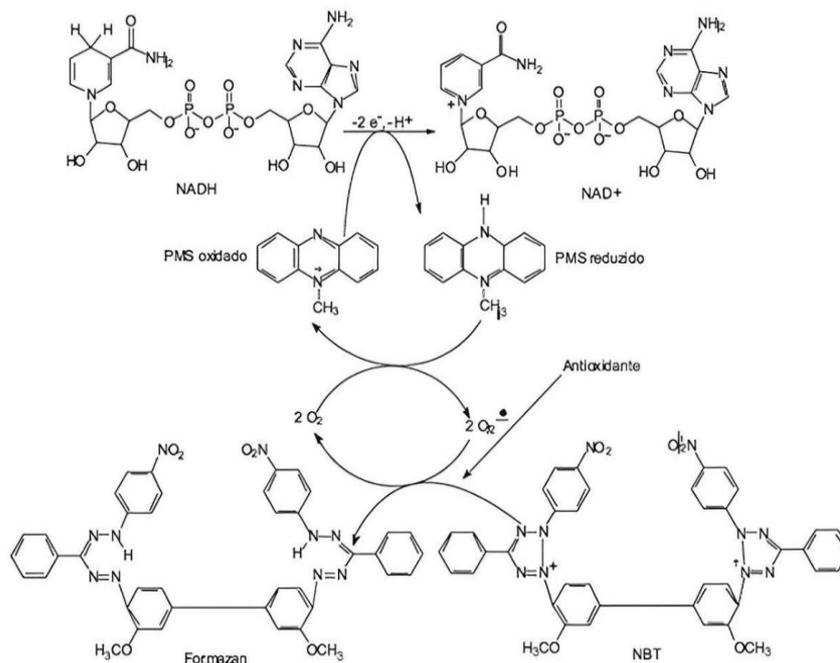
numa espécie reativa de oxigênio gerada no processo de oxidação no nosso organismo e servido de base para formação, por meio da reação de Maillard, de compostos intermediários no processo de glicação e formação dos AGEs, tendo assim uma importância biológica mais considerável que os radicais já mencionados.

A metodologia consiste em uma reação não enzimática, descrita na Figura 18, entre metassulfato de fenazina (PMS) na presença de NADH (Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido), tendo por objetivo a geração do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) por meio da oxidação do NADH pelo PMS. Além disso, no sistema reacional tem a presença de cloreto de tetrazólio-nitrozol (NBT) reduzido a diformazan pelo  $O_2^{\cdot-}$ , de modo que compostos antioxidantes competem com NBT para capturar  $O_2^{\cdot-}$ , assim diminuindo a redução do NBT que pode ser medida espectrofotometricamente na faixa de 560 nm. (MAGALHÃES et al., 2008; NIMSE; PAL, 2015).

A metodologia foi realizada seguindo os parâmetros de GOMES et al. (2007) com algumas alterações, primeiramente preparou-se tampão fosfato de potássio na concentração de 19Mm e pH 7,4 servindo para preparação dos reagentes formadores do radical. Com o tampão fosfato de sódio preparou-se soluções de NADH 996  $\mu$ M, solução de PMS 16,2  $\mu$ M e solução de NBT 86,6  $\mu$ M que foram preparadas somente na hora da análise e armazenadas em gelo na ausência de luz para evitar oxidação. O extrato de espinheira santa foi preparado em diferentes concentrações por uma solução estoque de 5000  $\mu$ g/mL, o sistema reacional foi feito com a mistura de todos os reagentes em triplicata e sua análise foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis em microplaca.

Para o branco utilizou-se a reação na ausência de PMS e do extrato, ao passo que para o controle negativo foi usado a mistura reacional sem a presença do extrato obtendo a capacidade total de formação do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), para o controle positivo foi utilizado quercetina nas mesmas faixas de concentração do extrato. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição (I%) da redução do NBT para formar diformazan, em que o cálculo foi feito utilizando a fórmula expressada na metodologia com radical DPPH $^{\cdot}$ .

**Figura 18 - Representação esquemática da geração do ânion radical superóxido e ação de um antioxidante presente no meio.**

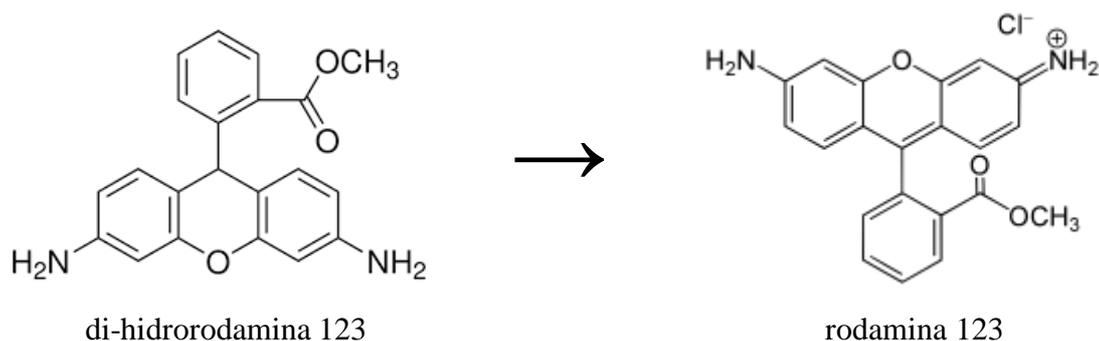


**Fonte:** OLIVEIRA et al., 2009.

### 3.2.3.4 Ensaio de Eliminação do Ácido Hipocloroso (HOCl)

O Ácido hipocloroso (HOCl) constitui uma espécie reativa de oxigênio pertencente a classe dos ERONs e sua metodologia experimental é seguida por GOMES et al. (2007), com algumas modificações. Nesse método utilizamos uma molécula com grande capacidade fluorescente pelo fato de as medidas fluorescentes serem de forma quantitativa superiores as luminescentes e nesse caso a di-hidrorodamina 123 (DHR) se destaca (COSTA et al., 2007). A DHR não é fluorescente, contudo, no meio reacional quando oxidada pelo ácido hipocloroso apresenta alto teor de fluorescência formando a rodamina 123 conforme ilustração abaixo na Figura 19.

**Figura 19 - Esquema da oxidação da di-hidrorodamina 123 (DHR) à rodamina 123.**



**Fonte:** COSTA, et al., 2007.

Primeiramente foi preparado tampão fosfato 100 mM com pH = 7,4 utilizado na preparação do ácido hipocloroso, que foi feita com uma alíquota de 455  $\mu\text{L}$  de uma solução 1% (m/v) de NaOCl completada em balão volumétrico de 50 mL com água deionizada, posteriormente a solução teve o pH ajustado para 6,2 com ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) que induziu a formação do HOCl que teve sua concentração medida espectrofotometricamente na faixa de 235 nm, por meio da absorvitividade molar do ácido ( $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Posteriormente, calculou-se a quantidade necessária para preparar uma solução de HOCl com concentração de 5  $\mu\text{M}$ , retirando uma alíquota da solução previamente preparada e com a concentração determinada espectrofotometricamente sendo completa para 10 mL de tampão fosfato. A solução de DHR foi feita com uma solução estoque de 2,89 mM, retirando uma alíquota de 62  $\mu\text{L}$  e completando para 5 mL com tampão fosfato chegando na concentração de 30  $\mu\text{M}$ . Por fim, foi preparado soluções com diferentes concentrações do extrato da espinheira santa com uma solução estoque de 400  $\mu\text{M}$ , para o sistema reacional foram misturas as soluções em triplicata e sua análise foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis em microplaca.

Para o branco utilizou-se a reação na ausência de HOCl e do extrato, ao passo que para o controle negativo foi usado a mistura reacional sem a presença da amostra obtendo a capacidade total de formação da rodamina, para o controle positivo foi utilizado quercetina nas mesmas faixas de concentração da amostra. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição (I%) da redução da fluorescência observada na conversão do DHR, em que o cálculo foi feito utilizando a fórmula expressada na metodologia com radical DPPH $^{\bullet}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

### 3.2.4 Ensaios antiglicantes

#### 3.2.4.1 Sistema com açúcares redutores (FRU+GLI) e BSA

A realização do método se deu por meio de adaptações de metodologia realizada por MELO e colaboradores (2015). Primeiramente preparou-se tampão fosfato como solvente para preparação das soluções do método, o tampão foi feito em concentração de 50 mM e 100 mM para NaCl, além de azida de sódio 0,02% (m/v), em pHmetro verificou-se o pH do tampão determinado em 7,4. Foram preparadas com tampão fosfato, soluções de frutose (200 mM), Glicose (200 mM) e BSA (45  $\mu\text{M}$ ) e soluções com o extrato da espinheira santa em seis concentrações diferentes, as concentrações foram determinadas pela diluição de uma solução estoque de 2000  $\mu\text{g/mL}$  preparada em etanol. O sistema reacional foi feito com 500  $\mu\text{L}$  da

mistura das soluções de glicose e frutose, 500 µL da solução de cada concentração preparada e 500 µL da solução de BSA. Foi incubada durante 7 dias sob agitação em temperatura de 37°C.

Para controle negativo, em que se analisa a reação sem compostos antiglicantes, utilizou-se tampão fosfato substituindo as soluções das diferentes concentrações. Para controle positivo, considerando o efeito de uma substância caracterizada como antiglicante pela literatura, utilizou-se aminoguanidina nas mesmas concentrações servindo como curva de calibração para análise dos resultados. O experimento foi feito em diferentes replicatas e a análise dos resultados foi realizada no dia da preparação e no sétimo dia posterior a realização do experimento, a análise foi feita em espectrofluorímetro na faixa de 360 nm para excitação e 440 nm para emissão. Mediu-se a fluorescência esperada pela atividade de redução dos AGEs esperada da espinheira santa na faixa de 440 nm.

O IC<sub>50</sub> foi calculado graficamente considerando a concentração e a taxa de inibição dos AGEs (I%) pela seguinte formula:

$$I\% = (F_{\text{controle negativo}} - F_{\text{amostra}} / F_{\text{controle negativo}}) \times 100 \quad (3)$$

Onde  $F_{\text{amostra}}$  corresponde as seis concentrações diferentes em que se subtraiu a fluorescência obtida no sétimo dia pelo primeiro dia de análise, servindo de parâmetro também para realização do  $F_{\text{controle negativo}}$ .

#### 3.2.4.2 Sistema com MGO e BSA

O ensaio tem por objetivo analisar a etapa intermediária do processo de glicação, em que utiliza o metilglioxal (espécie reativa de oxigênio proveniente de reações de oxidação/glicação) como parâmetro para formação dos AGEs, baseado na metodologia descrita por WANG e colaboradores (2011) com algumas modificações. Primeiramente preparou-se tampão fosfato como solvente para preparação das soluções do método, o tampão foi feito em concentração de 50 mM e 100 mM para NaCl, além de azida de sódio 0,02% (m/v), em pHmetro verificou-se o pH do tampão determinado em 7,4. Foram preparadas com tampão fosfato, soluções de metilglioxal (1,5 mM) e BSA (45 µM) e soluções com o extrato da espinheira santa em seis concentrações diferentes, as concentrações foram determinadas pela diluição de uma solução estoque de 2000 µg/mL preparada em etanol.

O sistema reacional foi feito com 500  $\mu\text{L}$  da solução de metilglioxal, 500  $\mu\text{L}$  da solução de cada concentração preparada e 500  $\mu\text{L}$  da solução de BSA. Foi incubada durante 3 dias sob agitação em temperatura de 37°C. Para controle negativo, utilizou-se tampão fosfato substituindo as soluções das diferentes concentrações. Para controle positivo, considerando o efeito de uma substância caracterizada como antiglicante pela literatura, utilizou-se aminoguanidina nas mesmas concentrações servindo como curva de calibração para análise dos resultados.

O experimento foi feito em diferentes replicatas e a análise dos resultados foi realizada no dia da preparação e no terceiro dia posterior a realização do experimento, a análise foi feita em espectrofluorímetro na faixa de 360 nm para excitação e 440 nm para emissão. Mediu-se a fluorescência esperada pela atividade de redução dos AGEs esperada da espinheira santa na faixa de 440 nm. O  $\text{IC}_{50}$  foi calculado graficamente considerando a concentração e a taxa de inibição dos AGEs (I%) conforme fórmula citada no sistema com glicose e frutose.

#### 3.2.4.3 Captura de MGO através de derivatização com OPD

O método foi realizado através do ensaio descrito por WANG e colaboradores (2011) com algumas modificações. A quantificação de MGO baseou-se na derivatização com OPD (orto-fenilenodiamina) para formar 2-metilquinoxalina. As soluções de MG e OPD foram feitas em tampão fosfato (50 mM, pH 7.4) nas concentrações de 5 mM e 10 mM, respectivamente. Aminoguanidina (5 mM) foi utilizada como padrão positivo e a amostra utilizada na concentração de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , todas as soluções foram previamente filtradas (microfiltro x diâmetro de poro 0,45  $\mu\text{m}$ ).

O sistema reacional consistiu na adição 100  $\mu\text{L}$  da solução MG e 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (controle negativo) ou da solução da amostra, incubou-se à 37 °C por 1h. Após incubação adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução de OPD e deixou-se reagir por 30 min para obtenção do produto, posteriormente a análise cromatográfica foi 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), utilizados como fase móvel, fluxo de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$  e o volume de injeção foi de 50  $\mu\text{L}$ .

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 20 min.

A porcentagem de MGO remanescente foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\%MGOrem = \frac{\text{área do pico após adição da amostra}}{\text{área do pico sem adição da amostra}} \times 100 \quad (4)$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Rendimento do extrato

A extração da espinheira santa resultou em um extrato viscoso de coloração verde escura com um peso de 852,33 mg, tendo um rendimento em porcentagem, referente aos 10 g de pó das folhas de espinheira santa colocadas para extrair, de 8,5% e foi codificada como EETES – Extrato etanólico da espinheira santa.

**Tabela 4 - Rendimento da extração etanólica da espinheira santa.**

Amostra	Código	Rendimento (%)
Extrato etanólico da espinheira santa	EETES	8,5

Fonte: AUTOR, 2024.

### 4.2 Testes de Solubilidade do Extrato

O EETES apresentou diferentes solubilidades em relação aos solventes utilizados na dissolução dele na concentração de 5 mg/mL. O etanol foi o solvente que apresentou maior solubilidade, enquanto o metanol apresentou menor solubilidade.

**Tabela 5 - Teste de Solubilidade do extrato etanólico da espinheira santa (EETES)**

Solvente:	Solubilidade:
Etanol	Muito Solúvel
Metanol	Relativamente solúvel
Tampão Fosfato	Solúvel

Fonte: AUTOR, 2024.

### 4.3 Capacidades antioxidantes do extrato

#### 4.3.1 Capacidade antioxidante pelos métodos com espécies reativas sintéticas DPPH• e FRAP

A determinação da capacidade antioxidante do extrato foi realizada com DPPH• e FRAP. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para a capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH• e FRAP, para o EETES.

**Tabela 6 – Capacidade Antioxidante do DPPH• (IC<sub>50</sub>) e FRAP pelo EETES.**

Amostras	DPPH• IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	FRAP (µmol ET/g extrato seco)
EETES	27,7	0,95
Trolox	17,7	

(ET) Equivalente de trolox.

Fonte: AUTOR, 2024.

Os resultados de redução do radical DPPH• atingiram o IC<sub>50</sub> em concentração próxima a 27,7 µg/mL considerada próximo ao valor do controle positivo utilizado (Trolox) sendo de 17,7 µM mostrando a eficiência do extrato da espinheira santa em capturar os radicais DPPH• (Tabela 7). Os resultados obtidos foram expressos em tabela comparando a porcentagem de inibição com a concentração estudada, a média da porcentagem da inibição foi calculada e o desvio padrão expresso para mais e para menos.

**Tabela 7 - Potencial de captura do radical DPPH• pelo EETES expresso em porcentagem de redução**

Concentração:	70 µg/mL	60 µg/mL	50 µg/mL	35 µg/mL	25 µg/mL	15 µg/mL	10 µg/mL
Média EETES	88,16±0,23	85,79±1,06	74,12±2,84	67,01±1,45	44,68±0,65	29,85±0,47	22,64±0,20

Fonte: AUTOR, 2024.

Os resultados obtidos para capacidade redutora de ferro (FRAP) foram promissores em que para uma concentração de 12,5 µg/mL do extrato da espinheira santa foi obtido de massa equivalente da amostra para mg de trolox (curva padrão) um total de 0,95 µg/mL. Sendo assim, podemos considerar que 0,95 µg do extrato da espinheira santa são suficientes para atingir o mesmo potencial de redução de ferro (FRAP) que a curva de calibração com trolox testada.

#### 4.3.2 Capacidade Antioxidante pelos métodos com Ácido Hipocloroso (HOCl) e o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )

A determinação da capacidade antioxidante também foi avaliada pelo método de sequestro do  $O_2^{\bullet-}$  e HOCl. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para os valores de IC<sub>40</sub> da concentração de  $O_2^{\bullet-}$  e HOCl para o EETES em comparação com os resultados obtidos com o padrão quercetina.

**Tabela 8 - Dados de IC<sub>40</sub> do  $O_2^{\bullet-}$  e HOCl do extrato EETES e padrão**

Amostras	Ânion Radical Superóxido IC <sub>40</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	Ácido hipocloroso IC <sub>40</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
EETES	109,76	0,97
Quercetina	13,60	0,20

Fonte: AUTOR, 2024.

Os resultados do método com o radical ânion superóxido foram expressos em porcentagem de inibição (I%) da redução do NBT para formar diformazan. Os resultados obtidos no método com  $O_2^{\bullet-}$  não atingiu o IC<sub>50</sub> e por este motivo considerou-se o IC<sub>40</sub> para as concentrações estudadas. O controle positivo (padrão) feito com quercetina apresentou IC<sub>50</sub> próximo a 13,6 µM, enquanto o IC<sub>40</sub> para o EETES foi de 109,76 µg/mL (Tabela 8).

Os resultados do método com HOCl foram expressos em porcentagem de inibição (I%) da redução da fluorescência observada na conversão do DHR. No ensaio de eliminação do HOCl os resultados obtidos pelo extrato de espinheira santa apresentaram melhores resultados que o ensaio com  $O_2^{\bullet-}$ , atingindo IC<sub>40</sub> próximo a 0,97 µg/mL estando cerca de 5 vezes inferior ao resultado do controle positivo analisado (quercetina) que atingiu IC<sub>50</sub> em 0,20 µM (Tabela 8).

#### 4.4 Capacidade Antiglicante do Extrato

#### 4.4.1 Sistema BSA com Frutose e Glicose

Os resultados obtidos foram expressos em tabela e gráfico comparando a porcentagem de inibição com a concentração estudada, para o sistema com glicose e frutose os resultados foram promissores e teve o IC<sub>50</sub> atingido apresentando a concentração ideal próximo a 140±0,94 µg/mL, a média da porcentagem da inibição foi calculada. Considerando o controle positivo (padrão), a aminoguanidina atingiu o IC<sub>50</sub> na faixa de 18,3 µg/mL, cerca de 7 vezes menor que a concentração do extrato, contudo vale ressaltar que a aminoguanidina se trata de um composto puro diferentemente de extrações vegetais que possuem complexidade de compostos tendo seus ativos antiglicantes menos acessíveis devido à complexidade da matriz vegetal, o que pode interferir na captura dos ECRs.

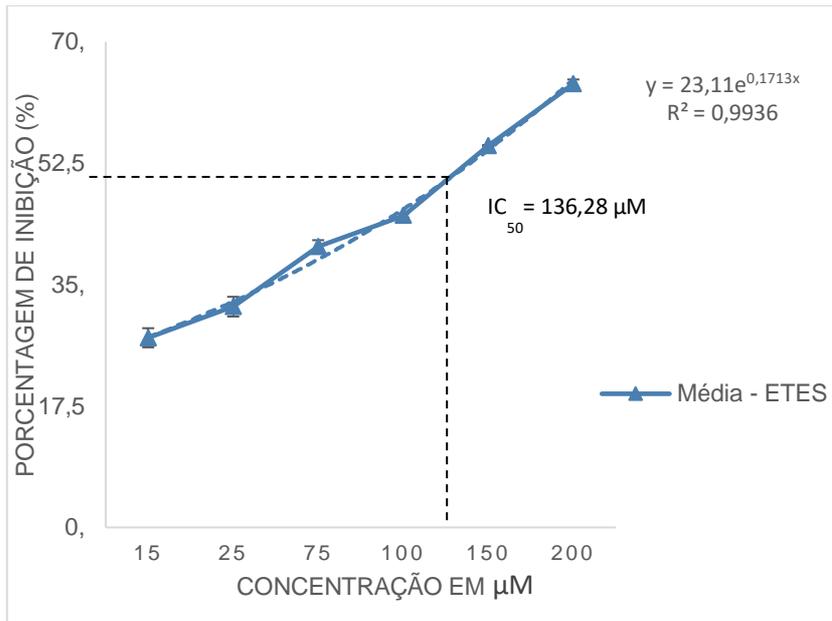
No gráfico foi feita a linha exponencial média que simula as porcentagens ideais de inibição com uma confiabilidade de 0,99 para R<sup>2</sup>. Assim, é possível afirmar que a *Maytenus ilicifolia* apresenta capacidade de reduzir mais de 50% dos AGEs em um sistema com açúcares redutores como a frutose e glicose e uma proteína (BSA). A Tabela 9 e a Figura 20 trazem os resultados obtidos.

**Tabela 9 - Potencial de redução dos AGEs pelo EETES expresso em porcentagem de inibição**

Concentração:	200 µg/mL	150 µg/mL	100 µg/mL	75 µg/mL	25 µg/mL	15 µg/mL
Média – EETES	63,92±1,32	55,03±1,42	44,92±0,94	40,46±0,32	31,82±0,08	27,33±0,64

Fonte: AUTOR, 2024.

**Figura 20 - Potencial de redução dos AGEs pelo EETES expresso em porcentagem de inibição**



Fonte: AUTOR, 2024.

#### 4.4.1 Sistema BSA com Metilglioxal

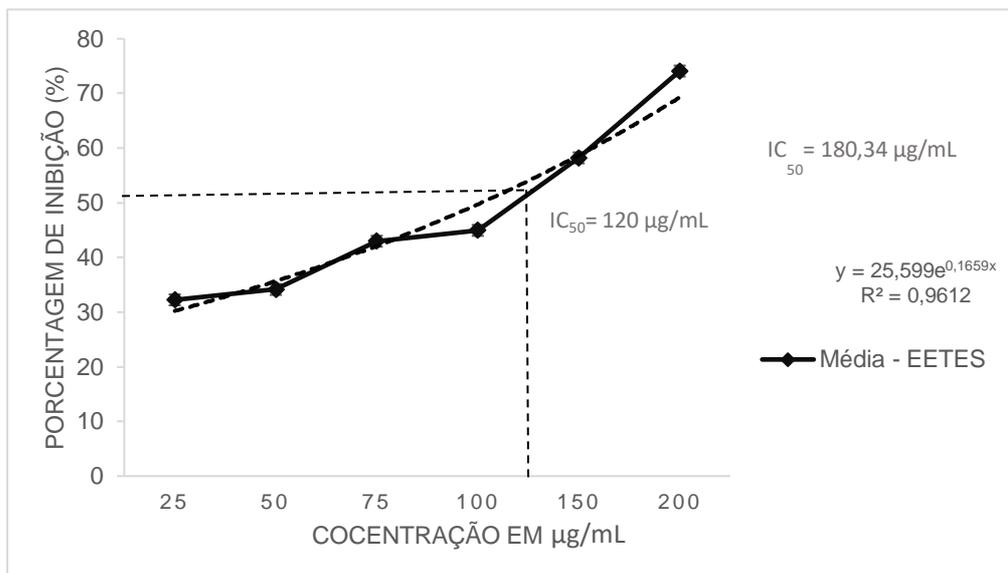
Os resultados obtidos foram expressos em tabela e gráfico comparando a porcentagem de inibição com a concentração estudada, para o sistema com metilglioxal os resultados foram promissores e teve o IC<sub>50</sub> atingido apresentando a concentração ideal próximo a  $120 \pm 0,38$  μg/mL, a média da porcentagem da inibição foi calculada e o desvio padrão expresso para mais e para menos. Considerando o controle positivo (padrão), a aminoguanidina atingiu o IC<sub>50</sub> na faixa de 20,5 μg/mL, cerca de 6 vezes menor que a concentração do extrato. No gráfico foi feita a linha exponencial média que simula as porcentagens ideias de inibição com uma confiabilidade de 0,97 para R<sup>2</sup>. Assim, é possível afirmar que o EETES apresenta capacidade de reduzir mais de 50% dos AGEs gerados pela espécie intermediária do processo de glicação metilglioxal. A Tabela 10 e a Figura 21 trazem os resultados obtidos.

**Tabela 10 - Potencial de captura de metilglioxal pelo EETES expresso em porcentagem de inibição de metilglioxal**

Concentração:	25 μg/mL	50 μg/mL	75 μg/mL	100 μg/mL	150 μg/mL	200 μg/mL
Média - ETES	32,24±0,55	34,15±0,33	42,96±0,78	44,95±1,40	58,22±0,38	74,10±0,14

Fonte: AUTOR, 2024.

**Figura 21 - Potencial de redução dos AGEs pelo EETES expresso em porcentagem de inibição de metilglioxal**



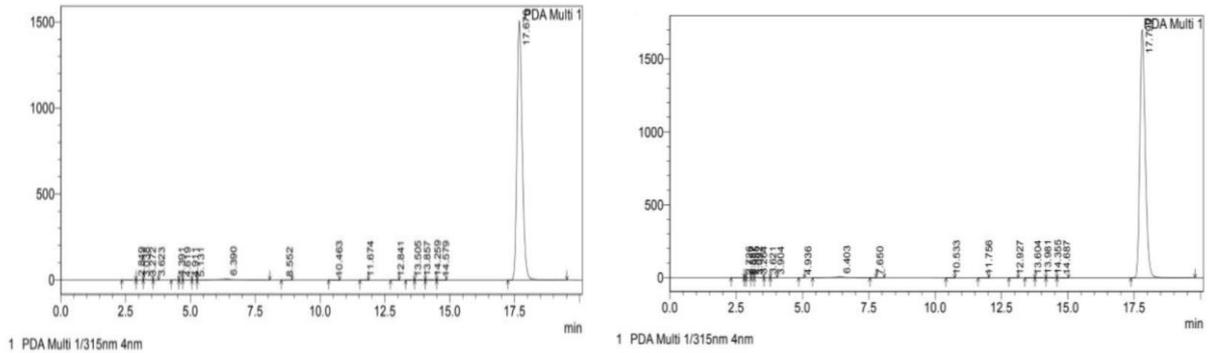
Fonte: AUTOR, 2024.

#### 4.5 Capacidade de captura de metilglioxal através de derivatização com OPD

A capacidade de captura de MGO pelo extrato da espinheira santa foi avaliada através da formação de 2-MQ (2-metilquinoxalina), de modo que se observou a diminuição da intensidade da reação de derivação do OPD formando o produto em menor extensão, pois a amostra captura MGO e o deixa indisponível para reação com a OPD. A Figura 22 apresenta o cromatograma para o sistema contendo MGO e OPD, como também para os sistemas contendo MGO e aminoguanidina (AM) em 30 minutos de reação seguida da adição de OPD. A Figura 23 apresenta os cromatogramas referentes ao sistema contendo MGO e o extrato da espinheira santa durante 30 minutos de reação seguida da adição de OPD.

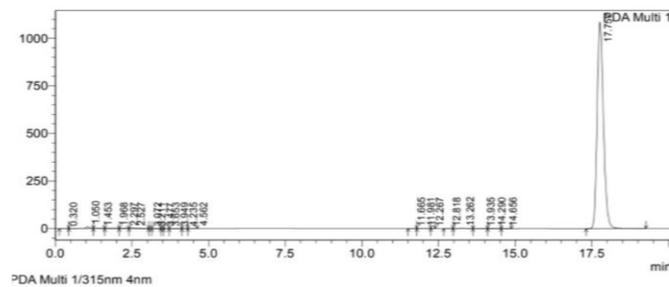
O pico observado em aproximadamente 18 min na figura 22 é referente a formação da 2-MQ, em que a diferença da área observada para a 2-MQ com a presença da AM é de 76,79%, ou seja, aproximadamente 23,2% do MG foi capturado pela AM, comprovando a capacidade antiglicante da AM já conhecida pela literatura. Na figura 23 podemos observar que a área de 2-MQ está próximo a 49,4%, ou seja, a espinheira santa foi capaz de capturar mais de 50,6% do MG tendo resultados mais promissores que a AM, devido a sua eficiência e concentração, necessitando de repetição do experimento em concentrações menores.

**Figura 22 - Cromatograma em CLAE da formação da 2-metilquinoxalina e cromatograma em CLAE da captura de metilglioxal pela aminoguanidina (padrão positivo) respectivamente.**



Fonte: AUTOR, 2024.

**Figura 23 - Cromatograma em CLAE da captura de metilglioxal pelo extrato das folhas da Espinheira Santa**



Fonte: AUTOR, 2024.

## 5 CONCLUSÃO

A obtenção do extrato das folhas da espinheira santa foi bem-sucedida, de modo que sua duração foi de cerca de seis meses devidamente armazenado, sendo o solvente utilizado para extração suficiente para obtenção dos compostos necessários para a análise realizada. Além disso, o rendimento da extração foi considerável sendo suficiente para realização das metodologias aplicadas e considerando a quantidade que se colocou para extrair.

Os resultados obtidos desse estudo acerca das reações de glicação (com açúcares redutores e metilglioxal) do extrato da *Maytenus ilicifolia* mostraram seu potencial antiglicante ainda não demonstrado pela literatura. Sendo assim, sua comprovação antiglicante confere ainda mais importância à planta que pode ter suas utilizações farmacológicas ampliadas na indústria e no tratamento de pacientes diabéticos substituindo medicamentos com altos efeitos colaterais. Além disso, acrescenta valor de mercado ao produto e seus derivados que podem assumir dentro da indústria farmacêutica grande papel de destaque e valorização.

A literatura já demonstra a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes na *Maytenus ilicifolia* e este estudo fornece dados para corroborarem com as informações já evidenciadas, contudo a quantidade de espécies reativas geradas no ENO e EC são variadas e novos métodos com mais espécies de importância biológica são necessárias para base de dados da planta.

A comprovação experimental por meio desse estudo fornece dados para experiências posteriores *in vivo* para um avanço na descoberta de produtos naturais capazes de evitar a complicação e a progressão de doenças degenerativas e crônicas como também a prevenção do envelhecimento precoce da pele e processos inflamatórios e neoplásicos.

## 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.
- AHMAD, S. et al. **Do all roads lead to the Rome? The glycation perspective!** Seminars in Cancer Biology, v. 49, p. 9–19, 2018.
- ALI, S. S. et al. **Indian medicinal herbs as sources of antioxidants.** Food Research International, v. 41, n. 1, p. 1–15, 2008.
- ALONSO, J. 1998. **Tratado de fitomedicina bases clínicas y farmacológicas.** Buenos Aires, Isis Ediciones SRL, p. 828-834.
- ALVES, E. P. B.; ASPECTOS, S. R. **Aspectos gerais e abordagens terapêuticas da quercetina sobre as complicações do diabetes causadas pelo estresse oxidativo.** Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR, v. 14, n. 2, p. 179–186, 2010
- 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.
- 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.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. **O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 52, n. 6, p. 940–950, 2008.
- 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.
- BARBOSA, E. S.; SILVA, E. L.; AMORIM, J. S.; JUNIOR, J. I. G. **Uso da espinheira santa (Maytenus ilicifolia) no tratamento de pacientes portadores de transtornos gastrointestinais.** Brazilian Journal of Health Review, Curitiba, v. 7, n.2,p.01-11,mar./apr., 2024.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Química Nova, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BENZIE, I. E. F.; STRAIN, J. J. **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay.** Analytical Biochemistry, nº 239, p.70-76, 1996.
- BRASIL. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2019.

BYUN, K., YOO, Y., SON, M., LEE, J., JEONG, G. B., PARK, Y. M., ... & LEE, B. **Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases.** *Pharmacology & therapeutics*, v. 177, p. 44-55, 2017.

CALOU, I. B. F. et al. **A atividade gastroprotetora da *Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*.** *Revista Saúde & Ciência Online*, v. 3, n. 2, p. 33-42, 2014.

CAMASSOLA, T. M.; BARBOSA, F. G. **Distribuição geográfica potencial de *maytenus iliciflora* (celastraceae) no brasil frente às mudanças climáticas.** XVII Simpósio brasileiro de geografia física aplicada, Campinas – SP. P 1310, 2017.

CAMATARI, F. O. S. **Determinação de curcuminoides e avaliação da capacidade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de extratos de curcuma longa e constituintes isolados.** Tese de doutorado - Universidade Federal de Alagoas, p. 23-37, 2018.

CARLINI, EA; FROCHTENGARTEN, ML. 1988. **Toxicologia clínica (Fase I) da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*).** Brasília, Distrito Federal, p. 67-73.

CARVALHO, D. A. de. **Flora fanerogâmica de campos rupestres da Serra da Bocaina, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies.** *Ciência e Prática*, Lavras, v. 16, n. 1, p. 97-122, 1992.

CERVANTES, M. H.; RODRIGUEZ, J. M. D.; URIBARRI, J.; CISNEROS, F D.; CAI, W.; SEVILHA, M. E. **Effect of a diet restricted in advanced glycation end products and exercise on metabolic parameters in adult overweight men** *Nutrition*, 2015.

CIPRIANI, TR; MELLINGER, CG; GORIN, PAJ; IACOMINI, M. 2004. **An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*.** *J Nat Prod* 67: 703-706.

CORTI, Roberto et al. **Cocoa and Cardiovascular Health.** *Circulation*, [S. l.], v. 119, n. 10, p. 1433-1441, 17 mar. 2009.

COSTA, D. et al. **New noncellular fluorescence microplate screening assay for scavenging activity against singlet oxygen.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 387, n. 6, p. 2071–2081, 2007.

COTINGUIBA, George Gomes et al. **Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura.** *Journal of Health Sciences*, 2013, n. 3, v. 15, p. 231-237

ERGIN, V. **Carbonyl Stress in Aging Process: Role of Vitamins and Phytochemicals as Redox Regulators.** *Aging and Disease*, v. 4, n. 5, p. 276–294, 2013.

FREITAS, M.; LIMA, J. L. F. C.; FERNANDES, E. **Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst.** A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 649, n. 1, p. 8–23, 2009.

GLIGOROVSKI, S. et al. **Environmental implications of hydroxyl radicals (HO•).** *Chemical Reviews*, v. 115, n. 24, p. 13051–13092, 2015.

- GOLBIDI, S.; BADRAN, M.; LAHER, I. **Diabetes and Alpha Lipoic Acid**. *Frontiers in Pharmacology*, v. 2, 2011.
- GOMES, A. et al. **2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 18, p. 6027–6036, 2007.
- HAWKINS, C. L.; PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. **Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins**. *Amino Acids*, v. 25, n. 3, p. 259–274, 2003
- HELLWIG, M.; HENLE, T. **Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction**. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 53, n. 39, p. 10316–10329, 2014.
- HENNING, C.; GLOMB, M. A. **Pathways of the Maillard reaction under physiological conditions**. *Glycoconjugate Journal*, v. 33, n. 4, p. 499–512, 2016.
- 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.
- HYBERTSON, B. M.; GAO, B.; BOSE, S. K.; MCCORD, J. M. **Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation**. *Molecular aspects of medicine*, v. 32, n. 4-6, p. 234, 2011.
- IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. **First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid**. *Alexandria journal of medicine*, v. 54, n. 4, p. 1-4, 2018.
- ISEMURA, Mamoru. **Catechin in human health and disease**. *Molecules*, v. 24, n. 3, p. 528, 2019.
- JAKUBCZYK, K.; DEZEMBRO, C.; KALDUNSKA, J.; KAWCZUGA, D.; KOCHMAN, J.; JANDA, K. **Reactive oxygen species-sources, functions, oxidative damage**. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, v. 48, n. 284, p. 124-125, 2020.
- JEITNER, T. M. et al. **Linking Inflammation and Parkinson Disease: Hypochlorous Acid Generates Parkinsonian Poisons**. *Toxicological Sciences*, v. 151, n. 2, p. 388–402, 2016.
- KALOGIANNIS, M.; DELIKATNY, E. J.; JEITNER, T. M. **Serotonin as a putative scavenger of hypohalous acid in the brain**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1862, n. 4, p. 651–661, 2016.
- KALYANARAMAN, B. **Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms**. *Redox Biology*, v. 1, n. 1, p. 244–257, 2013.
- KESAVAN, S. K. et al. **Proteome wide reduction in AGE modification in streptozotocin induced diabetic mice by hydralazine mediated transglycation**. *Scientific Reports*, v. 3, n. 1, 2013.
- KHAN, Nagma; MUKHTAR, Hasan. **Tea polyphenols in promotion of human health**. *Nutrients*, v. 11, n. 1, p. 39, 2018.

- LI, X. et al. **Mitochondrial reactive oxygen species mediate the lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in human gingival fibroblasts.** *Experimental Cell Research*, v. 347, n. 1, p. 212–221, 2016.
- LIMA, O. G.; COELHO, J. S. B.; WEIGERT, E.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; SOUZA, M. A. M. 1969. **Substâncias antimicrobianas de plantas superiores.** *Rev Inst Antibioticos* 9: 17-25.
- LOPACHIN, R. M.; GAVIN, T. **Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: A chemical perspective.** *Chemical Research in Toxicology*, v. 27, n. 7, p. 1081–1091, 2014.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p. 512.
- LÜ, J. et al. **Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010.
- LUSHCHAK, V. I. **Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification.** *Chemico-Biological Interactions*, v. 224, p. 164–175, 2014.
- MACHADO, A. V. **Morfo-anatomia foliar comparativa de espécies conhecidas como espinheira-santa: *Maytenus ilicifolia* Mart., *Sorocea bonplandii* Baillon e *Zollernia ilicifolia* Vog.** Monografia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- MAGALHÃES, P. **Agrotecnologia para o cultivo da Espinheira Santa.** CPQBA-UNICAMP. Campinas, São Paulo, 2002.
- MAGALHÃES, L. M. et al. **Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties.** *Analytica Chimica Acta*, v. 613, n. 1, p. 1–19, 2008.
- MANACH, Claudine et al. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** *The American journal of clinical nutrition*, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
- MARCHIORI, J. N. C. **Elementos de dendrologia.** Santa Maria: Ed. da Universidade Federal de Santa Maria, 1995. 163 p
- MARQUESINI, N. R. **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, Sul do Brasil: guarani, kaingang, xokleng, ava-guarani, kraô e cayuá.** 1995. 290 f. Tese (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- MARTELLI, Felipe; NUNES, Francis Morais Franco. **Radicais livres: em busca do equilíbrio.** *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 66, n. 3, p. 54-57, sep. 2014.
- MELO, I. S. V., DOS SANTOS, A. F., DE LEMOS, T. L. G., GOULART, M. O. F., & SANTANA, A. E. G. **Oncocalyxone a functions as an anti-glycation agent in vitro.** *PLOS ONE*, v.10, n. 6, p. 1–8, 2015.
- MENDES, B. G.; MACHADO, M. J.; FALKENBERG, M. **Triagem de glicolipídios em plantas medicinais.** *Rev Bras Farmacogn* 16: 568-575, 2006.
- MING LC; CASTRO DM; DELACHIAVE ME. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista. 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **ABC do Câncer: Abordagens básicas para controle do câncer.** Instituto Nacional de Câncer (INCA) – Rio de Janeiro: Inca, 2011. 128 p.: il.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017. **Espinheira-santa: boas práticas para o extrativismo sustentável orgânico.** Secretaria de Extrativismo e Desenvolvimento Rural Sustentável. Departamento de Extrativismo. – Brasília, DF: MMA, p. 11.

NAMIKI, M.; HAYASHI, T. A new mechanism of the Maillard reaction involving sugar fragmentation and free radical formation, in: **The Maillard Reaction in Foods and Nutrition**, in: WALLER, G.R.; FEATHER, M.S. **ACS Symposium Series, American Chemical Society**, p. 215, 1983.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIJVELDT, R. J. et al. **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications.** The American journal of clinical nutrition, v. 74, n. 4, p. 418–25, 2001.

NIMSE, S. B.; PAL, D. **Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms.** RSC Adv., v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

NOGUEIRA, R. F. P. et al. **Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e fotofenton.** Química Nova, v. 30, n. 2, p. 400–408, 2007.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes.** Quím. Nova, v. 32, n.3, p. 689-702, 2009.

OLMOS, A.; GINER, R. M.; MÁÑEZ, S. **Drugs modulating the biological effects of peroxynitrite and related nitrogen species.** Medicinal Research Reviews, v. 27, n. 1, p. 1–64, 2007.

PANASENKO, O. M.; GORUDKO, I. V; SOKOLOV, A V. **Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems.** Biochemistry (Moscow), v. 78, n. 13, p. 1466–1489, 2013.

PEREIRA, M. A. S.; RODRIGUES, D. C.; CERDEIRA, R. M.; FRANÇA, S. C. 1993. **Isolamento de metabólitos de maytenus associadas à ação anti-úlceras gástrica.** 12º. Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Curitiba.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. **Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.53, p. 4290-4302, 2005.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. **Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids.** Fitoterapia, v. 82, n. 4, p. 513–523, 2011.

RABBANI, N.; XUE, M.; THORNALLEY, P. J. **Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics.** Glycoconjugate Journal, v. 33, n. 4, p. 513–525, 2016.

RAMALHO, L. **Folheto espinheira santa corrigido**. ANVISA, Medicamento fototerápico, BRASIL. p. 1, 2014.

SAÂNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI. J.; SAURA-CALIXTO, F. **Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents**. *Food Research International*, v.32, p. 407-412, 1999.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; ADAMCZYK, R.; BARTOSZ, G. **Protection against peroxynitrite reactions by flavonoids**. *Food Chemistry*, v. 164, p. 228–233, 2014.

SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. **Photoprotection of natural flavonoids**. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 3, n. 9, p. 129–141, 2013.

SANTANA CF, Asfora JJ, Cotias CT 1971. **Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos**. *Rev Inst Antibioticos* 11: 37-49.

SANTOS, José Alberto Fernandes Gomes dos. **Exercício Físico, Radicais Livres, Espécies Reativas de Oxigênio, Envelhecimento e Doenças Neurodegenerativas**. 2013. 36 f. Monografia – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SANTOS, C. T. **Frutos de *Shinus terebinthifolius* Raddi: Extração ativa, estudo fitoquímico e incorporação em filmes bioativos de pectina** - Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Feira de Santana, 2017.

SBFGNOSIA; Sociedade Brasileira de farmacognosia. **Apostila de Aula Prática de Farmacognosia UEL (Taninos)**. 2009

SCHEFFER, M.C. **Uso Tradicional e atual de espécies de *Maytenus***. In: REIS, M.S.; SILVA, S.R. (org.). *Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus* spp., espinheira-santa*. Brasília: IBAMA, 2004. p. 53-66.

SCHNEIDER C; OLIVEIRA AR. **Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico**. *RBME*. 2004.

SEMCHYSHYN, H.; LUSHCHAK, I. **Interplay Between Oxidative and Carbonyl Stresses: Molecular Mechanisms, Biological Effects and Therapeutic Strategies of Protection**. *Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects*, p. 15–45, 2012.

SIES, H. **Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine**. *Redox Biology*, v. 4, p. 180–183, 2015.

SILVA, Walisson Junio Martins da; FERRARI, Carlos Kusano Bucalen. **Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento**. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*. Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 441- 451, 2011.

SILVA, M. C.; MORAES, D. L. S.; ARINI, L. E. S.; MENEZES, A. C. S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. M.; LUCIANO, M. C. S. **Avaliação da atividade citotóxica em linhagens de células tumorais de *Plenckia populnea* (Celastraceae)**. V Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG, Anápolis: Universidade Estadual de Goiás, p. 1-4, 2018.

SILVA, J.A. et al. ***Maytenus ilicifolia* (espinheira santa): uma revisão atualizada sobre suas propriedades medicinais e mecanismos de ação**. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 173, 1998.

SONG, S. et al. **Long-Term Diabetes Mellitus Is Associated with an Increased Risk of Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis**. PLOS ONE, v. 10, n. 7, p. 1-27, 2015.

STEVANATO, R.; BERTELLE, M.; FABRIS, S. **Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols**. Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 69, n. 1, p. 71–77, 2014.

SUZUKI, D. et al. **Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions**. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, v. 10, n. 22, p. 822–832, 1999.

TAYLOR, L. **Herbal secrets of the rainforest**. Rocklin: Prima Publ, p. 315, 1998.

TORRES, N. M. P. O.; XAVIER, J. A.; GOULART, M. O. F.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P. **A química dos produtos finais de glicação avançada**. Revista virtual de química, v.10, n. 2, p.1-19, 2018.

VASCONCELOS, T. B.; et al. **Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?**. Journal of Health Sciences, n. 3, v. 16, p. 213-219, 2014.

VELLOSA, J. C. R.; BIAVATTI, M.; FRANÇÓIA, P. C. O.; MELLO, B. J.; ALMEIDA, A. C.; BUENO, G. E. **Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte**. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.1, p.10152-10168 Jan. 2021.

VISTOLI, G. et al. **Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation**. Free Radical Research, v. 47, n. sup1, p. 3–27, 2013.

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.

WANG, H. **Development of fluorescent and luminescent probes for reactive oxygen species**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 85, p. 181–202, 2016.

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.

XAVIER, J. A. **Estresse carbonílico: avaliação in vitro de efeitos pró- e antiglicantes de adoçantes não nutritivos e de extratos vegetais**. Tese de doutorado - Universidade Federal de Alagoas, p. 21-41, 2018.

YEH, F.L.; HANSEN, D.V.; SHENG, M. **TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases**. Trends Mol. Med, 23, pp. 512-533, 2017.

YU, E. P. K.; BENNETT, M. R. **Mitochondrial DNA damage and atherosclerosis.** Trends in Endocrinology & Metabolism, v. 25, n. 9, p. 481–487, 2014.

ZILLICH, O. V. et al. **Polyphenols as active ingredients for cosmetic products.** International Journal of Cosmetic Science, v. 37, n. 5, p. 455–464, 2015.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. **Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 87, n. 6, p. 264–270, 2006.