

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

Flávia Adaís Rocha dos Santos

**Potencial antioxidante, antiglicante e antidiabético de extrato etanólico de
sementes de espécies de *Passiflora* e piceatanol *in vitro***

Maceió
2022

FLÁVIA ADAÍS ROCHA DOS SANTOS

Potencial antioxidante, antiglicante e antidiabético de extrato etanólico de sementes de espécies de *Passiflora* e piceatanol *in vitro*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Oliveira
Fonseca Goulart

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Jadriane de
Almeida Xavier

Maceió

2022

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

Bibliotecário: Gislaine da Silva Santos – CRB-4 – 1127

S237p Santos, Flávia Adaís Rocha dos

Potencial antioxidante, antiglicante e antidiabético de extrato etanólico de sementes de espécies de passiflora e piceatanol in vitro / Flávia Adaís Rocha dos Santos. – 2022.

87 f. : il.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 77-87

1. Maracujá- sementes. 2. Piceatanol. 3. Diabetes. 4. Resíduos agroindustriais I.

Título.

CDU:634.776.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus
A. C. Simões Cidade
Universitária, Tabuleiro dos
Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de dissertação da mestrandia **Flávia Adaís Rocha dos Santos** intitulada: “**Potencial antioxidante, antiglicante e antidiabético de extrato etanólico de sementes de espécies de Passiflora e piceatanol in vitro**”, apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 28 de março de 2022, às 14h, por meio de videoconferência.

Maceió, 28 de março de 2022.

Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente
IARA BARROS VALENTIM
Data: 30/03/2022 15:36:27-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dra. IARA BARROS VALENTIM, IFAL
Examinador Externo



Documento assinado digitalmente
Antonio Euzebio Goulart Santana
Data: 30/03/2022 18:11:14-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. ANTONIO EUZEBIO GOULART SANTANA, UFAL
Examinador Interno



Documento assinado digitalmente
JADRIANE DE ALMEIDA XAVIER DOS SANTOS
Data: 29/03/2022 10:29:36-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dra. JADRIANE DE ALMEIDA XAVIER DOS SANTOS,
UFAL
Examinadora Interna



Documento assinado digitalmente
Edeildo Ferreira da Silva Junior
Data: 29/03/2022 12:58:47-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. EDEILDO FERREIRA DA SILVA JR., UFAL
Examinador Interno



Documento assinado digitalmente
MARILIA OLIVEIRA FONSECA GOULART
Data: 28/03/2022 19:44:39-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dra. MARILIA OLIVEIRA FONSECA GOULART,
UFAL
Presidente

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar comigo em todos os momentos, por guiar os meus passos, por todas as oportunidades concedidas, por colocar pessoas ao meu lado para ajudar-me durante todo o período acadêmico, por ter me dotado de capacidades e habilidades necessárias para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Alagoas, pela estrutura física, corpo docente, administrativo e discentes que contribuíram para minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e FAPEAL pelo auxílio financeiro para manutenção do laboratório em que desenvolvi meu projeto (Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo – LEEO). Ao Department of Foreign Affairs, Trade and Development (DFATD) por todo auxílio financeiro necessário para a realização do intercâmbio realizado na Dalhousie University, Canadá.

A professora Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart, por ter incentivado e orientado este projeto, o que contribuiu de forma significativa para minha formação acadêmica e profissional, principalmente, por mostrar as possíveis saídas, em momentos complicados. Agradeço ainda, por todo apoio durante o período do intercâmbio. Sou imensamente grata por todos os esforços, apoio, ensinamentos e conselhos.

A professora Dra Jadriane de Almeida Xavier, por ter co-orientado esse trabalho, pelo apoio nos experimentos, pelas sugestões que melhoraram a apresentação dos dados deste trabalho e por todas as conversas que deixaram a jornada mais leve.

Ao professor H.P. Vasantha Rupasinghe da Dalhousie University Agricultural Campus por ter me orientado durante o intercâmbio do Emerging Leaders in the America Program (ELAP).

A todos do LEEO do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da UFAL, que direta ou indiretamente tornaram possível a concretização desta dissertação com alguma leveza. Não poderia deixar de agradecer aos alunos de iniciação científica Felipe Cabral, Ana Beatriz, Lucas Rocha e Tauane Rocha pelo apoio e ajuda durante o período do mestrado.

À Cindy Yu pela amizade, dedicação em ensinar-me os protocolos dos testes antidiabéticos e pelo apoio durante os períodos de “troubleshooting”.

Ao Dr. José Merlin por ter realizado juntamente comigo os ensaios de viabilidade celular e espécies reativas de oxigênio intracelular. Quero agradecer imensamente a todos do

laboratório, em especial, Madu, Tharindu, Wasitha, Olodaopo e Niluni, por toda orientação, ajuda, ensinamentos e companheirismo durante todo o intercâmbio.

A todo corpo docente, técnico e serviços gerais da UFAL por ter contribuído para a minha formação acadêmica incluindo graduação e mestrado.

A todos os membros da banca, que se dispuseram seu tempo para ler e contribuir para com esta dissertação. Meus sinceros agradecimentos a vocês: prof^a. Iara Valentim, prof. Euzébio Goulart, prof. Edeído Ferreira.

Á toda a minha família, em especial aos meus pais, Francisco e Ahilud, pelos ensinamentos de vida, exemplo de fé e coragem, e amor incondicional. Agradeço também aos meus irmãos Acsa, Adriano e Adina, pelo carinho, sustentáculo.

E por último, nem por isso menos importante, agradeço ao meu incrível esposo, Filipe, pelo amor, compreensão e apoio. Com certeza não teria chegado até aqui sem ele. Quantas vezes foi privado da minha atenção enquanto me dedicava às aulas, trabalhos e atividades do mestrado, incluindo esta dissertação. Com certeza, essa formação não é apenas minha, mas dele também, pois, em todo momento ele esteve comigo.

Todos ao meu redor são um reflexo do amor de Deus em minha vida.

Gratidão a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“Enquanto o problema não for completamente compreendido, a solução será limitada e insatisfatória.”

Autora

RESUMO

Este trabalho investigou as atividades antioxidante, antidiabética, antiglicante e citotóxica *in vitro* de extratos etanólicos de sementes de *Passiflora edulis* de Alagoas (EPED1), *P. edulis* da Bahia (EPED2) e *P. cincinnata* (EPCIN), um subproduto da indústria de sucos, juntamente com um de seus constituintes químicos, o piceatanol (PIC), que foi caracterizado por CLAE-DAD-MS/MS. Os valores de IC₅₀ dos extratos e PIC para os ensaios de sequestro de DPPH[•], HOCl e O₂^{•-} evidenciaram o potencial antioxidante de todos os extratos e PIC quando comparados à quercetina (QCT). Dentre todos os extratos, EPED1 exibiu a maior atividade para α -amilase (IC₅₀ de 32,1 $\pm$ 2,7 μ g/mL) e inibição da enzima recombinante humana DPP-4 (IC₅₀ de 71,1 $\pm$ 2,6 μ g/mL), os controles positivos foram acarbose (ACB, 0,40 $\pm$ 0,05 μ g/mL) e sitagliptina (STG, 0,005 $\pm$ 0,001 μ g/mL), respectivamente. PIC se destacou no ensaio de inibição da α -glicosidase com IC₅₀ de 20,4 $\pm$ 7,6 μ g/mL, em relação ao controle positivo, ACB (251,6 $\pm$ 4,5 μ g/mL). Os extratos e PIC foram capazes de inibir a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), de maneira dose-dependente, evidenciado pelo método de glicação de albumina sérica bovina (BSA) por açúcares redutores ou metilglioxal (MGO). Para 1 h de incubação de MGO com EPED1, EPED2, EPCIN, PIC e aminoguanidina (AMG) os valores de % MGO remanescente foram de 78,1%, 71,4%, 52,1%, 24,9% e 0,4%, respectivamente. Além disso, a formação de fibrilas β -amilóides diminuiu à medida que a concentração da amostra aumentou, atingindo 100% de inibição, em concentrações maiores que 300 μ g/mL, exceto para EPCIN cuja inibição não foi detectada nas concentrações de até 400 μ g/mL. Isso sugere que EPED1, EPED2 e PIC podem prevenir a glicação. O ensaio de viabilidade celular mostrou que EPED1 não teve efeito citotóxico em células de fígado de camundongo alfa (AML-12) e células de epitélio brônquico normal (BEAS-2B) até 50 e 100 μ g/mL, respectivamente. No entanto, concentrações menores de extrato (10 μ g/mL) foram citotóxicas para células epiteliais mamárias não malignas (MCF-10A). Verificou-se que EPED1, EPED2, EPCIN e PIC a 50 e 100 μ g/mL são capazes de proteger as células BEAS-2B do estresse oxidativo causado pelo carcinógeno NNKOAc a 100 μ M. Esta investigação permitiu obter algumas evidências *in vitro* do uso potencial das sementes de *P. edulis*, como um complemento para o tratamento de diabetes, embora ainda sejam necessários experimentos adicionais.

Palavras-chaves: Maracujá. Piceatanol. Sementes. Diabetes *mellitus* tipo 2. Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

This work investigated the *in vitro* antioxidant, antidiabetic, and antiglycation activities of ethanolic extract of seeds of Brazilian *Passiflora edulis* from Alagoas (EPED1), *P. edulis* from Bahia (EPED2), and *P. cincinnata* (EPCIN), a major by-product of the juice industry, along with one of its chemical constituent, piceatannol (PIC), which was characterized by HPLC-DAD-MS/MS. The extracts IC₅₀ values for DPPH[•], HOCl, and O₂^{•-} scavenging assays showed an antioxidant potential of all extracts and PIC when compared to quercetin (QCT). Among all extracts, EPED1 exhibited the highest activity for α -amylase (IC₅₀ of 32.1 $\pm$ 2.7 μ g/mL) and DPP-4 human recombinant enzyme inhibition (IC₅₀ of 71.1 $\pm$ 2.6 μ g/mL), positive controls were acarbose (ACB, 0.40 $\pm$ 0.05 μ g/mL) and sitagliptin (STG, 0.005 $\pm$ 0.001 μ g/mL), respectively. PIC stood up for α -glucosidase inhibition with IC₅₀ of 20.4 $\pm$ 7.6 μ g/mL, the positive control, ACB had 251,6 $\pm$ 4.5 μ g/mL. The extracts and PIC inhibited the formation of advanced glycation end-products (AGE) in a dose-dependent manner through the method of glycation of bovine serum albumin (BSA) by reducing sugars or methylglyoxal (MGO). For 1 h of incubation of MGO with EPED1, EPED2, EPCIN, PIC, and aminoguanidine (AMG) the remaining % MGO values were 78.1%, 71.4%, 52.1%, 24.9% and 0.4%, respectively. Additionally, the formation of β -amyloid fibrils decreased as sample concentration increased achieving 100% of inhibition at a concentration higher than at least 300 μ g/mL, except for EPCIN whose inhibition was not detected at concentrations up to 400 μ g/mL. This suggests that EPED1, EPED2, and PIC may prevent glycation. Cell viability assay showed that EPED1 had no cytotoxic effect on alpha mouse liver (AML-12) and on the normal bronchial epithelium (BEAS-2B) cells up to 50 and 100 μ g/mL, respectively. However, even, at lower concentrations (10 μ g/mL), the extracts were cytotoxic to non-malignant breast epithelial cells (MCF-10A). EPED1, EPED2, EPCIN, and PIC were found to be capable of protecting BEAS-2B cells from the oxidative stress caused by the carcinogen NNKOAc at 100 μ M. This investigation collected some *in vitro* evidence for the potential use of *P. edulis* seeds as a complementary to the treatment of diabetes and its complications, although more research is still needed.

Keywords: Passion fruit, Piceatannol, Seeds, Type 2 diabetes *mellitus*, Agroindustry residues.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de alguns compostos isolados a partir de extratos etanólicos de sementes de maracujá.	24
Figura 2 – Diagrama simplificado dos orbitais moleculares das principais espécies reativas do oxigênio: oxigênio no estado fundamental ou tripleto (O_2), oxigênio singleto ($1O_2^*$), radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), íon peróxido (O_2^{2-}) e radical hidroxila ($HO^{\cdot}$).	26
Figura 3 – Produção e desintoxicação das espécies reativas do oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) mais comuns.	28
Figura 4 – Efeitos causados pelo ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) às biomoléculas (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) usadas como biomarcadores do estresse oxidativo.....	29
Figura 5 – Reações envolvidas na peroxidação lipídica e formação dos biomarcadores do estresse oxidativo: malonaldeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE).	31
Figura 6 – Modificações estruturais de proteínas contendo grupos tióis por EROs e HOCl. ..	32
Figura 7 – Diferentes vias de formação de AGEs e ALEs.	35
Figura 8 – Mecanismo de reação do estágio inicial da reação de Maillard.....	36
Figura 9 – Rotas envolvidas no estágio intermediário da glicação: enolização 1,2 e em meio ácido e enolização 2,3 em meio básico.....	37
Figura 10 – Efeitos biológicos causados por AGEs.	38
Figura 11 – Esquema ilustrativo dos locais de inibição de potenciais agentes antiglicantes . .	39
Figura 12 – Disfunções causadas pela hiperglicemia e as classes dos compostos antidiabéticos.	43
Figura 13 – Estrutura química dos compostos ativos presentes em medicamentos antidiabéticos aprovados pela Food Drug Administration (FDA).....	44
Figura 14 - Exemplos de compostos isolados de produtos naturais e um de seus mecanismos de ação.	45
Figura 15 - Reação de redução do radical DPPH $^{\cdot}$ por um antioxidante representado por RH.	49
Figura 16 - Representação esquemática da oxidação da DHR pelo ácido hipocloroso, o qual foi gerado a partir do NaOCl.	50
Figura 17 - Representação da geração de radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelo sistema NADH/PMS, seguida da redução do NBT a formazan.	51
Figura 18 - Reação de formação do produto de derivatização de 2-metilquinoxalina (2-MQ) do MGO com <i>orto</i> -fenilenodiamina (OPD).	54

Figura 19 – Mecanismo de ação do corante DCFA-DA para detecção de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs).	58
Figura 20 - Estrutura molecular dos compostos observados na análise por LC-MS no modo de ionização negativo.	62
Figura 21 - Estrutura molecular dos compostos observados na análise por LC-MS no modo de ionização positivo.	62
Figura 22 - Atividade antiglicante do extrato etanólico de sementes de maracujá e compostos de referência.....	69
Figura 24 - Efeito dose-dependente do extrato etanólico de sementes de maracujá na viabilidade de células epiteliais brônquicas humanas normais (BEAS-2B), células normais de fígado de camundongo alfa (AML-12) e células epiteliais mamárias não malignas (MCF-10A) após 24 h de incubação.	74
Figura 25 - A quantidade relativa de EROs avaliada em células epiteliais brônquicas humanas normais (BEAS-2B), células normais de fígado de camundongo (AML-12) e células epiteliais mamárias não malignas (MCF-10A) após exposição ao carcinógeno sozinho ou com pré-tratamento de extrato etanólico de sementes de maracujá e composto de referência.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resíduos de frutas, principais compostos bioativos identificados e respectivas atividades biológicas.....	20
Tabela 2 - Rendimento das extrações de sementes de maracujá secas e moídas (12 g) utilizando hexano e etanol em aparelho de Soxhlet.....	60
Tabela 3 - Compostos observados na análise por LC-MS no modo de ionização negativo.....	61
Tabela 4 - Compostos observados na análise por LC-MS no modo de ionização positivo.....	61
Tabela 5 - Conteúdo de fenóis totais (CFT) e atividade antioxidante do extrato etanólico de sementes de maracujá e compostos padrões.	64
Tabela 6 - Atividade antidiabética <i>in vitro</i> de extratos etanólicos de sementes de maracujá. ..	66
Tabela 7 - Dados cromatográficos referentes a determinação da captura de MGO por meio da derivatização com OPD para os sistemas avaliados.	71
Tabela 8 - Porcentagem de inibição de fibrilas amiloides em albumina do soro bovino (BSA) submetida a glicação com frutose e glicose (Fru+Gli) ou metilglioxal (MGO).	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Maracujá	17
2.2	Estratégias Para o Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais	18
2.2.2	Composição química e propriedades do maracujá	22
2.3	A Formação de Espécies Reativas	26
2.4	Danos Oxidativos a Biomoléculas	29
2.4.1	Lipídios	30
2.4.2	Proteínas	31
2.5	Reação de Maillard e Glicação de Proteínas	33
2.5.1	Mecanismo de inibição da formação de AGEs	38
2.5.2	Inibidores sintéticos	39
2.5.3	Inibidores naturais	41
2.6	Diabetes mellitus	41
3	OBJETIVOS	46
3.1	Geral:	46
3.2	Específicos:	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	Produtos Químicos	47
4.2	Obtenção das Amostras	47
4.3	Preparo dos Extratos Etanólicos das Sementes de Maracujá	48
4.4	Atividade Antioxidante	48
4.4.1	Determinação do conteúdo de fenóis totais	48
4.4.2	Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•	49
4.4.3	Capacidade de sequestro do ácido hipocloroso (HOCl)	50

4.4.4	Capacidade de sequestro do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	51
4.5	Atividade Antiglicante	52
4.5.1	Atividade antiglicante pelo sistema BSA/frutose+glicose	52
4.5.2	Atividade antiglicante pelo sistema BSA/MGO.....	53
4.5.3	Avaliação da capacidade de captura de MGO através de derivatização com <i>orto</i> -fenilenodiamina (OPD).....	53
4.5.4	Determinação do estado de fibrilação de proteínas glicadas usando Tioflavina T	54
4.6	Caracterização Química dos Compostos por CLAE-DAD	54
4.7	Atividade Antidiabética <i>in vitro</i>	55
4.7.1	Ensaio de inibição de α -amilase	55
4.7.2	Ensaio de inibição de α -glicosidase.....	56
4.7.3	Ensaio de inibição da enzima dipeptidil dipeptidase humana (DPP-4).....	56
4.8	Culturas Celulares e Ensaio de Viabilidade Celular	57
4.9	Medição do Nível de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) Intracelular	58
4.10	Análise Estatística	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	Rendimento dos Extratos	60
5.2	Caracterização Química do Extrato Etanólico de Sementes de Maracujá <i>P. edulis</i> Coletado em Alagoas	60
5.3	Atividade Antioxidante	64
5.4	Atividade Antidiabética	65
5.5	Potencial Antiglicante	68
5.5.1	Inibição do estágio inicial e intermediário da glicação	68
5.5.2	Captura de MGO por derivatização com OPD	70
5.5.3	Efeito sob a formação de fibrilas amiloides <i>in vitro</i>	71
5.6	Viabilidade Celular Pelo Método de MTT	72
5.7	Deteção de EROs Total Intracelular	75

5.8	CONCLUSÃO.....	78
5.9	PERSPECTIVAS.....	79
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* (família *Passifloraceae*) possui mais de 500 espécies, dentre as quais, *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Degenerer (maracujá amarelo ou azedo) e *P. alata* (maracujá doce) são as duas principais espécies de importância econômica (FRANCISCHINI *et al.*, 2020). O Brasil é atualmente o maior produtor e consumidor de *P. edulis* no mundo, com 600.000 toneladas de produção em 2019 (IBGE, 2020^a; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Várias propriedades biológicas do maracujá, como atividades antifúngica (PELEGRINI *et al.*, 2006), antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, ansiolítica e anti-hipertensiva, foram investigadas *in vitro* e *in vivo* (KARASAWA; MOHAN, 2018). No Brasil, *P. edulis*, também conhecido como “maracujá”, tem sido amplamente utilizado na medicina popular como agente ansiolítico, sedativo, diurético e analgésico (KUETE; TAIWE, 2017).

Um dos principais compostos bioativos das sementes de *P. edulis* é o piceatanol (PIC, 3,3',4',5-*trans*-tetra-hidroxi-estilbeno), um análogo do resveratrol (HE *et al.*, 2020). Embora os efeitos promotores da saúde do PIC não tenham sido estudados extensivamente em comparação ao resveratrol (KRAMBECK *et al.*, 2020), o PIC demonstrou possuir efeitos preventivos em relação às doenças cardiovasculares, como anticancerígeno (SONG *et al.*, 2015), anti-inflamatório (KERSHAW; KIM, 2017), fotoprotetor (NAGAPAN *et al.*, 2018), provocando melhora da hidratação da pele (MARUKI-UCHIDA *et al.*, 2018) e atividades antidiabéticas (SURH; NA, 2016).

A diabetes é um dos maiores problemas de saúde em todo o mundo, principalmente devido ao aumento da prevalência, complicações irreversíveis e alta carga econômica (GREGG *et al.*, 2021). Tais complicações podem ser divididas em microvasculares (nefropatia diabética, neuropatia e retinopatia) e macrovasculares (doença arterial coronariana, doença arterial periférica e acidente vascular cerebral) (FOWLER, 2008).

A Federação Internacional de Diabetes afirmou que 463 milhões de pessoas – 9,3% da população mundial – foram afetadas com diabetes em 2019 (SAEEDI *et al.*, 2019). Mais de 90% dos casos de diabetes são diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2), um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia crônica devido à produção insuficiente de insulina pelo pâncreas ou resistência à insulina (GIACCO; BROWNLEE, 2010). A presente terapia inclui fármacos que atuam na redução da digestão ou absorção intestinal de carboidratos, estimulação da secreção de insulina, melhora da sensibilidade à insulina e homeostase da glicose. No entanto, o uso contínuo de alguns medicamentos orais aprovados pela FDA é

acompanhado por efeitos colaterais. Por exemplo, a acarbose (ACB) causa dor abdominal ou estomacal, flatulência, diarreia, inchaço e cólicas (MARÍN-PEÑALVER *et al.*, 2016). Como tal, há uma necessidade contínua de produtos de saúde seguros que possam ser usados como terapias alternativas e/ou complementares na prevenção e controle da DMT2.

A administração diária de PIC causou uma diminuição nos níveis de glicose em modelos celulares e animais. O PIC reduziu a concentração de glicose no sangue em jejum tanto em camundongos db/db quanto em camundongos C57BL/6J alimentados com dieta super rica em gordura, o equivalente a 32 % de gordura bruta (UCHIDA-MARUKI *et al.*, 2015). PIC promoveu captação de glicose na ausência de insulina em miotubos cultivados; ativação aprimorada da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) para superar a resistência à insulina (MINAKAWA; MIURA; YAGASAKI, 2012). Ainda, o PIC baixou o nível de glicose no sangue e melhorou a tolerância à glicose em camundongos diabéticos (ZHAO *et al.*, 2020), mostrando, portanto, potencial terapêutico para a prevenção e melhora dos sintomas do diabetes.

A hiperglicemia, como consequência inevitável do aumento da resistência à insulina, leva à glicação de proteínas por grupamentos amino de carboidratos e consequentemente à formação de produtos de glicação avançada (AGEs) (TORRES *et al.*, 2018). Os AGEs, que se acumulam ao longo de um período de tempo e não são frequentemente desintoxicados, têm sido associados a doenças neurodegenerativas à base de amiloide (KONG *et al.*, 2020), estabilizando agregados de proteínas (ZAMAN *et al.*, 2019). Além disso, a interação dos AGEs com os receptores AGE (RAGE) causa processos inflamatórios e estresse oxidativo nas células. Como o RAGE não é específico, ele também pode interagir com outros ligantes como o peptídeo β -amiloide ($A\beta$), formando aglomerados, que levam ao aumento da inflamação, estresse oxidativo, disfunção neuronal e, consequentemente, agravamento dos sintomas (TORRES *et al.*, 2018).

As sementes de *P. edulis* vêm sendo objeto de estudo em nosso grupo há mais de 15 anos, e os resultados promissores obtidos até o momento nos ensinam a continuar as pesquisas com esta espécie, acrescentando a espécie silvestre, *P. cincinnata* e investigando outras atividades biológicas. A partir dos resultados da pesquisa foram defendidas uma dissertação de mestrado, intitulada “Capacidade antioxidante de farinhas de resíduos de frutas tropicais”, uma tese de doutorado intitulada “Estresse carbonílico: avaliação in vitro de efeitos pró- e antiglicantes de adoçantes não nutritivos e de extratos vegetais”; depositada uma patente: número BR 10 2020 016496 1, intitulada “Potencial antiglicante, antioxidante e antiviral das sementes de maracujá: resíduos da agroindústria para a saúde”; apresentados em alguns

congressos nacionais e internacionais e publicados na forma de artigos na Food Chemistry (OLIVEIRA *et al.*, 2009) e no Journal of the Brazilian Chemical Society, no número especial de sustentabilidade (XAVIER *et al.*, 2022).

Neste contexto, o presente estudo investigou as atividades *in vitro* de extratos preparados a partir de sementes de *P. edulis* e, de um de seus constituintes químicos principais, o PIC, na perspectiva de possível aplicação como nutracêutico natural, para o manejo de doenças crônicas, incluindo DMT2. Para tanto, a capacidade antioxidante, a atividade antidiabética e antiglicante *in vitro* dos mesmos, foram investigadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Maracujá

O maracujazeiro é uma planta que cresce extensivamente em regiões de clima tropical e sub-tropical, tais como América Central e do Sul, sendo cultivada majoritariamente pelo Brasil, Colômbia, Peru, Equador, Bolívia, Venezuela, África do Sul e Austrália (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016).

A família do maracujazeiro, *Passifloraceae*, apresenta uma ampla diversidade genética sendo formada por 23 gêneros e 600 espécies. O maior percentual de espécies faz parte do gênero *Passiflora*, o que equivale a cerca de 67%. Dentre o total de espécies, 150 são nativas do Brasil (VIUDA-MARTOS; PÉREZ-ALVAREZ; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2020).

Os frutos são, tipicamente, ovóides cujo diâmetro pode variar de 4 a 10 cm. As cascas podem ser de cor roxa, verde ou laranja, dependendo da espécie e grau de maturação. Uma das características presentes em todas as espécies de *Passifloraceae* é a grande quantidade de sementes, as quais são pretas em forma de cunha envoltas por uma polpa gelatinosa amarela ou transparente, de aroma intenso e sabor ácido ou doce (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016; VIUDA-MARTOS; PÉREZ-ALVAREZ; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2020).

O Brasil é o principal produtor e consumidor de maracujá do mundo, perfazendo 65% da produção mundial (KHUWIJITJARU; KLINCHONGKON, 2020). O maracujá azedo ou amarelo é o mais cultivado e comercializado no país, devido à qualidade de seus frutos e do maior rendimento industrial (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016). Outras espécies, como *P. setacea*, *P. nítida* e *P. cincinnata* e híbridos de maracujá têm sido pesquisadas pela Embrapa afim de diversificar a alimentação e obter outros usos para o maracujá (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016).

De acordo com o IBGE, no ano de 2020, a produção nacional foi de 690.364 toneladas em uma área de 46.436 hectares, atingindo um rendimento médio de 14.867 kg por hectare. Neste mesmo ano, o valor do maracujá cultivado no Brasil foi de aproximadamente 1,37 bilhão de reais, um aumento em relação ao ano anterior, quando a produção foi registrada em 1,18 bilhão de reais (IBGE, 2020b).

Todas as regiões do país cultivam o maracujá, mas a região nordeste tem liderado a produção brasileira nos últimos anos, com 491.326 toneladas em uma área de 33.802 hectares, o que equivale a cerca de 71% da produção nacional, em 2020. Desta produção, o estado do

Ceará ficou em primeiro lugar, sendo responsável por aproximadamente 29%, e Alagoas em sétimo lugar, produzindo cerca de 3% (14.446 kg/ha) (IBGE, 2020b).

Apesar de existirem mais de 150 espécies nativas, apenas duas espécies de *Passiflora* apresentam importância econômica e social para a fruticultura brasileira: a espécie *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Degenerer, popularmente conhecida como maracujá-azedo ou amarelo, e a *P. alata* Curtis, chamada de maracujá-doce. Em condições ideais, o maracujá pode ser colhido o ano inteiro após 6 a 9 meses do plantio, o que possibilita ao produtor ter uma renda diária. Além disso, o seu cultivo apresenta alta rentabilidade e produtividade, variando de 14 a 60 toneladas por hectare dependendo principalmente dos cultivares, da tecnologia de sistema de produção adotada e da capacitação do produtor (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016).

Faleiro e Junqueira (2016) reportaram que a cultura do maracujá é uma excelente opção de geração de renda e empregos para micro, pequenos, médios e grandes fruticultores. Atualmente, o maracujá gera mais de 500 mil empregos em todo o Brasil, predominantemente, para pequenos produtores e agricultura familiar, gerando de 3 a 4 empregos diretos por hectare e ocupando 7 a 8 pessoas, em todos os setores da cadeia produtiva.

Além disso, a planta em si, possui ampla versatilidade. Praticamente, todas as partes da planta têm valor comercial, incluindo a polpa, as sementes, a casca, as flores, as folhas e os ramos, no entanto, apenas a polpa da fruta é usada em escala industrial (FALEIRO *et al.*, 2017; ZERAIK *et al.*, 2010). O cultivo do maracujá é destinado, em sua grande parte, para o consumo do fruto *in natura* (10%) ou para o processamento industrial (90%) (FREITAS *et al.*, 2020), sendo fonte de matéria prima principalmente para a indústria alimentícia para produção de polpas congeladas e bebidas (KHUWIJITJARU; KLINCHONGKON, 2020). A agroindústria utiliza apenas um quarto da massa do fruto. O restante do fruto, o qual é constituído por cascas, sementes e bagaço, é responsável pela geração de 75% de resíduos (FRANCISCHINI *et al.*, 2020).

2.2 Estratégias Para o Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais

Aproximadamente um terço dos alimentos produzidos no mundo são perdidos ou descartados. O setor hortifrutigranjeiro tem uma perda de 45% de sua produção total em alguma etapa da cadeia alimentícia, da colheita ao consumo, causando um grande impacto econômico, ambiental e social (FORBES; QUESTED; O'CONNOR, 2021). Por isso, há necessidade urgente em encontrar novas formas ou tecnologias e soluções que sejam

ambientalmente corretas para utilizar resíduos agroindustriais como matéria-prima no desenvolvimento de produtos de maior valor agregado (FIDELIS *et al.*, 2019).

Uma das alternativas para transformar resíduos agroindustriais em novos produtos funcionais para a saúde humana é por meio da extração e/ou isolamento de seus compostos bioativos. Para isto, é necessário um tratamento prévio na amostra, incluindo secagem, centrifugação e filtração. Inúmeras estratégias têm sido aplicadas a fim de extrair tais compostos de forma sustentável, econômica e rápida. Os métodos mais tradicionais utilizados são infusão em água, maceração ou extração via Soxhlet, enquanto o uso de micro-ondas, ultrassom ou fluido supercrítico é mais recente e não convencional.

O aproveitamento de compostos bioativos presentes em subprodutos de plantas, como fonte de baixo custo para o desenvolvimento de produtos alimentícios, nutracêuticos, farmacêuticos e cosméticos, é uma alternativa sustentável e uma forma eficiente de gerenciamento de resíduos agroindustriais (FIDELIS *et al.*, 2019; VILLACÍS-CHIRIBOGA *et al.*, 2020). A Tabela 1 mostra algumas atividades biológicas de resíduos de frutas tropicais da biodiversidade brasileira.

Além da polpa, as demais partes do maracujá podem ser reaproveitadas pela indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. A casca, apesar de rica em fibras solúveis como pectina e ser uma fonte alimentar de bom valor nutricional, vem sendo descartada como lixo ou usada em ração animal ou como adubo (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016; ZERAIK *et al.*, 2010). As flores, de uma beleza marcante são cultivadas para uso ornamental, ou pela indústria de cosméticos, devido ao seu aroma. A folha da *Passiflora incarnata* L. é a parte da planta da qual a indústria farmacêutica extrai os princípios ativos da Passiflorine® PI, medicamento conhecido por sua ação calmante e relaxante (MARLENE *et al.*, 2005).

Também são extraídos flavonoides que são empregados na fabricação de cremes, em especial, de rejuvenescedores (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016). A semente do maracujá é utilizada pelos consumidores para enfeitar alguns pratos, como mousses, enquanto a indústria alimentícia e cosmética produz o óleo e farelo desengordurado (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016).

Tabela 1 – Resíduos de frutas, principais compostos bioativos identificados e respectivas atividades biológicas.

Fruto	Extrato	CFT	Compostos bioativos	Atividade	Referência
Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	Etanólico de cascas	7,83 mg EAG/g	Ácido gálico, <i>p</i> -hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido sinápico, epicatequina galato, quercetina-3-glicosídeo, diosmina, kaempferol	DPPH*, FRAP, TAC, ABTS	(SULERIA; BARROW; BUNSHEA, 2020)
Acerola (<i>Malpighia emarginata</i>)	Metanólico de cascas e polpa	94,6 ± 7,4 mg EAG /g	-	DPPH*, O ₂ ²⁻ e inibição da peroxidação lipídica	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2009)
Abacate (<i>Persea americana</i>)	Etanólico de sementes	366,79 ± 5,05 mg EAG /g	Ácido palmítico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido cafeoilquínico, ácido feruloilquínico	Atividade gastroprotetora	(ATHAYDES <i>et al.</i> , 2019)
Camu-camu (<i>Myrciaria 20nosi</i>)	Etanólico de sementes	128 mg EAG /100 g	Ácido rosmarínico, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido elágico, cianidina-3-glicosídeo, quercetina, <i>trans</i> -resveratrol	DPPH*, FRAP, Folin-Ciocalteu e antimicrobiana	(CARMO <i>et al.</i> , 2019)
Jabuticaba (<i>Plinia jaboticaba</i> e <i>Plinia cauliflora</i>)	Água:propanona (sementes)	8,65 g EAG /100 g	Ácido elágico e elagitaninos	DPPH* e capacidade de redução total	(HACKE <i>et al.</i> , 2016)
Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	Etanólico de sementes	143,79 ± 2,09 mg EAG /100 g	Ácido oleico, ácido esteárico, ácidos fenólicos, flavanoides, xantonas, derivados de galato e galotaninos	DPPH* e TEAC. Atividade antiproliferativa	(BALLESTEROS-VIVAS <i>et al.</i> , 2019)
Maracujá (<i>Passiflora sp</i>)	Methanólico de sementes	227,17 ± 10,97 mg EAG /g	Quercetina, ácido gálico, apigenina e catequina	DPPH*, FRAP, atividade quelante de metais, atividade sequestrante de radicais superóxido, atividade analgésica, atividade anti-inflamatória,	(SARAVANAN; SERGIPE; THANGARAJ, 2013)

Mamão (<i>Carica papaya</i>)	Etanólico de cascas	3,13 mg EAG /g	Ácido gálico, ácido caftárico, <i>p</i> -hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido ferúlico, epicatequina, epicatequina galato, quercetina-3-glicoronídeo, kaempferol-3-glicosídeo, quercetina, kaempferol	efeito antipirético DPPH•, FRAP, TAC, ABTS	(SULERIA; BARROW; BUNSHEA, 2020)
Seriguela (<i>Spondias purpurea</i>)	Etanólico de sementes	254,7 ± 42,1 mg EAG /g	Fenóis, taninos, catequinas, flavanonas, antraquinonas, cumarinas, triterpenoides, esteroides, ácido clorogênico, saponinas, ácido cítrico	DPPH•, ABTS, FRAP, CUPRAC, inibição da peroxidação lipídica, inibição da acetilcolinesterase	(OMENA <i>et al.</i> , 2012)
Umbu (<i>Spondias tuberosa</i>)	Etanólico de sementes	202,2 ± 6,9 mg EAG /g	Fenóis, taninos, catequinas, flavanonas, antraquinonas, cumarinas, triterpenoides, esteroides	DPPH•, ABTS, FRAP, CUPRAC, inibição da peroxidação lipídica, inibição da acetilcolinesterase	(OMENA <i>et al.</i> , 2012)

CFT, conteúdo de fenóis totais; EAG, equivalentes de ácido gálico; DPPH, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, FRAP, método de redução do ferro; TAC, capacidade antioxidante total; ABTS, capacidade de sequestro do radical orgânico ABTS (2,20-azino-bis (ácido 3-etilbenztiazoline-6-sulfônico); TEAC, capacidade antioxidante equivalente ao Trolox; CUPRAC, capacidade antioxidante por redução do cobre.

Fonte: Autora, (2022).

2.2.2 Composição química e propriedades do maracujá

O maracujá é popularmente conhecido por suas características organolépticas e propriedades biológicas associadas ao sistema nervoso central (SNC), apresentando atividade ansiolítica e sedativa. Vários extratos e compostos isolados mostraram uma ampla gama de efeitos no tratamento de inflamação, dor, insônia, hipertensão, câncer, tumor, e outras doenças (KUETE; TAIWE, 2017).

Quanto à sua composição, o maracujá contém um alto teor de fibras dietéticas, carboidratos, vitaminas e minerais. Outros nutrientes incluem lipídeos, proteínas, aminoácidos, ácidos carboxílicos, polifenóis e compostos voláteis, sendo, portanto, um fruto com elevado valor nutricional (ZERAUK *et al.*, 2010).

Além dos compostos nutricionais, o maracujá contém um grande grupo de moléculas que não apresentam valor nutricional, mas podem ter importância para a saúde humana. Essas moléculas, chamadas de compostos fenólicos, são sintetizadas durante o desenvolvimento normal da planta, assim como em resposta a diversas condições, tais como estresse, radiação UV, pragas e outros (VIUDA-MARTOS; PÉREZ-ALVAREZ; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2020).

Os compostos fenólicos possuem um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxilas; sua estrutura pode variar de uma simples molécula a complexas estruturas polimerizadas de alto peso molecular. Devido à sua estrutura, tais compostos podem neutralizar os danos causados por espécies reativas doando elétrons a radicais livres ou atuando como agentes quelantes de metais (HAMINIUK *et al.*, 2012).

As principais classes dos compostos fenólicos dietéticos são flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, ligninas e taninos. Os flavonoides são os compostos bioativos mais abundantes do reino vegetal, correspondendo a cerca de dois terços dos polifenóis dietéticos e possuem C₆-C₃-C₆ como esqueleto carbônico básico. Os flavonoides podem ainda ser subdivididos em flavanóis, flavanonas, isoflavonas, flavan-3-ols, flavonas e antocianinas (HAMINIUK *et al.*, 2012).

Os ácidos fenólicos são o segundo maior grupo de compostos e correspondem a quase um terço dos compostos fenólicos dietéticos e são subdivididos em ácidos hidroxibenzóico (C₆-C₁) e hidroxicinâmico (C₆-C₃) (HAMINIUK *et al.*, 2012).

Os estilbenos são caracterizados pelo esqueleto básico carbônico C₆-C₂-C₆. Já os taninos são um grupo de oligômeros e polímeros de poli-hidroxi-flavan-3-ol com ligações

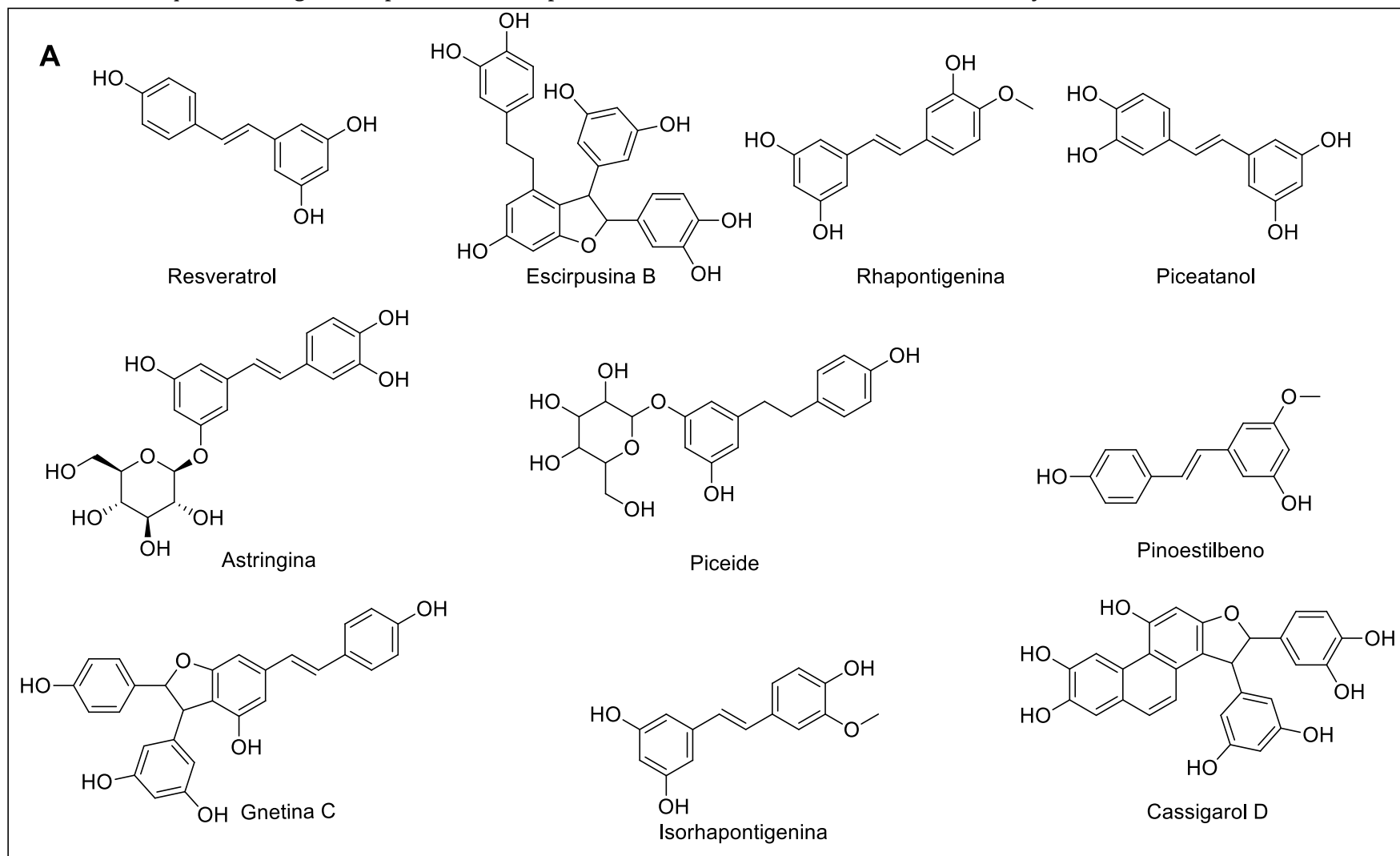
carbono-carbono entre subunidades de flavanol. São substâncias de sabor adstringente e amargo (HAMINIUK *et al.*, 2012)

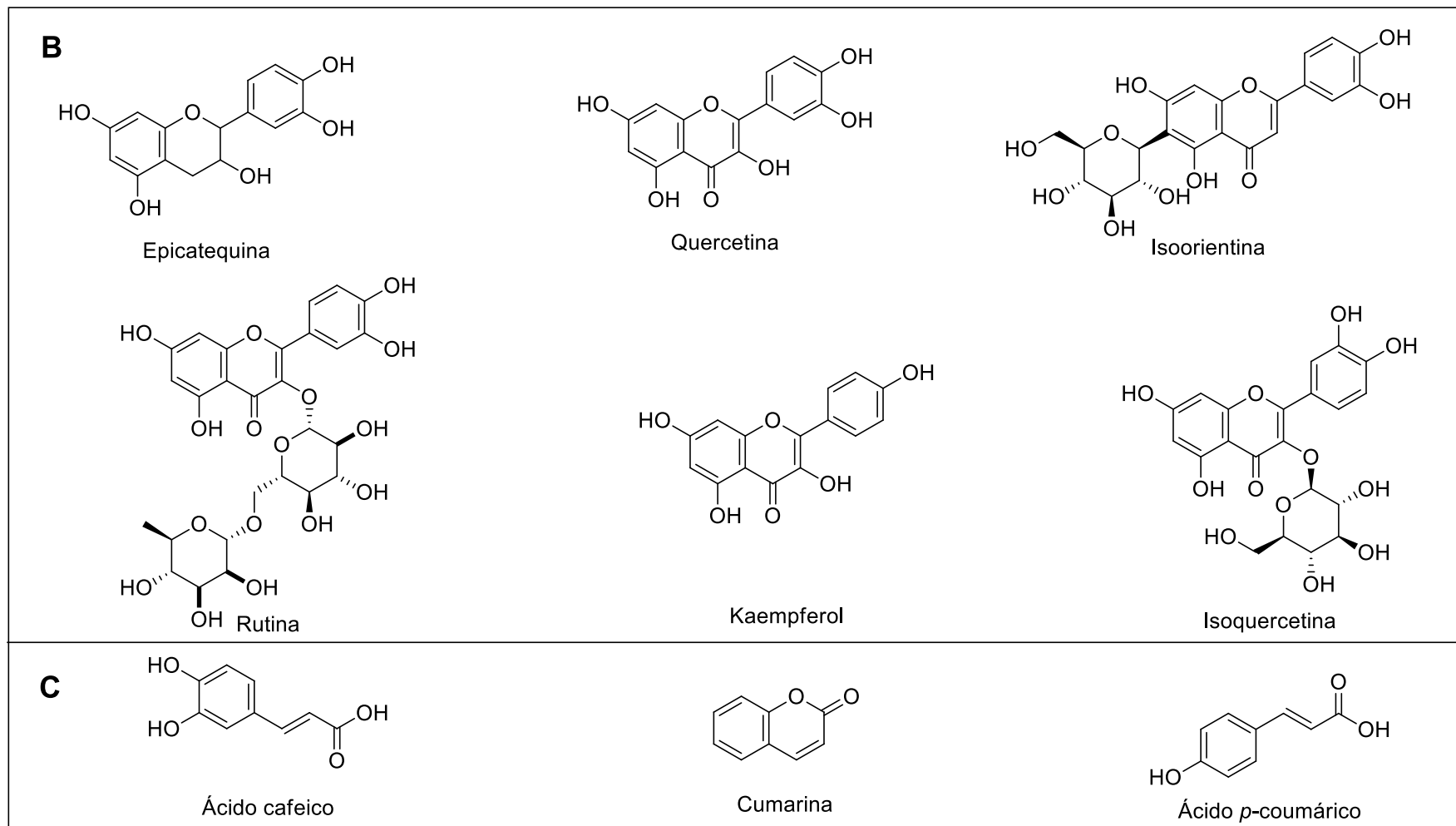
Nas espécies de *Passiflora* já foram encontrados e identificados 119 compostos em diferentes partes da espécie vegetal, sendo flavonoides (33), triterpenoides (29), carotenoides (13), alcaloides (6), sulforafanos (6), dentre outros compostos (32); sendo os três primeiros os mais abundantes (HE *et al.*, 2020). Os flavonoides identificados são principalmente do tipo C-glicosídeos, sendo a glicose o principal açúcar ligado ao anel aromático (ZERAUK *et al.*, 2010). A estrutura química de alguns compostos fenólicos (estilbenos, flavonoides e ácidos fenólicos) identificados em extratos etanólicos de sementes de maracujá encontram-se na Figura 1.

Em diversos países da América do Sul e da Ásia, *P. edulis* é usada na medicina tradicional popular como tônico, digestivo, sedativo, diurético, antidiarreico e inseticida na medicina tradicional para o tratamento de tosse, garganta seca, constipação, insônia, dismenorreia, bebês com cólicas, dores nas articulações e disenteria, e outros. Estudos bioquímicos e farmacológicos modernos confirmaram que os componentes purificados e extratos brutos de *P. edulis* mostraram uma ampla gama de bioatividades *in vitro* e *in vivo*, incluindo atividade antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-hipertensiva, hipolipidêmica, antidiabética, antidepressiva, antitumoral, ansiolítica e sedativa (HE *et al.*, 2020; NORIEGA *et al.*, 2011; VIUDA-MARTOS; PÉREZ-ALVAREZ; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2020).

Com relação as atividades biológicas relacionadas especificamente às sementes, a maioria dos estudos tem explorado o potencial do estilbeno PIC e da escirpucina B, os quais estão presentes abundantemente em diversas bagas, em cascas de uva e em vinho tinto (KERSHAW; KIM, 2017). O PIC tem sido intensamente investigado para o tratamento de câncer, apresentando atividades imunossupressora, antileucêmica e antitumorigênica em muitos tipos de linhagens celulares e modelos animais (SEYED *et al.*, 2016).

Figura 1 – Estrutura química de alguns compostos isolados a partir de extratos etanólicos de sementes de maracujá.





A) Estilbenos; B) Flavonoides; C) Ácidos fenólicos.
 Fonte: Dados extraídos de Kawakami *et al.* (2022).

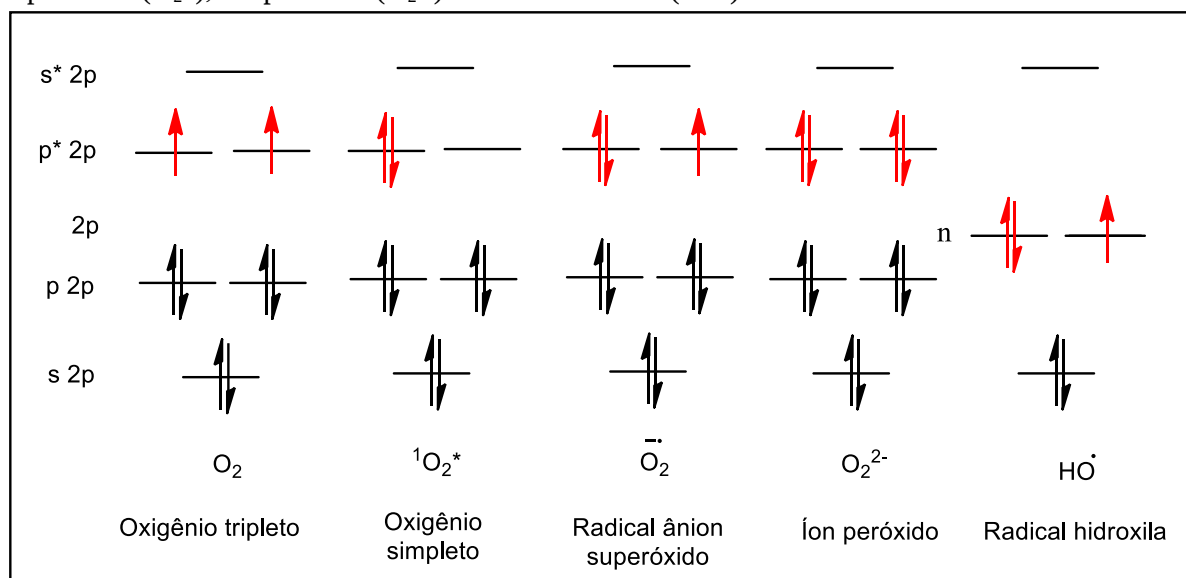
Extratos etanólicos de sementes de *P. edulis* contendo alto teor de PIC podem inibir a melanogênese e promover a produção de colágeno em células fibroblásticas (MATSUI *et al.*, 2010). Além disso, um estudo realizado em mulheres japonesas revelou que a ingestão de um extrato rico em PIC ajudou a aumentar o teor de umidade na pele (MARUKI-UCHIDA *et al.*, 2018).

2.3 A Formação de Espécies Reativas

O oxigênio molecular (O_2) surgiu na terra há mais de 2,5 bilhões de anos como resultado da fotossíntese de cianobactérias, e hoje, corresponde a 21% da composição do ar atmosférico. Esta simples molécula é crucial para a existência da vida no planeta Terra, pois participa de reações que conduzem à produção eficiente de energia para que haja metabolismo, respiração e crescimento de organismos aeróbios (CHEN *et al.*, 2018; HALLIWELL; GRUTTERIDGE, 2015).

No seu estado fundamental, o O_2 não é capaz de oxidar estruturas celulares de seres aeróbios em condições normais de temperatura e pressão. O oxigênio tripleto é um biradical, seus elétrons de fronteira ocupam orbitais moleculares π^* diferentes e possuem spins paralelos (Figura 2).

Figura 2 – Diagrama simplificado dos orbitais moleculares das principais espécies reativas do oxigênio: oxigênio no estado fundamental ou tripleto (O_2), oxigênio simpleto ($^1O_2^*$), radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), íon peróxido (O_2^{2-}) e radical hidroxila ($HO^{\cdot}$).



Fonte: Autora (2020).

Assim, para participar de reações de oxidação e redução, o O_2 deve receber um par de elétrons de átomos ou moléculas cujos os elétrons também tenham spins paralelos, porém essa condição não acontece com a maioria dos compostos orgânicos por serem diamagnéticos e possuírem spins emparelhados (CHEN *et al.*, 2018).

Mesmo não sendo capaz de reagir diretamente com organelas celulares, o oxigênio molecular pode ser altamente tóxico para células devido a facilidade com que esta espécie possui em receber elétrons e formar uma variedade de substâncias reativas e instáveis. Tais moléculas são chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) por serem moléculas derivadas do átomo oxigênio e apresentarem reatividade alta.

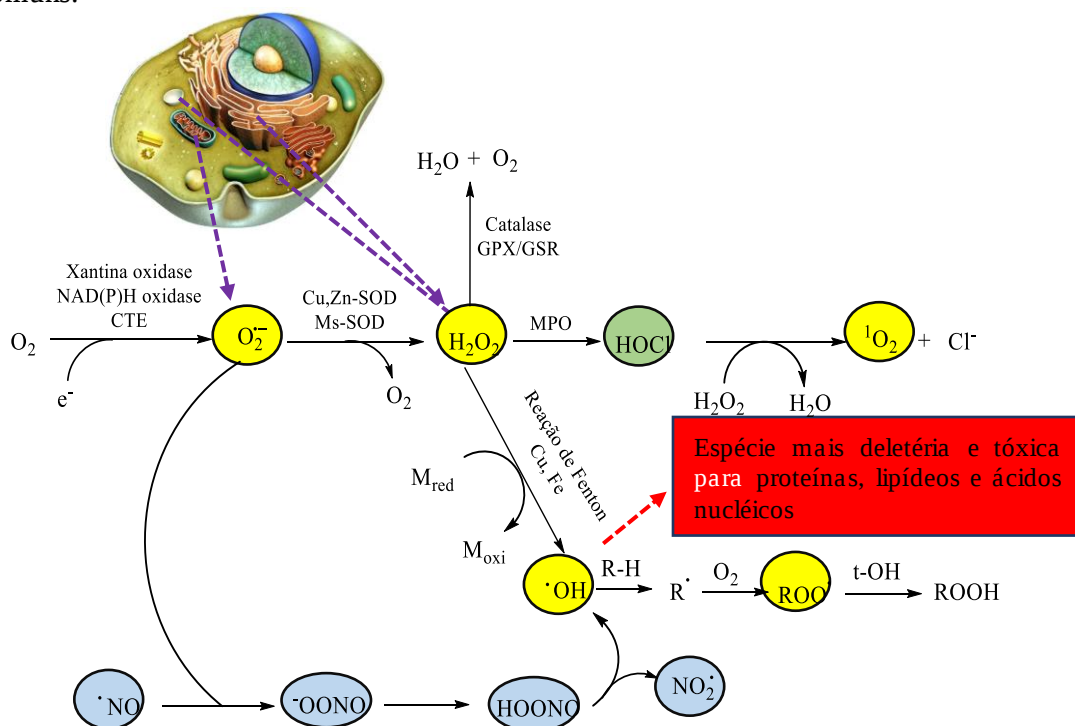
As principais EROs encontradas em organismos vivos são o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($\bullet OH$), oxigênio simpleto ($^1O_2^*$) (ver Figura 2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e ácido hipocloroso ($HOCl$), sendo as duas primeiras classificadas como radicais livres por possuírem pelo menos um elétron desemparelhado no seu último orbital, e as últimas, compostos não radicalares. Além dessas espécies, o próprio metabolismo celular produz outras espécies reativas, dentre elas podemos destacar as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), tais como o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e peroxinitrito ($ONOO^-$) e as espécies reativas de enxofre (ERSs) como o radical tiúla ($RS^{\bullet}$) (VASCONCELOS *et al.*, 2007). A Figura 3 mostra a produção endógena das principais espécies reativas.

As EROs, ERNs e ERSs são uma faca de dois gumes para os sistemas biológicos por apresentarem tanto efeitos benéficos quanto deletérios (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Em seres aeróbios, a geração de espécies reativas constitui um processo essencial e contínuo, pois atuam como mensageiros em processos de sinalização celular, incluindo apoptose, expressão genética e ativação de cascatas de sinalização celular; regulação da atividade metabólica; processos inflamatórios e síntese de substâncias biológicas (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; FORRESTER *et al.*, 2018). Todavia, estas moléculas podem causar danos a importantes componentes celulares como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, levando ao desenvolvimento e progressão de inúmeras doenças como o Alzheimer, Parkinson, câncer, aterosclerose, doenças cardiovasculares, dentre outras (KRUMOVA *et al.*, 2016; PIZZINO *et al.*, 2017).

Os danos celulares causados pelas espécies reativas advêm da sua produção excessiva. O estado de desequilíbrio entre a formação excessiva de oxidantes e produção limitada de defesa antioxidante, afetando o funcionamento normal celular, chamado de estresse oxidativo (SIES; BERNDT; JONES, 2017).

As EROs são geradas naturalmente durante os processos bioquímicos e fisiológicos ou através de fontes exógenas. Nas células, a sua formação ocorre na cadeia transportadora de elétrons (CTE) ou por meio da ação de enzimas óxido redutases e por oxidação catalisada por metais (PUROHIT; SIMEONE; LYSSIOTIS, 2019).

Figura 3 – Produção e desintoxicação das espécies reativas do oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) mais comuns.



A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CTE) e as enzimas oxidases geram radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o qual é dismutado na mitocôndria, no peroxissomo e no retículo endoplasmático por superóxido dismutases (SOD) de cobre-zinco (Cu-Zn) e manganês (Mn) para gerar peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode ser removido pela ação das enzimas catalase, glutatona-peroxidase-redutase (GPX-GSR) ou mieloperoxidase (MPO). Na presença de íons Fe^{2+} ou Cu^+ (Me_{red}), o H_2O_2 é convertido ao radical hidroxila ($\bullet OH$) através da reação de Fenton. O $\bullet OH$ inicia a oxidação de lipídios em grupos alquila ($R\bullet$), que então oxidam em radicais peróxila ($ROO\bullet$). Antioxidante (t-OH) param as reações radiculares envolvendo radicais $ROO\bullet$. (ERNs são mostradas em azul, EROs é mostrado em amarelo e EROs em verde. (Setas roxas pontilhadas indicam local de formação das espécies reativas).

Fonte: Adaptado de Purohit; Simeone; Lyssiotis (2019).

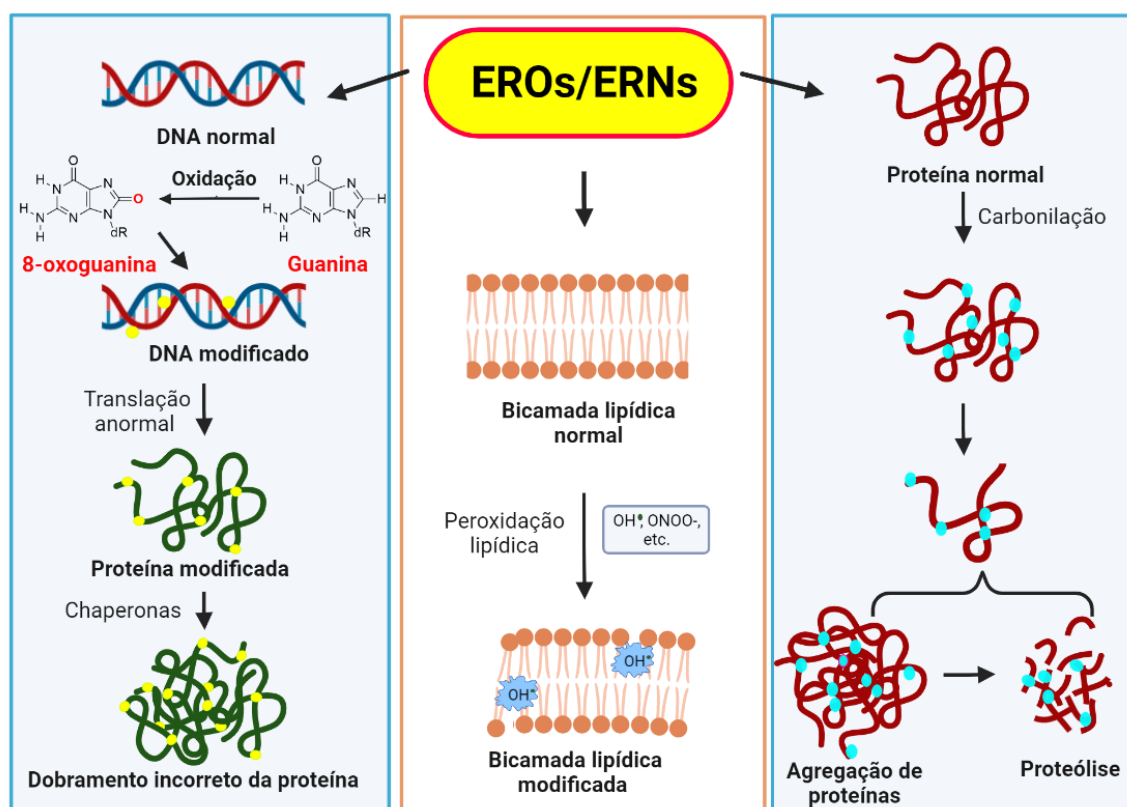
A ERO mais simples, o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), é produzido principalmente na mitocôndria no complexo I (NADH desidrogenase) e no complexo III (ubiquinona-citocromo c redutase), a partir de elétrons que escapam da cadeia transportadora de elétrons e reduzem o O_2 presente nas células. As células do sistema imunológico, tais como neutrófilos e macrófagos, possuem em suas membranas enzimas, chamadas NADPH oxidases, que geram $O_2^{\bullet -}$ em grande quantidade para destruir microrganismos invasores, sendo portanto, crucial para o sistema imune (HAYYAN; HASHIM; ALNASHEF, 2016; KRUMOVA *et al.*, 2016).

Além da produção endógena, essas espécies reativas podem ser geradas a partir de diversas fontes externas ao organismo. A radiação ionizante e luz ultravioleta, por exemplo, promovem a fissão homolítica de compostos orgânicos e água originando radicais livres. Fontes ambientais como poluentes (paraquat, diquat, aloxana, e doxorubicina), metais potencialmente tóxicos (Cd, Hg, Pb, Fe e As), certas drogas (ciclosporina, tacrolimus, gentamicina), alguns tipos de dietas (gorduras, óleos, carnes defumadas), solventes, produtos químicos, cigarros e medicamentos também contribuem para a formação de espécies reativas (KRUMOVA *et al.*, 2016; PIZZINO *et al.*, 2017).

2.4 Danos Oxidativos a Biomoléculas

Uma das principais consequências do estresse oxidativo é o ataque de espécies reativas a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos de células (Figura 4).

Figura 4 – Efeitos causados pelo ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) às biomoléculas (proteínas, lipídios e ácidos nucleicos) usadas como biomarcadores do estresse oxidativo.



Fonte: Singh *et al.* (2019).

A oxidação destas biomoléculas pode levar a patologias relacionadas com o envelhecimento, doenças crônicas, cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, diabetes e

inflamações devido às alterações na estrutura molecular e, consequentemente, perda de função das biomoléculas celulares (COLLIN, 2019).

2.4.1 Lipídios

A oxidação de lipídios, conhecida como peroxidação lipídica, constitui uma cascata de reações de degradação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) levando à formação majoritária de radicais peroxilas e hidroperóxidos de lipídio. Essa reação já vem sendo objeto de estudo desde o final do século XIX, pois tem sido associada com inúmeras doenças (SMITH, 1849), como arteriosclerose, degeneração da mácula ocular, doenças neurodegenerativas, diversos tipos de câncer e outras patologias relacionadas (RUIZ, 2003).

O processo de peroxidação lipídica acontece em três etapas (Figura 5). A primeira é chamada de iniciação, onde ocorre o ataque a um lipídio por qualquer espécie que tenha reatividade suficiente para remover um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) ligado a um carbono insaturado.

Agentes físicos e químicos são capazes de remover um átomo de hidrogênio e gerar um radical lipídico ($\text{L}^\bullet$) centralizado no átomo de carbono; dentre eles podem-se destacar os radicais hidroxilas, metais de transição (como ferro e cobre), enzimas (como lipooxigenases e Citocromo (CYP) P450), O_2 , radiação UV e altas temperaturas (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; REPETTO; SEMPRINE; BOVERIS, 2012).

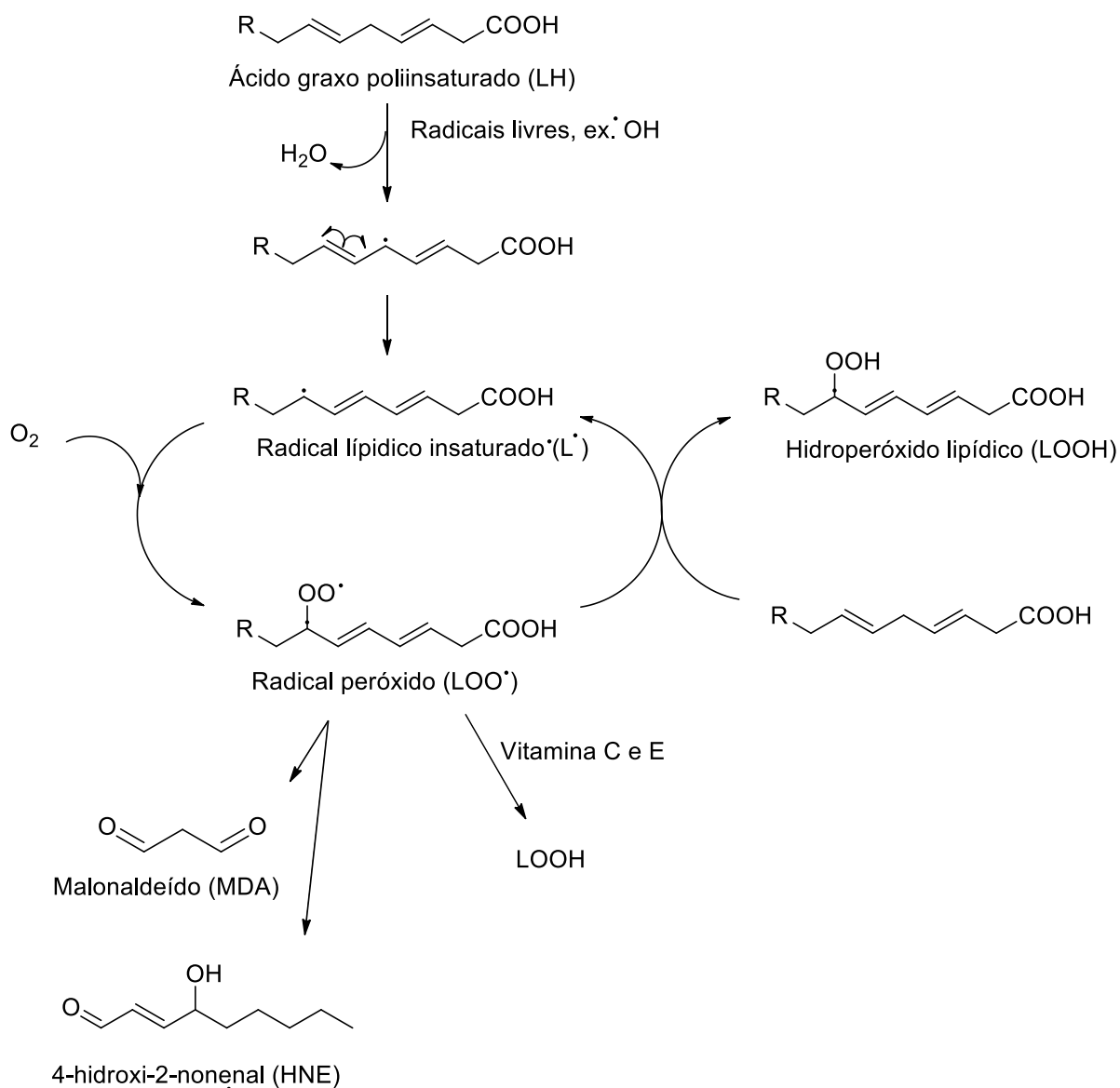
Na segunda etapa, o radical lipídico ($\text{L}^\bullet$) reage rapidamente com o oxigênio para formar radicais peroxilas ($\text{LOO}^\bullet$) que, por sua vez, é também capaz de remover um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo gerando outro radical ($\text{L}^\bullet$) e um hidroperóxido lipídico (LOOH). O radical lipídico pode reagir novamente provocando a formação contínua de novos radicais livres de forma exponencial, por isso essa etapa é conhecida como propagação.

A última etapa da peroxidação lipídica, chamada de terminação, ocorre quando compostos antioxidantes, como vitamina C e E, doam um átomo de hidrogênio para o radical ($\text{LOO}^\bullet$) ou quando dois radicais livres reagem entre si formando um composto não radicalar (REPETTO; SEMPRINE; BOVERIS, 2012).

A peroxidação lipídica ocasiona modificações nos lipídios e leva a formação de novas espécies. Radicais livres, álcoois, cetonas, alcanos, aldeídos e éteres são gerados a partir da decomposição de radicais peroxilas e hidroperóxidos. O malonaldeído (MDA) (ver Figura 5), um aldeído de cadeia curta, é um dos produtos secundários mais conhecidos da peroxidação lipídica, sendo usado como um biomarcador dos danos oxidativo em sistemas biológicos. O 4-hidroxinonenal (4-HNE) (ver Figura 5) é outro produto gerado em grandes quantidades, que

apresenta alta toxicidade, pois reage rapidamente de maneira irreversível com grupos tióis e aminos de biomoléculas (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

Figura 5 – Reações envolvidas na peroxidação lipídica e formação dos biomarcadores do estresse oxidativo: malonaldeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE).



Fonte: Adaptado de Barrera e colaboradores (2018).

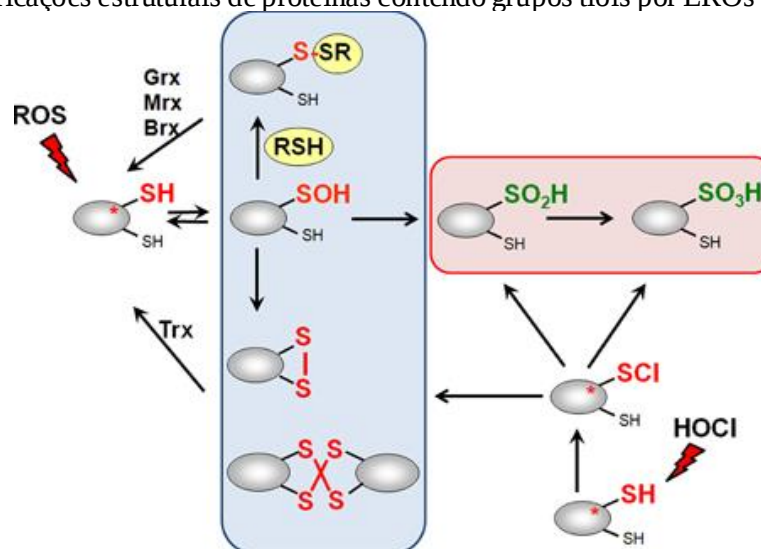
2.4.2 Proteínas

Proteínas são alvos de modificações oxidativas induzidas diretamente pelo ataque de EROs ou indiretamente por reações com subprodutos secundários do estresse oxidativo. O MDA e HNE, produtos da peroxidação lipídica, por exemplo, ligam-se covalentemente aos

resíduos de lisina, histidina e cisteína, levando a adição do grupo aldeído à proteína (HALLIWELL; GRUTTERIDGE, 2015).

As reações com EROs podem levar a modificações reversíveis e irreversíveis tanto na cadeia principal como lateral. A oxidação da cadeia principal, ocorre a partir da abstração, por $\cdot\text{OH}$, de um átomo de hidrogênio alfa de qualquer resíduo de aminoácido levando a formação de um radical centrado no carbono, o qual pode formar um derivado de proteína hidroxilada (STADTMAN, 2001). Os grupos aminos laterais de proteínas que contêm átomo de enxofre, cisteína e metionina, são os resíduos mais sensíveis a oxidação por todos os tipos de ROS. A oxidação da cisteína, como mostra a (Figura 6), leva a perda do grupo tiol ao formar ligações de dissulfeto, dissulfetos mistos e radicais tiíla. Já a oxidação da metionina leva a formação, majoritária, do sulfóxido de metionina (CELI; GABAI, 2015).

Figura 6 – Modificações estruturais de proteínas contendo grupos tióis por EROs e HOCl.



O grupo tiol (RSH) pode ser oxidado por dois elétrons a ácido sulfênico (RSOH), o qual é instável. Em condições de estresse oxidativo, o ácido sulfênico pode ainda ser oxidado à ácido sulfínico (RSO₂H) e sulfônico (RSO₃H). Alternativamente, o ácido sulfênico pode reagir com outros grupos tióis, tais como da cisteína ou glutathione, para formar ligações dissulfeto (RSSR'). Além disso, o HOCl é capaz de clorar os grupos tióis levando a formação de grupos sulfenilcloretos (RSCI), o qual pode ser oxidado na ausência de grupos tióis.

Fonte: Hillion, Antelmann (2015).

A oxidação de proteínas pode afetar de maneira irreversível a estrutura e, conseqüentemente, suas funções como receptores, catalisadores, transportadores, estrutural e outros. Proteínas oxidadas podem levar a produção de novos antígenos e provocar resposta imunológica (CELI; GABAI, 2015). Vale destacar que apesar da oxidação de proteínas contribuir para o envelhecimento normal e patologêses relacionada à idade, como doenças neurodegenerativas (STADTMAN, 2001), algumas modificações oxidativas apresentam

papéis fundamentais para a saúde e doença, em particular, a carbonilação de proteínas está envolvida em transdução de sinais (CAI; YAN, 2013).

2.5 Reação de Maillard e Glicação de Proteínas

O estudo da glicação de proteínas iniciou-se, em 1912, com o bioquímico francês Louis Camille Maillard quando buscava rotas alternativas para sintetizar peptídeos (BILLAUD; ADRIAN, 2003). Ele estava investigando um método para melhorar a síntese de dipeptídeos a partir de compostos naturalmente presentes em sistemas fisiológicos, glicina e glicose, quando descobriu, quase que por acaso, que misturas de açúcares e aminoácidos tornavam intensamente escuras e liberam dióxido de carbono ao serem submetidas ao aquecimento. Ele observou que a reação não era limitada ao aminoácido e monossacarídeo testados, mas ocorria entre outros aminoácidos, peptídeos e açúcares, porém em diferentes magnitudes (HELLWIG; HENLE, 2014).

Maillard descreveu os mecanismos das reações químicas envolvidos nesse fenômeno em sua tese de doutorado intitulada “*The effect of glycerol and sugars on the amino acids: cyclo-glycyl-glycines and polypeptides, melanoidins, and humic matters*” (O efeito do glicerol e açúcares nos aminoácidos: ciclo-glicil-glicinas e polipeptídeos, melanoidinas e matérias húmicas) (BILLAUD; ADRIAN, 2003).

Apesar de este brilhante trabalho lhe conceder o título de Doutor em Ciências, as pesquisas realizadas por Maillard foram ignoradas por aproximadamente 30 anos. Contudo, suas descobertas ganharam repercussão internacional a partir de 1938 quando começaram a relacionar as suas reações com o escurecimento não enzimático de alimentos durante o processamento térmico de alimentos (BILLAUD; ADRIAN, 2003).

Outros cientistas, posteriormente, como C. J. Lintner and Hodge descobriram que essa reação cria milhares de compostos odoríferos em alimentos que sofreram processamento térmico. Os produtos formados dependem do tempo e temperatura de cozimento, assim como, do tipo de aminoácido ou proteína e açúcar que compõem o alimento. Hoje, esse processo é uma das estratégias utilizada tanto pela indústria alimentícia como em residências para melhorar a palatabilidade dos alimentos por meio do desenvolvimento de substâncias responsáveis pela cor, aroma, textura e sabor (BILLAUD; ADRIAN, 2003; FRANCISQUINI *et al.*, 2017; SHIBAO; BASTOS, 2011). Não apenas isso, mas o aquecimento também garante que os alimentos estejam seguros microbiologicamente para o consumo, pois inativam algumas enzimas e degradam substâncias tóxicas (SHIBAO; BASTOS, 2011).

A reação de Maillard é frequentemente descrita em sistemas alimentares, mas também ocorre espontaneamente em organismos vivos, e, neste caso, é denominada glicação (SHIBAO; BASTOS, 2011). Dessa forma, de uma forma mais abrangente, a reação de Maillard/glicação consiste em uma série de reações não enzimáticas que ocorrem entre grupamentos amino e carbonilo, levando à formação de uma grande variedade de moléculas que conferem aroma e sabor aos alimentos, assim como à formação dos produtos de glicação (AGEs, do inglês *Advanced Glycation Endproducts*) e da lipoxidação (ALEs, do inglês *Advanced Lipoxidation Endproducts*) avançadas (BARBOSA *et al.*, 2016).

Apesar de ser extremamente essencial para as ciências dos alimentos, existem evidências que os produtos da reação de Maillard podem apresentar um papel deletério no organismo ao participar de processos patológicos como diabetes, doenças degenerativas, aterosclerose e doença renal (SHIBAO; BASTOS, 2011). Por esta razão o número de pesquisas relacionadas à reação de Maillard cresceu significativamente, existindo mais de 50.000 publicações científicas (HELLWIG; HENLE, 2014). Isso mostra o quão importante essa reação se tornou.

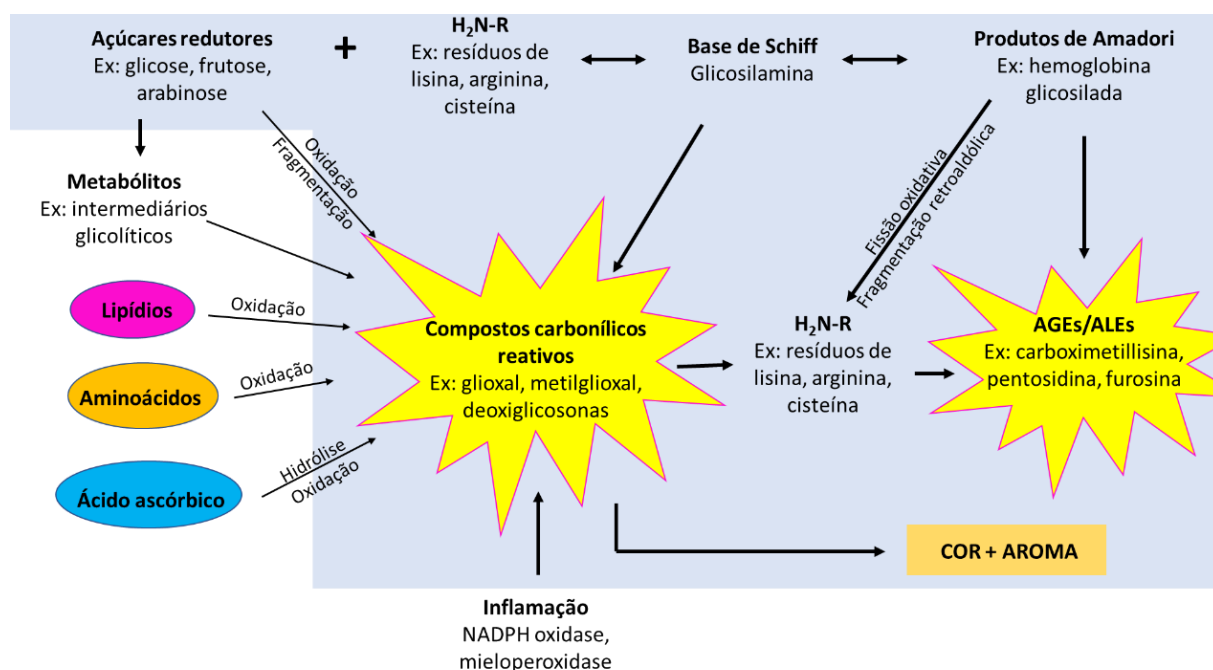
Vários estudos têm sido desenvolvidos visando identificar tais compostos e avaliar seus benefícios e malefícios tanto em alimentos como na saúde humana. Apesar dos avanços científicos e de pesquisas relacionadas aos AGEs, os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na geração dessas espécies ainda não foram elucidados completamente devido tanto à complexidade das reações envolvidas como reatividade dos intermediários e produtos formados. Hodge, em 1953, propôs um esquema das reações envolvidas na formação de AGEs. Contudo, sabe-se que a formação de AGEs pode ocorrer por diferentes vias (Figura 7), sendo a reação de Maillard apenas uma delas (MARTINS, 2003).

A via clássica da reação de Maillard é dividida didaticamente em 3 estágios: estágio inicial, estágio intermediário e estágio avançado, porém todas essas etapas estão inter-relacionadas podendo ocorrer simultaneamente e são afetadas pelas condições reacionais meio, tais como pH, concentração, atividade da água e temperatura. Por se tratar de uma reação não enzimática, em condições fisiológicas, essa reação é lenta e pode levar de dias a algumas semanas para completar (MARTINS, 2003).

A primeira etapa da reação de Maillard envolve a condensação entre uma cetona ou aldeído e uma amina primária, em meio básico, seguida da perda de uma molécula de água, caracterizando-se como uma reação de condensação (Figura 8). Esta reação inicia-se com o ataque nucleofílico de grupamentos amina de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos ou aminofosfolipídeos à carbonila presente em açúcares redutores, tais como frutose, glicose,

ribose e galactose ou em produtos da oxidação de lipídeos, aminoácidos ou do ácido ascórbico.

Figura 7 – Diferentes vias de formação de AGEs e ALEs.

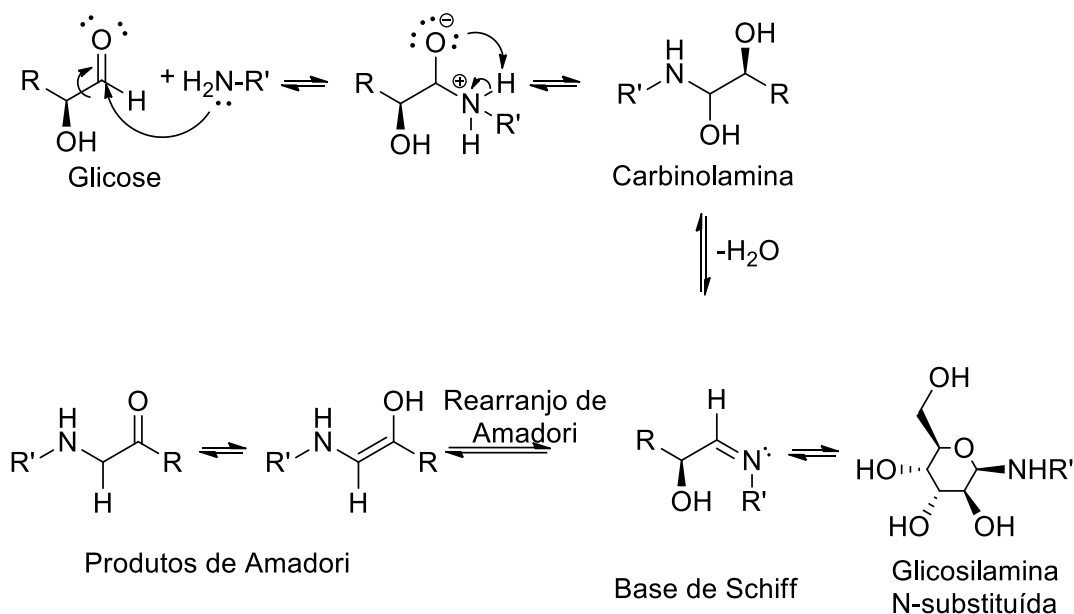


Fonte: Barbosa *et al.* (2016).

Essa simples condensação leva à formação de uma carbinolamina intermediária, que ao ser desidratada gera um composto com uma ligação C=N (imina), mais conhecido como base de Schiff. Essa reação é termodinamicamente reversível, podendo ser revertida em valores baixos de pH, uma vez que ambos os átomos de oxigênio da carbonila e de nitrogênio da amina podem ser protonados. A base de Schiff, por ser instável, pode ciclizar a partir da ligação hemiacetal entre os carbonos 1 e 5 do monossacarídeo, formando compostos mais estáveis, as glicosilaminas *N*-substituídas (BARBOSA *et al.*, 2016).

Em termos de reatividade, as amins primárias são as mais reativas, seguidas das amins secundárias. As amins terciárias são inativas, uma vez que não formam produto estável com compostos carbonílicos, pois o nitrogênio ficaria carregado positivamente e não haveria hidrogênio para perder. Dentre os aminoácidos, a lisina é o precursor mais reativo em proteínas, sendo cerca de 2 a 3 vezes mais reativa quando comparada aos outros aminoácidos, isso ocorre devido à presença de grupamentos ϵ -amino em sua estrutura. A cisteína, por ser um aminoácido sulfurado, é o menos reativo (BARBOSA *et al.*, 2016).

Figura 8 – Mecanismo de reação do estágio inicial da reação de Maillard.



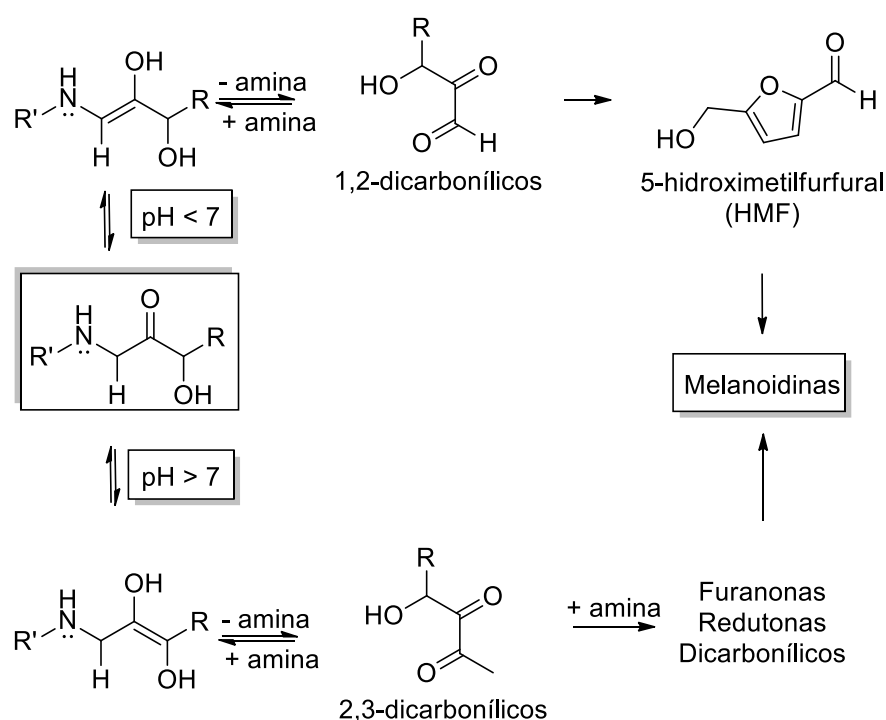
Fonte: Autora (2020).

Além da ciclização, as bases de Schiff sofrem rearranjos estruturais formando compostos relativamente mais estáveis: os produtos de Amadori (1-amino-1-desoxi-2-cetose) ou produtos de Heyns (2-amino-2-desoxi-2-aldeose) a depender do açúcar que os originaram, aldoses ou cetoses, respectivamente. Apesar de rearranjarem-se de formas distintas, esses produtos possuem em comum a função amino-carbonila nos açúcares. Em pH fisiológico e temperatura ambiente, essa reação não ocorre extensivamente no corpo, contudo quando o nível de açúcar no sangue se mantém elevado por um longo período, como no caso de hiperglicemia, a formação de produtos de Amadori/Heyns aumenta aceleradamente, ou seja, fase inicial da glicação é dependente da concentração (QAIS *et al.*, 2019; VISTOLI *et al.*, 2013). A HbA1c foi o primeiro produto de Amadori identificado *in vivo* por Samuel Rahbar em 1955. Ela é originada a partir da ligação entre glicose e hemoglobina das células vermelhas. Esta proteína glicada, assim como frutossamina e albumina glicada, têm sido utilizadas como biomarcadores no diagnóstico de diabetes *mellitus*.

O estágio intermediário da glicação é caracterizado pela decomposição, via reações de enolização, desidratação e retroaldolização dos produtos de Amadori/Heyns em diferentes compostos que podem reagir novamente e formar novos produtos (Figura 9). Dependendo das condições físicas e químicas do meio, mais especificamente do pH, os intermediários formados podem variar. Em valores baixos de pH, produtos de Amadori/Heyns sofrem enolização e formam 1,2-dicarbonílicos, que por desidratação geram furfural ou hidroxiacetilfurfural (HMF) (ARELI MONDACA-NAVARRO *et al.*, 2020).

Por outro lado, em valores de pH mais alto, sofrem enolização e geram 2,3-dicarbonílicos, que por desidratação formam redutonas, furanonas, e compostos α -dicarbonílicos. Além disso, os compostos de Amadori/Heyns podem ser degradados a diferentes produtos insaturados de baixo peso molecular, como gliceraldeído, piruvaldeído, acetol, acetoína e diacetilos, os quais apresentam alta reatividade (ARELI MONDACA-NAVARRO *et al.*, 2020).

Figura 9 – Rotas envolvidas no estágio intermediário da glicação: enolização 1,2 e em meio ácido e enolização 2,3 em meio básico.



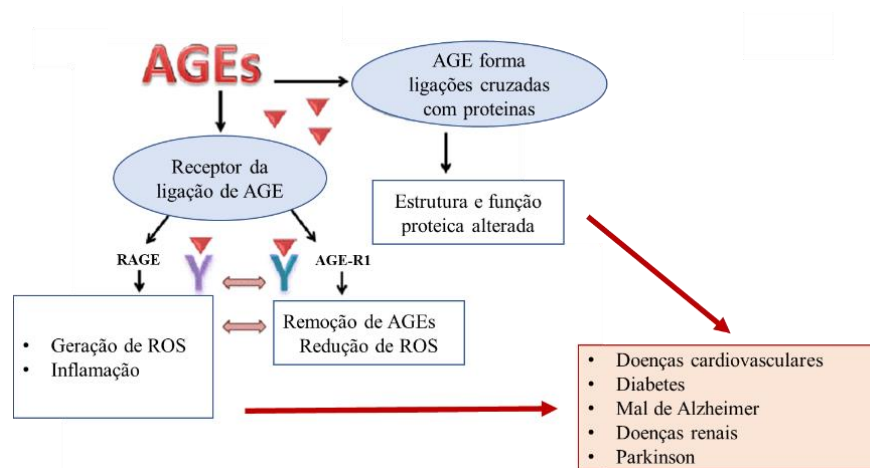
Fonte: Adaptado de Barbosa *et al.* (2016).

No último estágio da glicação ocorrem reações de polimerização, condensação aldólica e formação melanoidinas, que são compostos heterocíclicos de nitrogênio não volátil, colorido e de alto peso molecular (NAVARRO *et al.*, 2020). Também se formam os AGEs, a partir da reação de compostos dicarbonílicos e grupamentos amino.

A formação dos AGEs envolve complexas reações sequenciais e paralelas, que embora alguns dos seus mecanismos precisos sejam ainda objeto de investigações e debates, duas das suas principais vias são consideradas bem estabelecidas, são elas: (1) rearranjos irreversíveis dos produtos de Amadori seguidos de reações oxidativas ou não e (2) a condensação entre cadeias laterais dos resíduos de lisina, cisteína e arginina e produtos carbonílicos gerados desde os estágios iniciais da reação de Maillard (BARBOSA *et al.*, 2016).

Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos de alterar as propriedades químicas e biológicas de componentes celulares, pela formação de ligações cruzadas com proteínas, interação com receptores celulares, como RAGE, geração de espécies reativas, promovendo alterações morfofuncionais, ativação de células do sistema imune e, conseqüentemente, produção de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo. Tanto as modificações proteicas quanto a ativação de receptores podem levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes, Alzheimer, doenças renais e Parkinson (Figura 10) (KIM; PARK; KIM, 2017).

Figura 10 – Efeitos biológicos causados por AGEs.



Fonte: Kim, Chan-Sik *et al.* (2017).

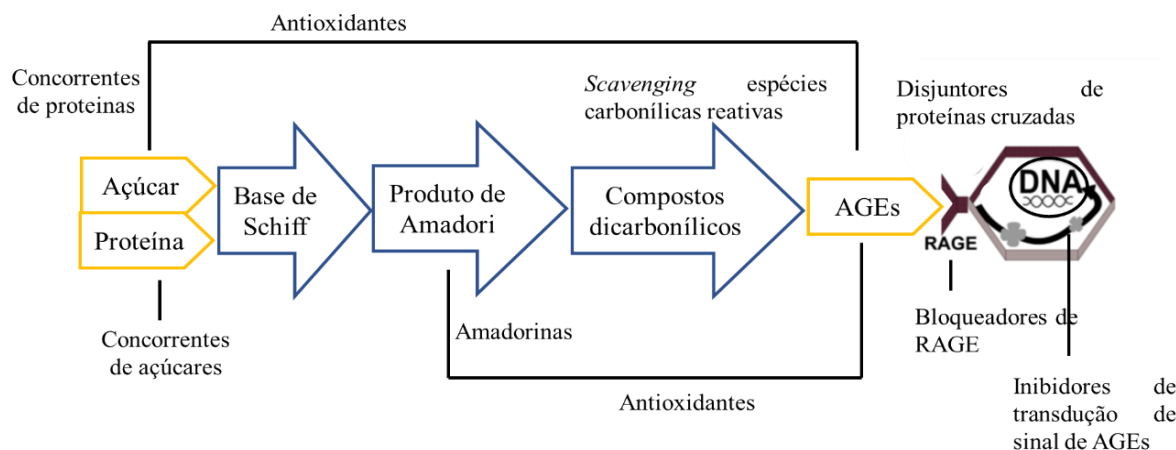
2.5.1 Mecanismo de inibição da formação de AGEs

A descoberta e investigação de drogas capazes de inibir a formação de AGEs é fundamental para prevenir complicações patogênicas desencadeadas pelo acúmulo de espécies carbonílicas reativas (ECRs) e AGEs no corpo humano. Conforme descrito anteriormente, várias vias, indutores, precursores e intermediários estão envolvidos na formação de AGEs. Portanto, diferentes estratégias e abordagens usando compostos sintéticos ou naturais podem ser implementadas para inibir qualquer etapa da formação de AGEs, diminuir ou remover intermediários e produtos finais (NAGAI *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação do inibidor varia com a estrutura e as condições do meio (Figura 11). Alguns inibidores atingem apenas um local de glicação, enquanto outros atacam vários locais das vias de formação de AGEs. Em relação ao mecanismo de ação, os inibidores podem ser competidores de açúcar, competidores de proteínas, transglicadores, amadorinas, antioxidantes, quelantes de metais de transição, sequestrantes de carbonilas reativas e radicais,

quebradores de reticulação e bloqueadores RAGE. Os inibidores podem ser classificados de acordo com sua origem em sintéticos ou naturais (PENG *et al.*, 2011).

Figura 11 – Esquema ilustrativo dos locais de inibição de potenciais agentes antiglicantes.



Fonte: Adaptado de Elostá, Ghous, Ahmed (2012)

2.5.2 Inibidores sintéticos

A primeira etapa da glicação é a ligação do açúcar às proteínas, portanto, uma das principais estratégias para inibir a glicação é evitar a ligação entre os dois compostos. Alguns inibidores, principalmente os competidores do açúcar, impedem essa ligação bloqueando ou modificando os grupos amino livres das proteínas, enquanto outros, chamados competidores das proteínas, reagem com os açúcares redutores. Alguns anti-inflamatórios, incluindo aspirina, ibuprofeno, diclofenaco e paracetamol, demonstraram atuar como antiglicantes na fase inicial da glicação, mas os mecanismos de ação podem ser diferentes para cada um (NAGAI *et al.*, 2012).

Outros inibidores de glicação do estágio inicial competem com o grupo amino da proteína. Metformina, inositol e aminoguanidina são alguns exemplos. A metformina é a terapia de primeira linha para pacientes com diabetes tipo 2 e resistência à insulina. Ainda, é responsável por reduzir as concentrações de glicose e eliminar precursores de carbonila reativos, como o MGO, no sangue (RAMAKRISHNAN; SULOCHANA; PUNITHAM, 1999).

A segunda estratégia de inibição da formação de AGEs é quebrar a ligação entre o açúcar redutor e o grupo amino de proteínas. Embora a deglicação seja reversa por natureza, ela pode ser realizada quimicamente por transglicação, uma reação na qual libera a proteína

recuperada e a glicose modificada de bases de Schiff e produtos de Amadori (JAHAN; CHOUDHARY, 2015).

Em outra abordagem, a inibição da formação de AGEs é impedir a conversão dos produtos Amadori em precursores de AGEs, como MGO. As moléculas que possuem potencial para eliminar os produtos Amadori são chamadas de “Amadorinas”. Na fase intermediária da glicação, os produtos Amadori passam por uma série de reações, incluindo oxidação, desidratação, rearranjos e outras. Alguns deles são catalisados por íons de metais de transição, como ferro e cobre. Essas reações levam a compostos α -dicarbonílicos reativos, como glioxal e MGO. Íons de metais de transição livres e ROS foram identificados como espécies importantes nas reações de oxidação. Assim, uma das estratégias promissoras de inibir a formação de AGEs é por meio da terapia com quelantes de íons metálicos, antioxidantes e inibidores reativos de espécies de carbonila (JAHAN; CHOUDHARY, 2015).

A última etapa da reação de Maillard é a conversão de compostos α -dicarbonílicos em AGEs. Alguns inibidores evitam a formação de AGEs eliminando essas carbonilas reativas e radicais livres. Para ilustrar, estudos *in vitro* mostraram que aminoguanidina, metformina, carnosina e piridoxamina reagem com compostos dicarbonílicos, tais como glioxal, metilglioxal e deoxiglucosonas e, assim, evitam a formação de AGEs. Essas moléculas foram descritas como potentes sequestrantes de carbonilas e amplamente estudadas para inibir a formação de AGE. A aminoguanidina foi introduzida em 1986 por Brownlee e colaboradores como sendo o primeiro inibidor da modificação de proteínas pela reação de Maillard (ALDINI *et al.*, 2013).

Estudos *in vitro* demonstraram que a aminoguanidina tem a capacidade de capturar rapidamente compostos α , β -dicarbonílicos, como MGO, glioxal e 3-desoxidglucosona, para prevenir a formação de AGEs. Vários ensaios clínicos foram conduzidos com aminoguanidina, no entanto, nenhum foi aprovado para uso clínico devido à citotoxicidade e outros efeitos adversos (NAGAI *et al.*, 2014).

Uma vez que os AGEs são formados, o próximo ponto de intervenção é quebrar as ligações cruzadas covalentes existentes em AGEs pré-formados para reduzir seu acúmulo no corpo, bem como bloquear a interação de AGEs com seus receptores de superfície celular (RAGE) e, assim, suprimir a resposta biológica de AGEs causados pela geração de estresse oxidativo, crescimento celular e inflamação. A nova terapêutica foi identificada como ligações cruzadas de proteínas em experimentos *in vitro* e *in vivo*. O brometo de *N*-fenaciltiazólio (PTB) e seu derivado de cloreto podem facilmente quebrar a ligação dicarbonila e, assim, diminuir as ligações cruzadas derivadas de AGE. Além disso, a

administração crônica de anticorpos anti-RAGE em camundongos com diabetes *mellitus* inibiu a nefropatia sem quaisquer efeitos adversos. Outros estudos mostraram que o bloqueio de RAGE por anticorpos neutralizantes reduziu a aterosclerose em camundongos urêmicos (NAGAI *et al.*, 2012, 2014).

2.5.3 Inibidores naturais

Historicamente, as plantas têm sido utilizadas no tratamento de doenças desde o início das civilizações. Os produtos naturais, incluindo folhas, flores, sementes e caules, apresentam importantes propriedades biológicas, incluindo atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antitumoral e outras. Além disso, os produtos naturais, particularmente produtos vegetais, têm se mostrado relativamente seguros para consumo humano. Seus constituintes não apresentam efeitos adversos à saúde dependendo da dose. O mecanismo pelo qual os produtos naturais impedem a formação de AGEs depende da composição dos mesmos, mas em geral, podem atuar como antioxidante, sequestrador de espécies carbonílicas ou agentes quelantes. Muitos produtos derivados de plantas já foram testados e reportados como inibidores da formação de AGEs, dentre eles destacam-se os compostos fenólicos.

2.6 Diabetes mellitus

O diabetes *mellitus* é um problema de saúde pública que atingiu níveis preocupantes nas últimas décadas. Em 2019, quase meio bilhão de pessoas (9,3% dos adultos entre 20 e 79 anos) foram diagnosticados com diabetes em todo o mundo. O número estimado de pessoas (20–79 anos) vivendo com diabetes aumentou 62% nos últimos 10 anos; de 285 milhões em 2009 para 463 milhões, em 2019. Além disso, atualmente, estima-se que metade (50,1%) das pessoas com diabetes não sabe que tem diabetes (SAEEDI *et al.*, 2019).

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, 11,9 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos têm diabetes no Brasil, classificando o país como o quinto com maior número de casos no mundo (COUTINHO; SILVA JÚNIOR, 2015; SAEEDI *et al.*, 2019).

O diabetes pode ser classificado em três grupos: 1) diabetes do tipo 1 (DMT1), 2) diabetes *mellitus* do tipo 2 (DMT2), o qual é responsável por quase 90 % dos casos, e 3) diabetes de *mellitus* gestacional. O diabetes é um problema de saúde altamente complexo, sendo caracterizado pelos níveis anormais de açúcar no sangue, como resultado da incapacidade do pâncreas de produzir insulina, ou da incapacidade do corpo de usar efetivamente a insulina produzida pelas células (TUPAS *et al.*, 2019).

A insulina é um hormônio produzido naturalmente no pâncreas, sua função é manter os níveis de açúcar no sangue normais. Após as refeições, o aumento do teor de glicose no sangue estimula a produção de insulina pelas células β do pâncreas, facilitando o transporte, a biotransformação e o armazenamento de glicose nos músculos e tecidos adiposos. Em jejum, a glicose da corrente sanguínea é fornecida pelo fígado por meio da produção de glucagon pelas células α pâncreas, sendo este processo independente da insulina (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016).

Além do armazenamento de glicose, a insulina é responsável pela inibição da produção de glucagon, diminuindo assim, a transformação de aminoácidos e glicogênio em glicose, isto leva a uma redução na produção glicose no fígado. Duas condições podem existir quando o organismo possui quantidades insuficientes ou resistência à insulina: hipoglicemia intracelular e hiperglicemia extracelular. A hipoglicemia intracelular leva glicogênese e gliconeogênese que leva à quebra de gorduras (causando cetoacidose diabética – complicação aguda grave, pontencialmente mortal) e diminui a síntese de proteínas e gamaglobulinas (causando caquexia, polifagia e cicatrização prejudicada), enquanto a hiperglicemia extracelular leva ao coma hiperglicêmico e osmótico (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016).

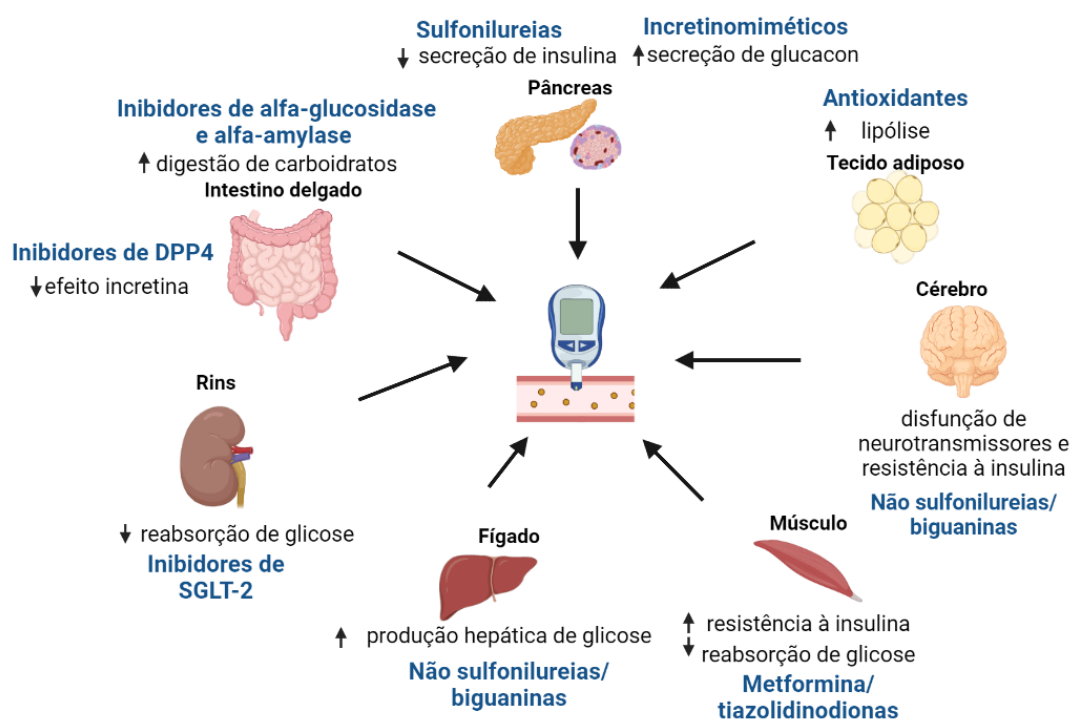
Dessa forma, o metabolismo dos lipídeos e proteínas também são afetados quando há qualquer problema no metabolismo do carboidrato, resultando em distúrbios metabólicos, tais como formação não enzimática de AGEs, geração de espécies reativas de oxigênio e peroxidação de lipídica, as quais estão associadas a complicações em pacientes diabéticos (TUPAS *et al.*, 2019). As complicações podem ser macrovasculares (doença coronariana, doença vascular periférica, pé diabético e acidente vascular cerebral) e microvasculares (neuropatia, retinopatia e nefropatia) (BROWNLEE, 2005; SINGH *et al.*, 2014).

O crescente aumento de casos de diabetes têm causado grandes impactos sociais e econômicos. As implicações econômicas dessa tendência são tão grandes que os esforços estão aumentando na busca por novos medicamentos que sejam eficazes no tratamento e controle do diabetes. Vários agentes sintéticos foram desenvolvidos para o tratamento do diabetes, mas o uso a longo prazo está associado a diversos efeitos colaterais. Assim, os produtos naturais têm sido avaliados para aumentar significativamente a eficácia e diminuir a toxicidade dos medicamentos ou até mesmo como uma alternativa aos medicamentos existentes (TUPAS *et al.*, 2019).

Em geral, o objetivo dos medicamentos antidiabéticos é manter os níveis de glicemia normais, aliviar os sintomas causados pelo diabetes e reduzir a progressão das complicações associadas a esta patologia. Em geral, as estratégias usadas no desenvolvimento de

antidiabéticos se enquadra em oito fatores que levam a hiperglicemia: (1) diminuição da secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas, (2) aumento da secreção de glucagon pelas células α -pancreáticas, (3) aumento da glicose no fígado, (4) resistência à insulina e disfunção de neurotransmissores no cérebro, (5) aumento da lipólise, (6) aumento da reabsorção de glicose nos rins, (7) redução do efeito das incretinas no intestino delgado e (8) diminuição da glicose absorção nos tecidos periféricos (MARÍN-PEÑALVER *et al.*, 2016; TUPAS *et al.*, 2019). A Figura 12 mostra os principais problemas patológicos causados nos mais diversos órgãos e o local de atuação de cada classe de fármaco.

Figura 12 – Disfunções causadas pela hiperglicemia e as classes dos compostos antidiabéticos.



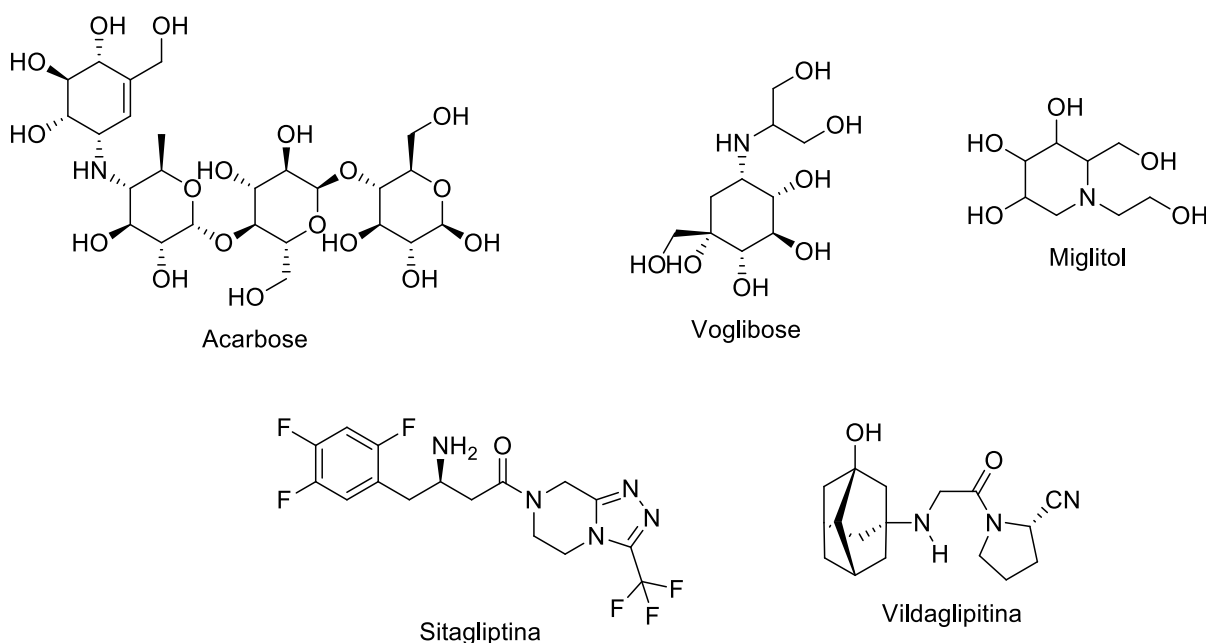
Fonte: Adaptada de Tupas *et al.* (2019).

Uma das abordagens terapêuticas para controlar a hiperglicemia pós-prandial no DMT2 é inibir a digestão dos carboidratos da dieta. A α -amilase pancreática é uma enzima chave que decompõe os carboidratos da dieta, como o amido, em monossacarídeos simples no sistema digestivo. Estes são posteriormente degradados por α -glicosidases em glicose que, na absorção, entra na corrente sanguínea. Portanto, a inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase pode suprimir a digestão de carboidratos, retardar a captação de glicose e, conseqüentemente, reduzir os níveis de açúcar no sangue. Embora drogas como acarbose, voglibose e miglitol (Figura 13) inibam α -glicosidase e α -amilase na prática, elas produzem

efeitos colaterais indesejados, como inchaço, desconforto abdominal, diarreia e flatulência (ALQAHTANI *et al.*, 2020).

Os inibidores orais da DPP-4 que estão nas fases mais avançadas do desenvolvimento clínico são a vildagliptina e a sitagliptina (Figura 13), sendo esta última recentemente aprovada para uso pela *Food Drug Administration* (FDA).

Figura 13 – Estrutura química dos compostos ativos presentes em medicamentos antidiabéticos aprovados pela Food Drug Administration (FDA).



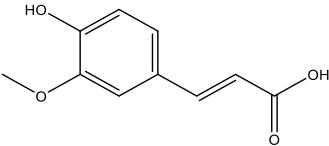
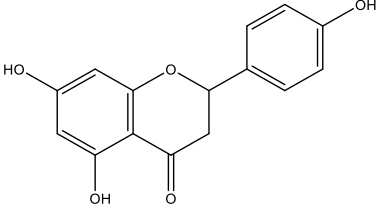
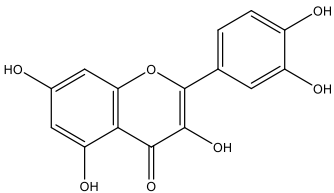
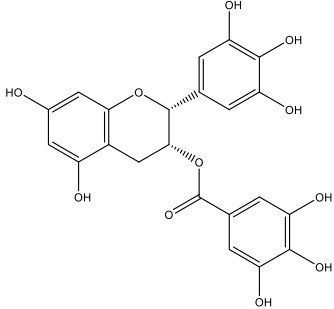
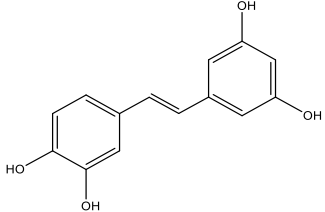
Fonte: Sigma Aldrich, 2022.

Os polifenóis dietéticos têm sido objeto de estudo como agentes antidiabéticos em células, animais, estudos humanos e triagem clínicas. Os flavonoides mostraram efeito hipoglicêmico significativo via modulação da absorção de glicose, inibição de enzimas digestivas, regulação da microbiota intestinal, inibição da formação de AGEs, e assim por diante. Os flavonoides melhoram a patogênese do diabetes e suas complicações por meio da regulação do metabolismo da glicose, das atividades das enzimas hepáticas e do perfil lipídico (SUN *et al.*, 2020)

Os grupos hidroxila ligados ao anel B e anel C e uma ligação 2,3 insaturada em conjugação com um grupo 4-carbonil de flavonoides são favoráveis à inibição de enzimas digestivas e formação de AGEs, enquanto o metil e porções glicosídicas fazem contra a inibição (SUN *et al.*, 2020). No entanto, a relação estrutura-atividade dos efeitos hipoglicêmicos dos flavonoides da dieta em animais não foi clara. A atividade antidiabética

de flavonoides C-glicosídeos em humanos e estudos clínicos tem sido raramente relatada. A Figura 14 mostra alguns exemplos de compostos fenólicos encontrados nos alimentos e um de seus mecanismos de ação.

Figura 14 - Exemplos de compostos isolados de produtos naturais e um de seus mecanismos de ação.

Composto	Fonte de planta	Estrutura	Mecanismo de ação
Ácido ferúlico	Arroz branco, tomate, batata doce		Atividade antioxidante (captura do ânion radical superóxido e inibe a peroxidação lipídica)
Naringenina	Frutas cítricas		Estimula a captura de glicose e aumenta fosforilação/ativação AMPK
Quercetina	Cebola, uvas, frutas cítricas, cereja		Inibe a absorção de glicose no intestino, melhora a utilização de glicose nos tecidos periféricos, aumenta a secreção de insulina e regeneração de células β no pâncreas
Galato epigallocatequina	Chá verde		Inibe a ação da enzima α -glicosidase
Piceatanol	Maracujá		Diminui o nível de açúcar no sangue

Fonte: Sun, Miao (2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliar os potenciais antioxidante, antiglicante e antidiabético dos extratos etanólicos de sementes de *Passiflora* (*P. edulis* e *P. cincinnata*) e do composto padrão PIC e determinar o perfil químico dos extratos etanólicos.

3.2 Específicos:

- Extrair compostos bioativos de sementes de maracujá;
- Caracterizar os extratos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas;
- Determinar o conteúdo de fenóis totais nos extratos etanólicos obtidos a partir de sementes de maracujá;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos etanólicos e PIC a partir dos métodos: captura do radical DPPH[•], captura do ânion radical superóxido (O₂^{•-}), captura do ácido hipocloroso (HOCl), e inibição da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio.
- Examinar a capacidade de inibição da glicação da albumina sérica bovina (BSA) *in vitro* por extratos de sementes de maracujá e PIC;
- Avaliar a capacidade dos extratos etanólicos e PIC em inibir a formação de fibras amiloides a partir de BSA submetida à glicação com frutose e glicose e com metilglioxal (MGO).
- Investigar o potencial de inibição das enzimas α -amilase, α -glicosidase e DPP-4.
- Determinar a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares na presença dos extratos etanólicos e PIC.
- Avaliar a viabilidade de células na presença dos extratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produtos Químicos

Os solventes analíticos e produtos químicos utilizados para atividades antioxidantes e antiglicantes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha): reagente Folin-Ciocalteu (F-C), DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), NADH (β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo), NBT (cloreto de tetrazólio-nitroazul), PMS (metossulfato de fenazina), DHR (dihidrorodamina), aminoguanidina (AMG), quercetina (QCT), piceatanol (PIC), ácido gálico, albumina sérica bovina (BSA), Tioflavina T (ThT), frutose e glicose.

Os solventes analíticos, produtos químicos e enzimas utilizadas para ensaios antidiabéticos foram obtidos da Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canadá): α -amilase pancreática, α -glicosidase, acarbose (ACB), sitagliptina (STG), 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriosídeo (CNP3G), *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNPG), fosfato trissódico, ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etanossulfônico (HEPES), dipeptidil peptidase IV humana (DPP-4). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, as soluções estoques e tampões foram preparados com água purificada Milli-Q.

O meio de crescimento LHC-9 para células BEAS-2B (células normais do epitélio brônquico) foi adquirido da Thermo Fischer 91 (Chelmsford, MA, EUA). O Meio Basal Epitelial Mamário MEBMTM e a suplementação (Kit de Meio de Crescimento Celular Epitelial Mamário MEGMTM) para células MCF-10A (células epiteliais mamárias não malignas) foram adquiridos da Lonza. O meio DMEM F-12 (ATCC) suplementado com Insulina-Transferrina-Selênio (ITS-G) para células AML-12 (células normais de fígado de camundongo) foi adquirido da Lonza. 4-[(Acetoximetil)-nitrosamino]-1-(3-piridil)-1-butanona (NNKOA) foi adquirido de Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canadá). Metilglioxal (MGO), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetilfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS), metassulfato de fenazina (PMS), e corante diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canadá). As soluções estoques foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), e as concentrações finais não ultrapassaram 0,5% (v/v) no meio de tratamento de cultura.

4.2 Obtenção das Amostras

As sementes de maracujá *P. edulis* foram obtidas em dois locais: na fábrica Polpas de Frutas Santa Luzia, localizada no município de Marechal Deodoro, Alagoas (PED1),

coletadas em maio de 2017, e em uma fazenda de frutas orgânicas na península de Maraú, Bahia (PED2) (novembro de 2020). As sementes de *P. cincinnata* foram coletadas em novembro de 2019, em uma mata nativa situada município de Olho d'Água do Casado, Alagoas (PCIN).

4.3 Preparo dos Extratos Etanólicos das Sementes de Maracujá

Os extratos etanólicos das sementes de maracujá foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por (XAVIER *et al.*, 2022). As sementes foram lavadas com água destilada, e secas em estufa a 50 °C por 48 horas. Em seguida, as sementes foram trituradas em moinho de facas (Oster) e armazenadas em frasco âmbar com tampa e a temperatura ambiente. A extração dos compostos bioativos foi realizada em extrator Soxhlet, para isto, dentro de um cartucho confeccionado em papel de filtro qualitativo foram pesadas 12 g de amostra moída e seca. Em seguida, foi realizada a extração com *n*-hexano para desengordurar as amostras e, posteriormente, com etanol para extrair os compostos a serem analisados. O volume de cada solvente utilizado foi 250 mL e o tempo de extração 6 horas para cada solvente. Os solventes foram removidos do extrato por destilação à pressão reduzida com evaporador rotativo (Buchi). Os extratos etanólicos secos foram transferidos para frascos de vidro âmbar e armazenados sob refrigeração a 4 °C. Os extratos foram codificados como EPED1 (extrato etanólico de PED1), EPED2 (extrato etanólico de PED2) e EPCIN (extrato etanólico de PCIN).

4.4 Atividade Antioxidante

4.4.1 Determinação do conteúdo de fenóis totais

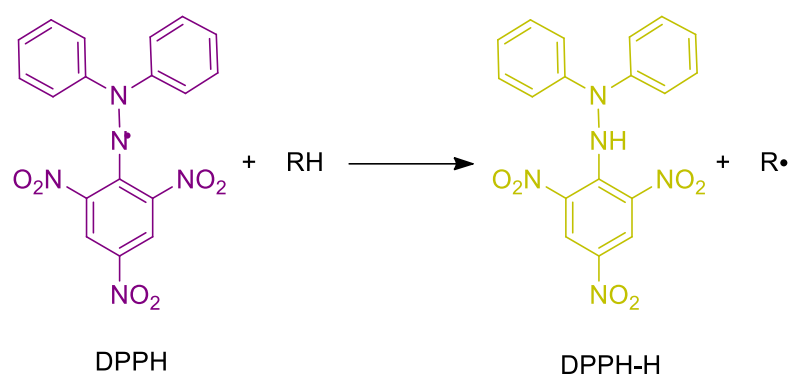
O conteúdo de fenóis totais (CFT) dos extratos etanólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Cicco e colaboradores (2009), com algumas modificações. Este método colorimétrico baseia-se na redução do reagente de Folin-Ciocalteu (amarelo) por substâncias redutoras a óxidos de molibdênio e tungstênio (azul). Para isto, foram preparadas soluções estoque de extrato bruto (4 mg/mL em etanol) e ácido gálico (1 mg/mL em etanol). Em seguida, 120 µL da solução da amostra diluída (50 µg/mL), ácido gálico (0,7 a 7,0 mg/L) ou branco (etanol) foram adicionados em tubos de ensaios separados. Em cada tubo foram transferidos 180 µL de água deionizada, 300 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 2,4 mL de carbonato de sódio a 5% (m/v) e a mistura foi agitada. Os tubos foram colocados em banho-maria à 40 °C no escuro por 20 min. Após incubação, os tubos

foram resfriados rapidamente na bancada e a absorvância foi medida a 760 nm usando espectrofotômetro UV-vis (Agilent 8453). Os CFT foram quantificados a partir da curva analítica de ácido gálico como padrão e os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de ácido gálico/grama de extrato seco (mg de EAG/g de extrato seco).

4.4.2 Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•

Este método é usado para determinar a capacidade antioxidante sequestradora de radicais e baseia-se na redução do radical estável DPPH• de coloração púrpura a DPPH-H (difenil-picril-hidrazina) cuja coloração é amarela (Figura 15). A determinação da capacidade antioxidante dos extratos foi realizada de acordo com o método proposto por Xavier e colaboradores (2017), com algumas modificações. Para isto, preparou-se uma solução metanólica de DPPH• (40 µg/mL) e 2,7 mL desta solução foi adicionada a 0,3 mL da solução do extrato em diferentes concentrações. A mistura foi incubada em temperatura ambiente, no escuro, por 30 min. Em seguida, foi medido o decréscimo da absorvância a 516 nm por espectrofotometria.

Figura 15 - Reação de redução do radical DPPH• por um antioxidante representado por RH.



Fonte: Autora (2022).

O potencial de inibição do radical foi calculado através da Equação 1:

$$\text{Potencial de inibição (\%)} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde A_0 é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH• e A_1 é a absorvância da mistura reacional contendo DPPH• e amostra. A partir do potencial de inibição foi construída uma curva, concentração (µg/mL) versus inibição (%) para calcular o IC₅₀.

Neste experimento, o HOCl foi produzido no momento da análise a partir do ajuste de pH de uma solução de NaOCl a 1% (m/v) para 6,2 com a adição de gotas de H₂SO₄ a 10 % (v/v). A concentração de HOCl foi determinada por espectrofotometria a 235 nm usando o coeficiente de absorção molar de 100 M⁻¹ cm⁻¹. A solução de HOCl foi diluída para 30 μM usando tampão fosfato a 100 mM e pH 7,4. Soluções estoque de DHR em DMF a 2,89 mM foi purgada com nitrogênio e armazenada a -20 °C. No momento da análise, a solução estoque de DHR foi diluída para 30 μM em tampão fosfato (100 mM e pH = 7,4) e mantida no escuro em banho de gelo até início do ensaio. Para a análise, numa placa de 96 poços foram adicionados os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas: 150 μL de solução de solução tampão (100 mM, pH 7,4), 50 μL do extrato etanólico (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 e 300 μg/mL), 50 μL de DHR 123 (5 μM) e 50 μL de HOCl (5 μM). De modo paralelo, conduziu-se um controle negativo, substituindo o extrato por etanol; um controle positivo substituindo o extrato por quercetina; e um branco, substituindo extrato por etanol e HOCl por tampão fosfato. Os ensaios por fluorescência foram realizados em leitor de microplaca (marca, modelo, país), a 37 °C, nos comprimentos de onda de 505 e 530 nm, para excitação e emissão, respectivamente. Cada ensaio corresponde a quatro experimentos

realizados em triplicata ($n = 3$). Os resultados foram obtidos a partir da primeira medida (“endpoint”). Os resultados foram expressos como inibição (em porcentagem) da DHR induzida pelo HOCl. A capacidade sequestradora de HOCl em porcentagem foi calculada usando a Equação 2:

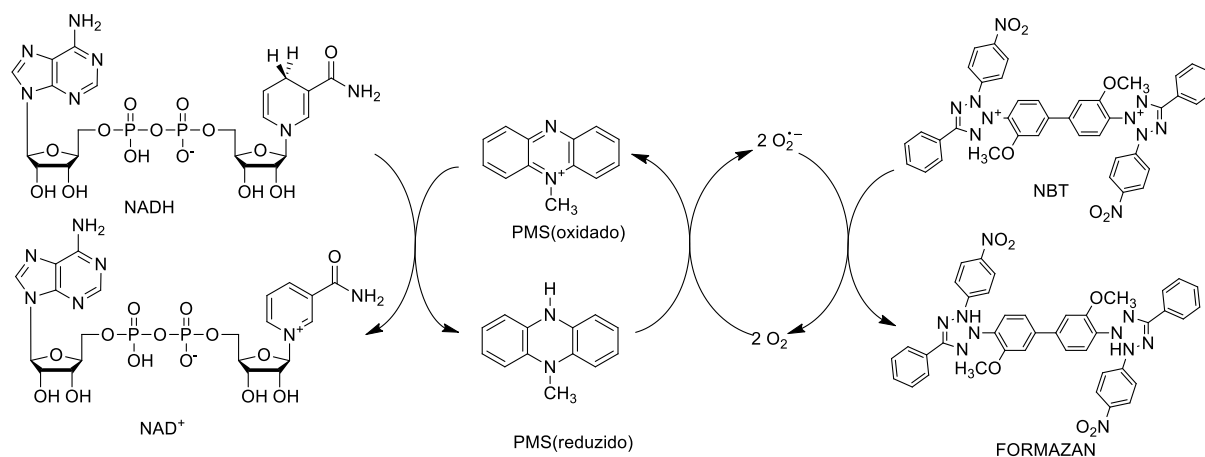
$$\text{Capacidade sequestradora de HOCl (\%)} = \frac{(IF_0 - IF_1)}{IF_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde IF_0 é a intensidade de fluorescência do controle negativo e IF_1 a intensidade fluorescência da amostra ou do controle positivo.

4.4.4 Capacidade de sequestro do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O potencial do extrato etanólico e do composto puro em sequestrar $O_2^{\cdot-}$ foi determinada a partir do método descrito por Lucas e colaboradores (2021), com algumas modificações. Este método baseia-se na redução da sonda NBT a formazan (roxo) pelos $O_2^{\cdot-}$, os quais são gerados a partir da oxidação de NADH em um sistema não enzimático, NADH/PMS, como mostra a Figura 17.

Figura 17 - Representação da geração de radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pelo sistema NADH/PMS, seguida da redução do NBT a formazan.



Fonte: Adaptado de Gomes e colaboradores (2007).

Assim, numa placa de 96 poços foram adicionadas as seguintes soluções nas concentrações finais indicadas: 50 μ L de EPED1, EPED2, EPCIN, PCT e QCT (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 e 300 μ g mL^{-1}), 50 μ L de NADH (166 μ M), 150 μ L de NBT (43,3 μ M) e 50 μ L de PMS (2,7 μ M). NADH, NBT e PMS foram dissolvidos em tampão fosfato (19 mM, pH

7,4). Paralelamente, conduziu-se um controle negativo, substituindo o extrato por etanol; um controle positivo substituindo o extrato por quercetina; e um branco, substituindo extrato por etanol e PMS por tampão. Os resultados foram obtidos pela leitura de 2 min de incubação, a 37 °C e a 560 nm. Cada estudo corresponde a quatro experimentos realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como a inibição (em porcentagem) da redução do NBT a formazan induzida pelo superóxido e calculados conforme a Equação 3:

$$\text{Atividade sequestradora de } O_2^{\bullet-} (\%) = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

Onde A_0 é a absorvância do controle negativo e A_1 a absorvância da amostra ou do controle positivo.

4.5 Atividade Antiglicante

4.5.1 Atividade antiglicante pelo sistema BSA/frutose+glicose

Este ensaio antiglicante visa avaliar os estágios de glicação da proteína de maneira geral a partir da reação da BSA com uma mistura de açúcares redutores (frutose e glicose). A avaliação da atividade antiglicante foi realizada de acordo com o método descrito por Melo e colaboradores (2015) com algumas modificações. Primeiramente, foram preparadas soluções de BSA (3 mg/mL), frutose (200 mM), glicose (200 mM) e soluções das amostras em 6 concentrações diferentes (15, 30, 75, 150, 300 e 600 µg/mL) para determinação do IC₅₀. Estas soluções foram preparadas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, com azida de sódio 0,02 % (m/v)). O sistema reacional consistiu na adição das seguintes soluções: 300 µL das diferentes concentrações das amostras, 150 µL de frutose, 150 µL de glicose e 300 µL de BSA. Neste ensaio, o controle positivo foi realizado com aminoguanidina (concentrações de 5,0 a 500,0 µM) e o controle negativo, na ausência da amostra, com tampão fosfato (pH 7,4). Os sistemas reacionais foram incubados no escuro a 37 °C com agitação constante durante 7 dias. Após a incubação, 200 µL da mistura reacional foram transferidos para uma placa preta de 96-poços e os AGEs fluorescentes foram quantificados em espectrofluorímetro (Infinite® 200 PRO, TECAN, Suíça) usando 360 e 440 nm como comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata (n = 3). A porcentagem da inibição dos AGEs foi calculada utilizando a Equação 4:

$$\text{Inibição de AGEs (\%)} = \frac{(\text{IF}_{\text{controle negativo}} - \text{IF}_{\text{experimental corrigida}})}{\text{IF}_{\text{controle negativo}}} \times 100 \quad (4)$$

Onde $IF_{\text{controle negativo}}$ é a intensidade de fluorescência para o controle negativo e $IF_{\text{experimental corrigida}}$ é a intensidade de fluorescência da amostra subtraída do controle da amostra constituído por amostra e tampão.

4.5.2 Atividade antiglicante pelo sistema BSA/MGO

Este experimento visa analisar o estágio intermediário da glicação de proteínas a partir da reação de BSA com MGO. Este ensaio foi realizado utilizando o método descrito por Wang e colaboradores (2011) com algumas modificações. Para isto, foram preparadas soluções de BSA (3 mg/L), metilglioxal (1,5 mM) e amostra em 6 concentrações diferentes (15, 30, 75, 150, 300 e 600 µg/mL) em tampão fosfato a 50 mM, pH 7,4 com azida de sódio 0,02 % (m/v). O sistema consistiu na adição de 300 µL de metilglioxal (1,5 mM) a 300 µL da solução das amostras em diferentes concentrações e mantidas a 37 °C por 1 h. Após esse período, foi adicionado 300 µL de BSA (3 mg/L) e o sistema reacional foi incubado a 37 °C durante 48 h. Para o controle negativo, na ausência da amostra, foi utilizado tampão fosfato. Como controle positivo foi utilizado AMG. As análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$) e os AGEs fluorescentes presente em 200 µL da mistura reacional foram monitorados a 37 °C utilizando um espectrofluorímetro (Infinite® 200 PRO, TECAN, Suíça) ($\lambda_{\text{ex}} = 370$ e $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm). A inibição (em porcentagem) dos AGEs foi calculada usando a mesma equação do sistema BSA-glicose/frutose.

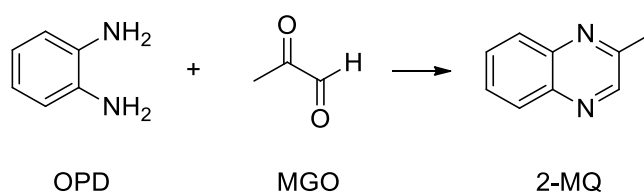
4.5.3 Avaliação da capacidade de captura de MGO através de derivatização com *orto*-fenilenodiamina (OPD)

A capacidade de captura de MGO foi realizada através do ensaio descrito por Wang e colaboradores (2011) com algumas modificações. A quantificação de MGO baseou-se na derivatização com OPD levando a formação do produto 2-metilquinoxalina (2-MQ) como mostra a Figura 18. As soluções de MGO e OPD foram preparadas em tampão fosfato (50 mM, pH 7.4) nas concentrações de 2 e 4 mM, respectivamente. AMG (2 mM) foi utilizada como padrão positivo e os extratos foram utilizados na concentração de 2 mg/mL, todas as soluções foram previamente filtradas (microfiltro x diâmetro de poro 0,45 µm). O sistema reacional consistiu na adição 125 µL da solução MGO e 125 µL de tampão fosfato (controle negativo) ou da solução da amostra, incubou-se à 37 °C por 1h. Após incubação adicionou-se 250 µL da solução de OPD e aguardou-se mais 30 min até que a reação de derivatização entre MGO e OPD se completasse e 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) foram utilizados como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL. A corrida cromatográfica foi realizada em um gradiente linear iniciando em 5% do solvente B, de 0-3 min, 5 a 50% B; de 3-16 min, isocrático em 50% do solvente B; de 16-17 min, 50-90% B; de 17-19 min isocrático em 90% do solvente B e de 19-19,5 min, 90 a 5% de B. O produto de derivatização, 2-MQ, foi detectado em 315 nm em um tempo de retenção de 13 min. A porcentagem de MGO remanescente, ou seja, a porcentagem de MGO que não foi capturado pela amostra e que permaneceu em solução foi calculada utilizando a Equação 5:

$$\% \text{ MGO remanescente} = \frac{\text{Área do pico após a adição da amostra}}{\text{Área do pico sem adição da amostra}} \times 100 \quad (5)$$

Figura 18 - Reação de formação do produto de derivatização de 2-metilquinoxalina (2-MQ) do MGO com *orto*-fenilenodiamina (OPD).



Fonte: Autora (2022).

4.5.4 Determinação do estado de fibrilação de proteínas glicadas usando Tioflavina T

O estado de fibrilação de proteínas glicadas foi determinado usando Tioflavina T como descrito por Moosavi-Movahedi e colaboradores 2015. Para isto, 100 µL do reagente Tioflavina T (10 µM de Tioflavina em 100 mM de tampão fosfato, pH 7,0) foi adicionado a 30 µL de proteínas glicadas (1 mg/mL). Posteriormente, a fluorescência foi medida nos seguintes comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, 450 e 490 nm (Infinite® 200 PRO, TECAN, Suíça). Solução de BSA recém preparada (1 mg/mL) e tampão foram usados como controles.

4.6 Caracterização Química dos Compostos por CLAE-DAD

Os principais compostos do extrato de EPED1 foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos acoplada ao espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray (IES) e analisador do tipo time of flight (TOF) – CLAE-DAD-IES-EM/EM (MicrOTOF-QII). Esses ensaios foram realizados no laboratório

Central de Espectrometria de Massas de Micromoléculas Orgânicas da Universidade de São Paulo (CEMMO/USP) pelo prof. Noberto Peoporine Lopes. EPED1 (0,5 mg) foi ressuspensa com 2 mL de uma solução de metanol/água (75:25). A separação foi realizada numa coluna Kinetex XB C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 μ m, 100 Å) a 40 °C, com volume de injeção 2,0 μ L de amostra e fluxo de 0,4 mL/min. Também foi utilizada uma fase móvel constituída por água com 0,1% de ácido fórmico (Solvente A), acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (Solvente B). O gradiente de eluição iniciou-se com rampa de 5 a 35% de B por 23 min, 35 a 100% de B por 17 min, mantendo-se a 100% de B por 8 min, e em seguida, de 100 a 5% de B em 2 min, permanecendo em 5% de B por 10 min, e finalizando a análise. O tempo total de análise foi 60 min. O espectrômetro de massas utilizado foi um MicrOTOF-Q II, Bruker Daltonics® operado de modo positivo e negativo de ionização eletrospray com fragmentação. O modo positivo da ionização *eletrospray* seguiu as seguintes condições: voltagem do capilar 4,5 kV, voltagem do cone 500 V, temperatura 200 °C e faixa de detecção de massa m/z 50-1500. Esses mesmos parâmetros foram utilizados para o modo negativo, porém alterou-se as voltagens do capilar e cone para 3,2 kV e 400 V, respectivamente. Os parâmetros de MS/MS foram Auto MS/MS com a seleção dos íons precursores em ciclos de 3,0 s, excluindo a seleção após detecção de 2 espectros do mesmo íon ou após 0,60 min, reconsiderando sua seleção se a intensidade de íon precursor for o dobro do anterior. Para as fragmentações dos íons precursores foi utilizada uma rampa de energia de colisão de 20 a 50 eV.

4.7 Atividade Antidiabética *in vitro*

4.7.1 Ensaio de inibição de α -amilase

A triagem dos extratos etanólicos para inibição de α -amilase foi realizada usando o método descrito anteriormente por De Silva & Rupasinghe (2020), com algumas modificações. Esses ensaios e os seguintes foram realizados no laboratório do prof. Vasantha Rupasinghe da Dalhousie University. Este método baseia-se na quebra da ligação α de polissacarídeos pela α -amilase liberando além de maltotriose e glicose, o 2-cloro-*p*-nitrofenol, subproduto quantificado em espectrofotômetro. Exceto quando indicado de outra forma, as soluções foram preparadas em tampão fosfato de potássio 0,01 M contendo NaCl (60 mM) e azida de sódio (0,02% p/v), pH 6,8. As diferentes concentrações de EPED1, EPED2, EPCIN e PIC foram preparadas em tampão contendo 8% de etanol. A uma placa transparente de 96 poços, foram adicionados 20 μ L de amostra e 20 μ L de α -amilase de pâncreas suíno (4 U/mL em tampão). Após 10 min de incubação a 37 °C, adicionou-se 20 μ L de substrato 2-cloro-4-

nitrofenil- α -D-maltotriósido (5 mM). A mistura foi então incubada por 30 min a 37 °C para que a reação ocorresse. A reação foi terminada aumentando pH do meio por meio da adição de 80 μ L de solução de fosfato trissódico de pH 11 (1% m/v) para parar a atividade da enzima. Em seguida, a absorvância em 405 nm foi registrada usando o leitor de microplacas (Infinite® 200 PRO, TECAN, Suíça) para quantificar a quantidade de 2-cloro-*p*-nitrofenol liberada. A eficácia dos inibidores testados foi comparada com ACB, um medicamento antidiabético atualmente prescrito para inibição da α -amilase. O controle positivo foi uma mistura de enzima e substrato sem inibidores. O controle de amostra contendo amostra e tampão foi usado para eliminar a interferência de cor. O tampão foi usado como branco.

4.7.2 Ensaio de inibição de α -glicosidase

O ensaio de inibição da α -glicosidase foi realizado usando um método previamente descrito (SEKHON-LOODU; RUPASINGHE, 2019), com pequenas modificações. Este método baseia-se na quebra da ligação do substrato pela enzima liberando um subproduto de cor amarela (*p*-nitrofenol). Primeiro, as soluções foram preparadas em tampão fosfato de potássio 0,01 M (pH 6,8), salvo indicação em contrário. Várias concentrações de EPED1, EPED2, EPCIN e PIC foram preparadas em um tampão contendo 2,5% de etanol. A uma placa transparente de 96 poços, foram adicionados 120 μ L das amostras e 20 μ L de enzima α -glicosidase (0,35 U/mL). A placa foi incubada a 37 °C durante 15 min antes de adicionar 20 μ L de substrato 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (5 mM). A mistura foi então incubada a 37 °C por 15 minutos para que a reação ocorresse. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 80 μ L de carbonato de sódio (0,2 M em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8). A absorvância em 405 nm foi registrada usando um leitor de microplacas (Infinite® 200 PRO, TECAN, Suíça) para quantificar a quantidade de *p*-nitrofenol (*p*NP) liberada. ACB, um medicamento antidiabético usado como inibidor de α -glicosidase para DMT2, foi usado para fins de comparação. O controle positivo foi a mistura de enzima e substrato sem inibidores. O controle da amostra consistiu na mistura de amostra e tampão. O tampão foi usado como branco.

4.7.3 Ensaio de inibição da enzima dipeptidil dipeptidase humana (DPP-4)

O ensaio de inibição de DPP-4 foi realizado de acordo com um método estabelecido (DE SILVA; RUPASINGHE, 2020). Após a clivagem enzimática pelo DPP-4, a 7-amino-4-metilcumarina (AMC) é liberada e sua fluorescência pode ser usada para quantificar a

atividade da DPP-4 (<https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/34458.pdf>). Resumidamente, 20 μ L da amostra em diferentes concentrações, 20 μ L de solução de enzima recombinante humana DPP-4 (3,125 mU) e 50 μ L de substrato de bromidrato de Gli-Pro-7-amino-4-metilcumarina foram adicionados a uma placa de 96 poços. A mistura reacional foi incubada por 30 min no escuro a 37 °C. Em seguida, o produto fluorescente foi analisado em comprimentos de onda de excitação/emissão de 350/450 nm usando o leitor de microplacas (Infinite® 200 PRO, TECAN, Suíça). A sitagliptina (STG), um inibidor padrão de DPP-4, foi usada para comparar a eficácia dos extratos. O controle positivo consistiu numa mistura de enzima e substrato sem inibidores. O controle de amostra contendo amostra e tampão foi usado para eliminar a interferência de cor. O tampão foi usado como branco.

4.8 Culturas Celulares e Ensaio de Viabilidade Celular

As células BEAS-2B, MCF-10A e AML-12 foram adquiridas da American Tissue Type Culture Collection (ATCC; CRL-9609, CRL-10317 e CRL-2254) e cultivadas com meio específico. As células BEAS-2B foram cultivadas com meio LHC-9 a 37 °C em uma incubadora com 5% de CO₂. Os frascos de cultura (poliestireno T75) foram pré-revestidos com uma mistura de 0,01 mg/mL de fibronectina, 0,03 mg/mL de colágeno bovino tipo I e 0,01 mg/mL de albumina de soro bovino foram dissolvidos em meio LHC-9 durante a noite. As células MCF-10A foram cultivadas em meio de cultura Mammary Epithelial Basal Medium (MEBM) suplementado com kit de meio de crescimento de células epiteliais mamárias (Lonza) e células AML-12 em meio DMEM-F12 (ATCC) suplementado com Insulina-Transferrina-Selênio (ITS, GIBCO), 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina, Gibco) a 37 °C em uma incubadora de CO₂ a 5%. As células foram cultivadas até cerca de 70% de confluência no frasco de cultura, e passagens (<10) foram empregadas para todas as condições experimentais.

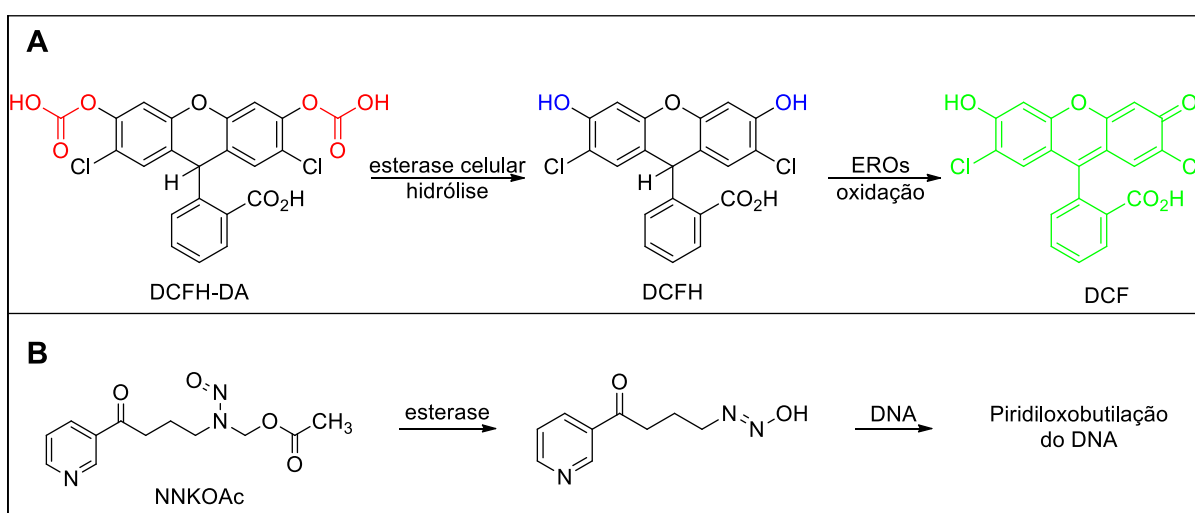
O ensaio de proliferação celular aquosa MTS Cell Titer 96™ foi usado para determinar a viabilidade celular (AMARARATHNA; HOSKIN; RUPASINGHE, 2020). As células BEAS-2B, AML-12 e MCF-10A foram tratadas com EPED1, EPED2, EPCIN e PIC em diferentes concentrações para determinar a dose não citotóxica (0 a 500 μ g/mL). Para isso, 1×10^4 células foram plaqueadas em uma placa de 96 poços com meio de crescimento de 100 μ L/poço. Após 24 h, as células foram tratadas com as amostras (EPED1, EPED2, EPCIN e PIC) por mais 24 h. Quinze microlitros de reagente MTS (com PMS) foram então adicionados a cada poço e incubados por 3 h no escuro. A absorvância foi registrada em 490 nm usando um leitor de microplacas (Infinite® 200 PRO, TECAN, Suíça). Para cada experimento, células

com meio DMSO serviram como controle e células com apenas meio de cultura e reagente MTS serviram como branco.

4.9 Medição do Nível de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) Intracelular

A geração de nível de EROs intracelular em células BEAS-2B, AML-12 e MCF-10A após os tratamentos foram medidos conforme descrito anteriormente (MERLIN *et al.*, 2021). Neste método, o corante DCFH-DA é prontamente absorvido pelas células sendo subsequentemente hidrolisado por esterase a DCFH (produto não fluorescente), o qual pode ser oxidado a diclorofluoresceína (DCF) produto fluorescente mensurável (Figura 19A). As células pré-tratadas com as amostras (EPED1, EPED2, EPCIN e PIC) por 3 h foram expostas a 3 h de carcinógeno (NNKOA) ou isoladamente em diferentes grupos experimentais.

Figura 19 – Mecanismo de ação do corante DCFA-DA para detecção de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs).



Fonte: Merlin *et al.* (2021).

NNKOA é um composto que é hidrolizado em metabolitos reativos, os quais se ligam covalentemente com o DNA para formar adutos e induzir o estresse oxidativo. Células com meio DMSO serviram como controle do veículo. Após os tratamentos, DCFH-DA foi adicionado às placas de cultura de células a uma concentração final de 5 μ M seguido por 40 min de incubação no escuro. A fluorescência de DCF foi então medida no comprimento de onda de excitação e emissão de 485 e 535 nm usando um leitor de microplacas (Infinite® 200 PRO, TECAN, Suíça).

4.10 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$) com três estudos independentes e usando o software Graph-Pad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD), e as análises de variância, ANOVA One Way seguida do teste de *Tukey* e $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas entre os grupos experimentais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos Extratos

Para as duas espécies de maracujá estudadas, a Tabela 2 apresenta o rendimento dos extratos a partir das extrações com hexano, seguida da extração com etanol (99%) de sementes secas e moídas (12 g). Neste trabalho, utilizou-se apenas o extrato obtido com etanol. O solvente hexano foi utilizado apenas para remover os compostos lipofílicos das sementes de maracujá, e assim obter a *torta*, o resíduo gerado pelas indústrias após a extração do óleo. O maior rendimento foi encontrado para a espécie de EPED1.

O cálculo do rendimento dos extratos é uma etapa crucial para o levantamento do custo e benefícios associados as aplicações futuras do extrato. Esperava-se que o rendimento do extrato hexânico fosse maior que o do etanólico, devido ao elevado teor de óleos presente em sementes. Neste trabalho, o rendimento da extração com hexano foi de 3 a 8 vezes maior que com etanol. De acordo com Khuwijitjary e Klinchongkon (2020) sementes de maracujá contém entre 18% a 28% de óleo por massa. Xavier *et al.* (2022) obteve rendimento ligeiramente maior (7,9%) ao extrair os compostos bioativos de sementes de *P. edulis* com etanol. Para garantir um maior rendimento dos extratos é necessário otimizar os parâmetros da extração, tais como temperatura e polaridade dos solventes.

Tabela 2 - Rendimento das extrações de sementes de maracujá secas e moídas (12 g) utilizando hexano e etanol em aparelho de Soxhlet.

Extrato	Rendimento (%)	
	Hexano	Etanol
EPED1	22,5	7,4
EPED2	24,0	3,8
EPCIN	15,5	1,9

Fonte: Autora (2021).

5.2 Caracterização Química do Extrato Etanólico de Sementes de Maracujá *P. edulis* Coletado em Alagoas

Até o momento foi realizada a determinação dos compostos majoritários presentes em EPED1 por meio da CLAE-DAD acoplado ao MS. A identificação dos compostos foi confirmada pelo perfil de fragmentação (CROTTI; LOPES; LOPES, 2005) e análise individual de reações de decomposição em fase gasosa (DEMARQUE *et al.*, 2016). Por fim,

os dados espectroscópicos e a comparação com a literatura foram usados para apoiar as propostas (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Compostos observados na análise por LC-MS no modo de ionização negativo.

Composto	Tr* (min)	λ (nm)	Fragmentos [M-H] ⁻ (m/z)	Massa exata (experimental)	Massa exata (calculada)	Erro (ppm)
Piceatanol	18,5	217; 321	10-25eV:243 → 201; 159	243,0701	243,0663	3,1
Astringina	17,4	217; 285; 320	10-25eV:405 → 243	405,1165	405,1191	6,5
Escirpusina B	21,0	203; 283; 328	10-25eV:485 → 375	485,1234	485,1242	1,7
Escirpusina A	22,4	217; 280; 326	10-25eV:469 → 359	469,1266	469,1293	5,7
Isookanina-7- O-glicosídeo	17,2	217; 279; 333	10-25eV:449 → 287	449,1069	449,1089	4,6

*Tr, tempo de retenção.

Fonte: Autora (2022).

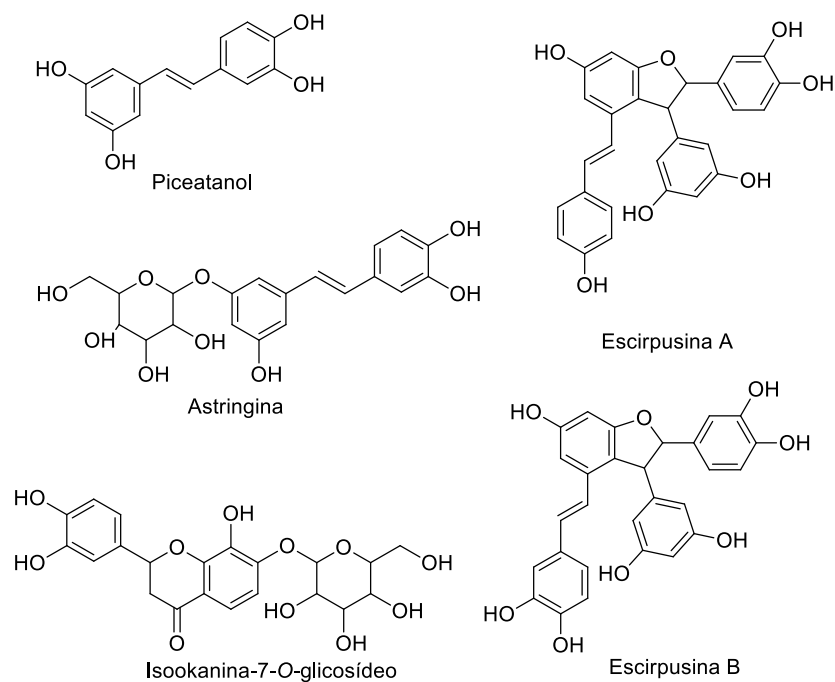
Tabela 4 - Compostos observados na análise por LC-MS no modo de ionização positivo.

Composto	Tr* (min)	λ (nm)	Fragmentos [M-H] ⁺ (m/z)	Massa exata (experimental)	Massa exata (calculada)	Erro (ppm)
Tirosina	0,9	255; 334	20-50eV:182 → 136;123	182,0847	182,0811	2,0
Fenilalanina	1,6	218; 266	20-50eV:166 →120;103;91	166,0869	166,0862	3,6
Naringenina-7- O-glicosídeo	10,7	208; 281; 326	20-50eV: 435 → 273	435,1281	435,1286	1,0
Derivado I do Quadrangulosídeo	39,4	224	20-50eV: 621 → 603;441	621,4331	621,4361	4,7
Derivado II do Quadrangulosídeo	37,9	224	20-50eV: 593 → 575;413	593,4012	593,4048	6,1

*Tr, tempo de retenção. Fonte: Autora (2021).

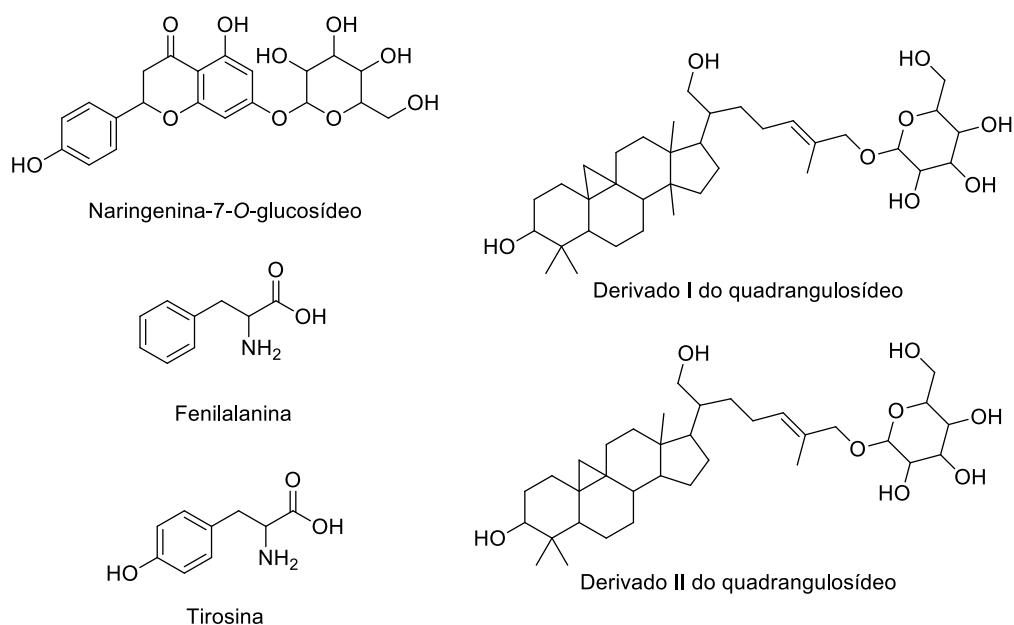
Foram identificados no total dez compostos, cujas estruturas moleculares estão descritas nas Figuras 20 e 21, sendo cinco delas, obtidas pelo emprego de CLAE-MS no modo de ionização negativo, são eles: piceatanol, astringina, escirpusina B, escirpusina A e isookanina-7-O-glicosídeo, cujos dados estão listados na Tabela 3.

Figura 20 - Estrutura molecular dos compostos observados na análise por LC-MS no modo de ionização negativo.



Fonte: Autora (2021).

Figura 21 - Estrutura molecular dos compostos observados na análise por LC-MS no modo de ionização positivo.



Fonte: Autora (2021).

Cinco compostos adicionais foram identificados via LC-MS no modo de ionização positivo. São eles: tirosina, fenilalanina, naringenina-7-O-glicosídeo e os derivados I e II da

saponina quadrangulosídeo (Tabela 4), sendo as três últimas já descritas para o gênero *Passiflora* (MARLENE *et al.*, 2005).

Mais de 110 compostos químicos já foram identificados no fruto, folhas, hastes, caules e cascas de espécies de *Passiflora*, incluindo flavonoides, triterpenoides, alcaloides, carotenoides e outros (HE *et al.*, 2020). A literatura reporta que extratos de *Passiflora* são ricos em PIC e escirpusina B (PAN *et al.*, 2020). O PIC, porém, tem atraído mais a atenção de pesquisadores devido aos importantes efeitos biológicos e alto teor; 4,8 mg/g ou 2,2 mg/g de PIC foram quantificadas em sementes de maracujá liofilizadas ou bruta, respectivamente (MATSUI *et al.*, 2010), que é considerado alto em comparação a outras fontes (KHUWIJTJARU; KLINCHONGKON, 2020).

O PIC é um composto fenólico derivado do estilbeno cujas atividades biológicas incluem proteção contra infecção do vírus da Zika (XAVIER *et al.*, 2022), efeitos antienvhecimento e hidratante (KHUWIJTJARU; KLINCHONGKON, 2020), promove a produção de colágeno (MATSUI *et al.*, 2010), atividade antioxidantes e antidiabética (KITADA *et al.*, 2017; UCHIDA-MARUKI *et al.*, 2015), prevenção contra doenças cardiovasculares e anticâncer (KERSHAW; KIM, 2017).

A escirpusina A e escirpusina B são dímeros do PIC. Estudos mostraram que a escirpusina B demonstrou ter potencial maior que o PIC nos ensaios de atividade de sequestro do radical DPPH• e ensaio de aorta torácica de rato *ex vivo* usado para avaliar o efeito vasorrelaxante (KHUWIJTJARU; KLINCHONGKON, 2020).

A naringenina é um flavonoide encontrado principalmente em frutas cítricas e é dotada de efeitos biológicos na saúde humana que incluem diminuição dos biomarcadores de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, promove o metabolismo de carboidratos, aumenta as defesas antioxidantes, elimina espécies reativas de oxigênio, modula a atividade do sistema imunológico e também é anti-inflamatório (SALEHI *et al.*, 2019).

As atividades biológicas de compostos químicos estão associadas as suas estruturas moleculares. O potencial sequestrador de compostos fenólicos está relacionado com o número de grupos hidroxila no anel aromático, bem como sua posição na molécula. Em geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior é a capacidade antioxidante. Flavonoides com grupos catecol no anel B são os mais reativos, esse grupo confere aos radicais ariloxila formados maior estabilidade, possivelmente por ligações de hidrogênio e eletrodeslocalização. Além disso, esses flavonoides podem ser agentes quelantes de metais de transição, os quais levam a formação de EROs por reação de Fenton (APAK *et al.*, 2007; LAZAROVA *et al.*, 2014).

5.3 Atividade Antioxidante

A Tabela 5 mostra que o CFT variou significativamente ($p < 0,05$) entre os extratos. Apesar de EPED1 e EPED2 serem extratos preparados a partir da mesma espécie de maracujá, EPED1 apresentou o maior CFT, o equivalente a $227 \pm 3,9$ mg de EAG/g de extrato seco, e o EPED2 o menor conteúdo, sendo este $131 \pm 3,4$ mg de EAG/g de extrato seco.

A atividade antioxidante foi avaliada usando três métodos diferentes: sequestro de DPPH[•], HOCl e O₂^{•-}. O ensaio de sequestro de DPPH[•] revelou que a capacidade antioxidante de EPED2 e EPCIN é maior que a de EPED1. Além disso, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de IC₅₀ do PIC e QCT.

Com relação à capacidade de sequestro de HOCl, tanto EPED1 quanto o PIC se destacaram, pois exibiram forte atividade antioxidante, com IC₅₀ de $1,7 \pm 0,3$ e $1,2 \pm 0,5$ µg/mL, respectivamente. Tais atividades foram semelhantes à exibida pela QCT ($1,9 \pm 0,3$ µg/mL). Com relação à capacidade de sequestro do O₂^{•-}, o PIC apresentou o maior potencial, seguido da QCT e EPED1. Portanto, PIC pode ser um importante composto fenólico em sementes de maracujá, pois em todos os ensaios, o PIC apresentou baixo valor de IC₅₀.

Tabela 5 - Conteúdo de fenóis totais (CFT) e atividade antioxidante do extrato etanólico de sementes de maracujá e compostos padrões.

Amostra	CFT (mg de EAG/g de extrato seco)	DPPH [•] - IC ₅₀ (µg/mL)	HOCl - IC ₅₀ (µg/mL)	O ₂ ^{•-} - IC ₅₀ (µg/mL)
EPED1	$227 \pm 3,9^a$	$20,4 \pm 2,1^a$	$1,7 \pm 0,3^a$	$38,2 \pm 0,5^a$
EPED2	$131 \pm 3,4^c$	$12,4 \pm 0,9^b$	$3,5 \pm 1,0^{cd}$	-
EPCIN	$157 \pm 1,5^b$	$11,9 \pm 1,8^b$	$6,9 \pm 0,9^{bc}$	-
QCT	-	$4,8 \pm 1,0^c$ (15,9)	$1,9 \pm 0,3^{ad}$ (4,0)	$8,8 \pm 0,3^b$ (29,2)
PIC	-	$6,3 \pm 1,3^c$ (25,8)	$1,2 \pm 0,5^a$ (7,8)	$7,3 \pm 0,02^c$ (30,1)

EPED1, *Passiflora edulis* de Alagoas, EPED2, *P. edulis* da Bahia, EPCIN, *P. cincinnata* de Alagoas; PIC, piceatanol; QCT, quercetina; PIC, piceatanol; DPPH[•], 1,1-difenil-2-picrilhidrazil; EAG, equivalentes de ácido gálico; *a-d*, média $\pm$ SE seguida de letras diferentes dentro da mesma coluna representam diferenças significativas (teste de Tukey, $p < 0,05$). Os dados são as médias da triplicata.

Fonte: Autora (2022).

Morais *et al.* (2015) mostraram que sementes de maracujá são ricas em compostos fenólicos (0,76 mg EAG/g massa seca) e demonstraram as maiores atividades antioxidantes no ensaio FRAP (119,32 µmol FeSO₄/g massa seca) quando comparados a polpa, casca crua, casca seca em estufa e casca liofilizada (0,27, 0,60, 0,27 e 0,46 mg EAG/g massa seca, respectivamente), e atividade antioxidante com menor valor de IC₅₀ (DPPH[•]) de 49,71 µg/mL que a polpa (869,05 µg/mL), casca crua (347,56 µg/mL), casca seca em estufa (371,14 µg/mL) e casca liofilizada (225,29 µg/mL).

Yepes e colaboradores (2021) relataram outros valores de CFT (0,37 g EAG/g extrato) ao estudarem o extrato etanólico de sementes de maracujá roxo. Recentemente, Rotta *et al.*, (2020) obtiveram resultados semelhantes ao deste trabalho (250 ± 20 mg EAG/g para CFT e 19 ± 3 µg/mL para DPPH*) em extratos de sementes de *P. edulis* preparados com etanol:solução aquosa (70:30, v/v) a 80 °C por 4 h. Até o momento não foi publicado nenhum trabalho que avaliasse a capacidade de sequestro do HOCl de extratos de semente de maracujá, sendo este, portanto o primeiro.

Na literatura existe um número grande de trabalhos que mostram uma correlação direta entre o CFT e a atividade antioxidante de diferentes produtos naturais (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Além disso, diferente do que se esperava, os resultados de EPED1 e EPED2 foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) para as três análises listadas na Tabela 55. Isto, provavelmente, se deve à influência de um conjunto de fatores, tais como temperatura, estação, estágios de maturidade, origem geográfica, condições climáticas e solo, os quais podem afetar a composição química das plantas (ZARGOOSH *et al.*, 2019).

Os resultados dos ensaios antioxidantes indicam que o extrato etanólico de sementes de maracujá, em especial *P. edulis*, possui potencial para combater espécies reativas, em especial de oxigênio e, conseqüentemente, minimizar os efeitos deletérios causados por essas espécies no corpo. Vale ressaltar que, os resultados obtidos neste trabalho indicam a importância da região escolhida para coletar os resíduos de sementes das espécies para garantir uma padronização em sua composição e, conseqüentemente, das atividades antioxidantes.

5.4 Atividade Antidiabética

O potencial antidiabético *in vitro* de EPED1, EPED2, EPCIN e PIC foi avaliado através da inibição das enzimas digestivas α -amilase e α -glicosidase, e enzima DPP-4. Neste estudo, ACB e STG foram usados para fins de comparação. Todas as amostras testadas mostraram atividade contra as enzimas α -amilase, α -glicosidase e DPP-4 de maneira dependente da concentração (Tabela 6).

Como se pode observar na Tabela 6, dentre todos os extratos testados para inibição da enzima α -amilase, EPED1 e EPED2 destacaram-se com os menores valores de IC₅₀, $32,1 \pm 2,7$ e $38,5 \pm 4,0$ µg/mL, respectivamente; enquanto EPCIN apresentou menor potencial de inibição com IC₅₀ de $210,4 \pm 12,2$ µg/mL. Vale destacar que EPED1 e EPED2 apresentaram potenciais de inibição maiores quando comparadas a PIC. Adicionalmente, todas as amostras exibiram IC₅₀ maiores que ACB (IC₅₀ = $0,4 \pm 0,05$ µg/mL).

Tabela 6 - Atividade antidiabética *in vitro* de extratos etanólicos de sementes de maracujá.

Amostra	α -amilase - IC ₅₀ (μ g/mL)	α -glicosidase - IC ₅₀ (μ g/mL)	DPP-4 - IC ₅₀ (μ g/mL)
EPED1	32,1 $\pm$ 2,7 ^c	76,0 $\pm$ 1,9 ^B	71,1 $\pm$ 2,6 ^g
EPED2	38,5 $\pm$ 4,0 ^c	109,2 $\pm$ 10,7 ^B	473,1 $\pm$ 8,7 ^f
EPCIN	210,4 $\pm$ 12,2 ^a	239,2 $\pm$ 27,3 ^A	NA
PIC	85,4 $\pm$ 0,7 ^b (349,7)	20,4 $\pm$ 7,6 ^C (83,5)	1.206,5 $\pm$ 19,1 ^e (4939,8)
ACB	0,4 $\pm$ 0,05 ^d (0,6)	251,6 $\pm$ 4,5 ^A (389,7)	-
STG	-	-	0,005 $\pm$ 0,0005 ^h (0,01)

EPED1, *Passiflora edulis* de Alagoas, EPED2, *P. edulis* da Bahia, EPCIN, *P. cincinnata* de Alagoas; PIC, piceatanol; ACB, acarbose; STG, sitagliptina; NA, não foi possível calcular o IC₅₀; a-d, A-D, g-h, média $\pm$ SD seguida de letras diferentes dentro do mesmo ensaio representam diferenças significativas (teste de Tukey, $p < 0,05$). Dados em parênteses (μ M). Os dados são as médias da triplicata.

Fonte: Autora (2022).

Ao contrário do obtido para α -amilase, os valores de IC₅₀ de todas amostras testadas para inibição da enzima α -glicosidase foram estatisticamente menores ou iguais ($p \leq 0,05$) a ACB (IC₅₀ = 251,6 $\pm$ 4,5 μ g/mL). Além disso, PIC mostrou-se ser 4 e 12 vezes mais potente que EPED1 e EPCIN, respectivamente, e 12 vezes mais potente que ACB. EPED1 apresentou valor de IC₅₀ quase 3 vezes menor que PIC na α -amilase, porém aproximadamente 4 vezes maior no ensaio de α -glicosidase.

Para a inibição da enzima recombinante humana DPP-4, dentre os extratos testados, EPED1 exibiu o menor valor de IC₅₀. Não foi possível calcular o IC₅₀ para EPCIN devido à baixa solubilidade do extrato nas concentrações testadas. Observa-se que para atuar como inibidor de enzimas DPP-4, a concentração de PIC devem ser extremamente alta quando comparada a STG, o IC₅₀ do PIC é 1.206,5 $\pm$ 19,1 μ g/mL enquanto do STG 0,005 $\pm$ 0,001 μ g/mL.

Comparando com os dados da literatura relacionados a resíduos de maracujá, Cao e colaboradores (2021) reportaram que o extrato etanólico da casca híbrida de maracujá teve um efeito inibitório fraco na α -amilase (1,8 $\pm$ 0,1 mg/L), mas um efeito mais forte frente a α -glicosidase (0,6 $\pm$ 0,1 mg/mL), porém o IC₅₀ foi 4,3 vezes maior do que o composto de referência ACB (0,1 $\pm$ 0,3 mg/mL).

A atividade hipoglicêmica de extratos etanólicos de sementes, casca e polpa de 10 espécies nativas de *Passiflora* da Colômbia foi estudada por Loizzo e colaboradores (2019). Dentre todos os extratos estudados, sementes + polpa de *P. ligularis* tiveram a maior atividade com valores de IC₅₀ de 22,6 e 24,8 μ g/mL contra α -amilase e α -glicosidase, respectivamente, seguido por *P. pinnatistipula*, valores de IC₅₀ de 46,4 e 37,7 μ g/mL contra α -amilase e α -glicosidase, respectivamente.

Curiosamente, o mesmo padrão obtido por Cao *et al.*(2021) e Loizzo *et al.* (2019) foi obtido neste trabalho: extratos de plantas exibem maior potencial ao inibir a ação de enzimas α -glicosidase que de enzimas α -amilase.

Outro trabalho avaliou o potencial antidiabético de folhas de *Annona muricata*, ricas em compostos fenólicos. Estas folhas são frequentemente utilizadas por brasileiros no tratamento de diabetes *mellitus* e suas complicações. As frações EtOAc e BuOH do extrato etanólico de folhas de *A. muricata*, ricas em compostos fenólicos, apresentaram um bom potencial de inibição da α -amilase (IC_{50} $9,2 \pm 2,3$ e $6,1 \pm 1,6$ $\mu\text{g/mL}$), α -glicosidase (IC_{50} $413,1 \pm 121,1$ e $817,4 \pm 87,9$ $\mu\text{g/mL}$), respectivamente, ainda que menor que o padrão ACB (IC_{50} 0,05 para α -amilase e 3,4 $\mu\text{g/mL}$ para α -glicosidase) (BENATTI *et al.*, 2018).

Sekhon-Loodu e Rupasinghe (2019) avaliaram o potencial antidiabético de extratos aquosos e etanólicos preparados a partir de cinco plantas medicinais da região norte de Newfoundland no Canadá. Entre eles, o extrato etanólico de *Myrica gale* L., uma planta usada para tratamento de problemas digestivos, apresentou a maior inibição da α -amilase e α -glicosidase (IC_{50} = 27 mg/L) quando comparada ao ACB (IC_{50} = 89 mg/L), além disso, apresentou maior teor de fenóis totais (UPLC-MS/MS) (237,7 mg/L).

Devido à variedade de mecanismos pelos quais a normoglicemia pode ser alcançada, vários testes podem ser realizados para avaliar o potencial antidiabético de produtos naturais. Geralmente, são utilizados os testes de inibição da α -amilase e α -glicosidase, bem como a inibição de DPP-4. Dito isso, EPED1, EPED2, EPCIN e PIC podem atuar como inibidores da α -amilase/ α -glicosidase. Contudo, os dois primeiros extratos também podem atuar na inibição de DPP-4. Embora ACB e STG sejam mais eficazes na inibição de α -amilase/ α -glicosidase e DPP-4, respectivamente, em termos de concentração, não há necessidade de rejeitar os extratos, em especial, EPED1 e EPED2, e composto puro (PIC), uma vez que estes também são eficazes, mesmo o PIC apresentando alto valor de IC_{50} frente a DPP-4. Fatores como custo, segurança e efeitos colaterais devem ser investigados, pois o grande problema dos medicamentos atuais são os efeitos colaterais críticos associados ao uso contínuo dos mesmos (SEKHON-LOODU; RUPASINGHE, 2019; TUPAS *et al.*, 2019).

Extratos vegetais ricos em polifenóis e polifenóis puros têm sido amplamente estudados como alternativa ou complemento aos medicamentos hipoglicemiantes atuais. Estudos *in vitro* demonstraram que os polifenóis interagem com enzimas e amido. A interação depende da composição, peso molecular e posição dos grupos hidroxila dos compostos bioativos (SUN; MIAO, 2020).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que, apesar do PIC ser um dos compostos fenólicos majoritários do extrato etanólico de sementes de maracujá, ele provavelmente não é o principal composto com atividade inibitória contra a α -amilase. Pode-se haver um efeito sinérgico entre os compostos bioativos do extrato etanólico de semente de maracujá fazendo com que o seu potencial seja maior que o PIC na inibição da α -amilase.

Por outro lado, a resposta do PIC frente à enzima digestiva α -glicosidase foi maior que dos extratos etanólicos testados, sugerindo que PIC seja um composto chave contra a atividade catalítica da enzima digestiva α -glicosidase. A pesquisa desenvolvida por Pan e colaboradores (2020) mostrou que o PIC e seus derivados isolados do extrato etanólico da semente de *P. edulis* Sims, tais como escipurcina B, exibiram potente inibição contra α -glicosidase *in vitro* com valores de IC_{50} variando de 1,7 a 35,1 μ M. Dentre eles, o IC_{50} do PIC foi $4,3 \pm 0,07 \mu$ M, enquanto o da ACB foi $218 \pm 3,14 \mu$ M. Porém, quando comparado ao presente trabalho, tais valores de IC_{50} são bem distintos. Isto deve-se provavelmente a diferença na metodologia aplicada na determinação da atividade, dentre elas solvente utilizado para dissolver as amostras, concentração das enzimas e tempo de incubação.

Um estudo recente indicou que o PIC inibiu a formação de *p*NP pela α -glicosidase através de interações hidrofóbicas e ligação de hidrogênio entre grupos hidroxila e resíduos de aminoácidos em um mecanismo não competitivo. A formação do complexo PIC- α -glicosidase pode induzir alterações na conformação da enzima, alterando sua função de digestão de carboidratos (JIANG *et al.*, 2020).

5.5 Potencial Antiglicante

5.5.1 Inibição do estágio inicial e intermediário da glicação

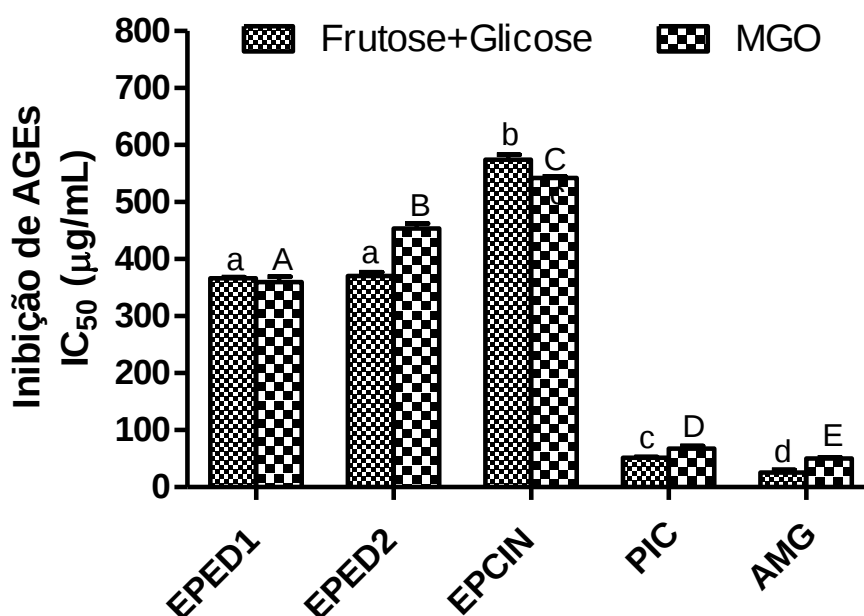
A glicação de BSA foi realizada na presença e ausência de EPED1, EPED2, EPCIN, PIC e AMG (controle positivo). A inibição dos estágios inicial e intermediário da glicação foi realizada usando uma mistura de açúcares redutores (frutose + glicose) e MGO, respectivamente.

O efeito inibidor da formação de AGEs foi proporcional à concentração da amostra (Figura 22). O PIC apresentou maior atividade quando comparada aos extratos. PIC foi capaz de inibir a formação de AGEs fluorescentes durante sete dias de incubação a 37 °C com IC_{50} de $51,5 \pm 1,4 \mu$ g/mL para modelo BSA/frutose + glicose e $67,4 \pm 4,6 \mu$ g/mL para BSA/MGO, respectivamente. Não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre EPED1 e EPED2 para inibição da glicação de BSA com frutose + glicose.

O potencial antiglicante de extratos etanólicos de sementes de maracujá ainda não foram publicados. A literatura reporta apenas dados de atividade antiglicante de extratos obtidos a partir de folhas de maracujá. Por exemplo, o extrato hidroalcólico de folhas *P. alata* mostrou inibição significativa da formação de AGEs nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. Em contraste, o extrato de *P. edulis* mostrou inibição significativa da formação de AGEs apenas na concentração de 10 µg/mL (RUDNICKI *et al.*, 2007).

Em 2015 foi publicado um artigo de revisão sobre glicação, estresse carbonílico e inibidores de AGEs, no qual está descrito algumas patentes de inibidores de AGEs derivados de plantas, incluindo cúrcuma, rutina, luteolina e α -tocoferol (JAHAN; CHOUDHARY, 2015).

Figura 22 - Atividade antiglicante do extrato etanólico de sementes de maracujá e compostos de referência.



EPED1, *Passiflora edulis* de Alagoas, EPED2, *P. edulis* da Bahia, EPCIN, *P. cincinnata* de Alagoas; PIC, piceatanol; AMG, aminoguanidina; MGO, metilglioxal; modelo BSA/frutose + glicose e BSA/MGO; AGE, produtos finais glicação avançada (AGEs); média ± SD seguida de letras diferentes no mesmo ensaio representam diferenças significativas (teste de Tukey, $p \leq 0,05$). Os dados são médias da triplicata.

Fonte: Autora (2022).

O antioxidante cúrcuma mostrou-se ser o mais eficaz por inibir a formação de AGEs via um número maior de mecanismos: diminuição do nível de glicose no sangue, diminuição do acúmulo de colágeno AGE-modificado e diminuição de *cross-linking* de colágeno (JAHAN; CHOUDHARY, 2015). À medida que o grau de glicação da BSA por glicose

aumentou durante incubação por três semanas, o tratamento com cúrcuma (1 mM) reduziu significativamente a formação de AGEs em 52% (KIM; KIM, 2017).

Outro trabalho demonstrou o excelente potencial antiglicante de extrato hidroalcolico de própolis de duas regiões da Bahia, Ribeira do Pombal (IC_{50} de $16,5 \pm 0,4$ $\mu\text{g/mL}$) e Tucano (IC_{50} de $19,2 \pm 1,1$ $\mu\text{g/mL}$). Estas concentrações foram apenas 2,5 vezes maior que o IC_{50} do controle positivo AMG ($7,7 \pm 0,6$ l $\mu\text{g/mL}$) (XAVIER *et al.*, 2017). O PIC possui um elevado potencial antiglicante quando comparado ao extrato de própolis, o qual foi apenas 2 vezes menor do que AMG no estágio inicial de glicação e 1,3 vezes menor no estágio intermediário.

Zhang, Wang e Liu (2020) observaram que após a reação com MGO robinina, procianidinas, luteolina, quercetina, crisoeriol, kaempferol, genisteína, apeginina e rutina apresentaram captura valores percentuais de 54,4, 46,3, 40,7, 21,4, 41,8, 58,9, 43,4, 36,5, 49,3, respectivamente, valores inferiores aos encontrados neste trabalho para o PIC. Em outro estudo, com extrato etanólico de casca de cebola, foi observada uma eliminação de aproximadamente 70% do MGO após 1 h de reação, um excelente potencial de captura (KIM *et al.*, 2017). Enquanto os extratos metanólicos de bagas e uvas, mostraram entre 20-50% do potencial de captura de MGO. Framboesa apresentou 20%, morango 30%, amora 45%, cranberry, mirtilo e uva nobre 50% de captura após 1 h de reação com MGO (WANG *et al.*, 2011).

Ainda, os extratos etanólicos de sementes de maracujá (EPED1 e EPED2) e o composto puro PIC podem atuar como agentes antiglicantes, provavelmente impedindo a reação de compostos (di)carbonilados de se ligarem à proteína e, assim, evitando o acúmulo de AGEs.

5.5.2 Captura de MGO por derivatização com OPD

A Tabela 7 apresenta os dados referentes a porcentagem de MGO remanescente no sistema reacional. Esses dados foram obtidos a partir dos cromatogramas para o sistema contendo MGO e OPD, como também para os sistemas contendo MGO e extratos durante 1 hora de reação seguida da adição de OPD. Vale ressaltar que a porcentagem de MG remanescente foi calculada considerando o sistema controle como 100%.

Ao investigarmos o potencial de captura de MGO para os três extratos etanólicos avaliados foi observado a diminuição na intensidade do pico correspondente ao produto de derivatização de MGO com OPD. Para 1 hora de incubação de MGO com os extratos de EPED1, EPED2 e EPCIN, os valores para porcentagem de MGO remanescente foram de 78,1,

71,4 e 52,1%, respectivamente. Isto indica o bom potencial do extrato, em especial, de EPCIN, em capturar MGO, e o elevado potencial do PIC. Observa-se que este valor é menor que ao do padrão AMG que apresentou 0,4 % MGO remanescente.

Esses resultados evidenciam que os três extratos podem atuar na etapa intermediária de glicação, capturando compostos dicarbonílicos, como glioxal e MGO, e desta forma inibindo a reação com grupos aminos de biomoléculas por meio da formação dos AGEs. Esses resultados indicam que EPED1, EPED2, EPCIN e PIC é capaz de atuar no estágio intermediário da glicação, estabilizando espécies carboniladas reativas como o MGO e, conseqüentemente, reduzindo a formação de AGEs. Porém, o composto puro PIC apresentou maior potencial de captura de MGO, sendo 24,9% a porcentagem de MGO não capturada pelo PCI. O estágio intermediário da reação de glicação leva à formação de espécies carbonílicas reativas, como MGO, que por sua vez reagem com grupos amino de biomoléculas para a formação de AGEs (RABBANI; XUE; THORNALLEY, 2021).

Tabela 7 - Dados cromatográficos referentes a determinação da captura de MGO por meio da derivatização com OPD para os sistemas avaliados.

Sistema	% de MGO remanescente
PBS + MGO + OPD	0,0
AMG + MGO + OPD	0,4
EPED1 + MGO + OPD	78,1
EPED2 + MGO + OPD	71,4
EPCIN + MGO + OPD	52,1
PIC + MGO + OPD	24,9

EPED1, *Passiflora edulis* de Alagoas, EPED2, *P. edulis* da Bahia, EPCIN, *P. cincinnata* de Alagoas; PBS, tampão fosfato salino pH 7,4; MGO, metilglioxal; AMG, aminoguanidina; OPD, orto-fenilenodiamino.

Fonte: Autora (2022).

Além disso, embora a via clássica da reação de Maillard esteja bem estabelecida como um gatilho para a formação de AGEs, todas as reações que levam à formação de compostos α,β -dicarbonílicos no organismo também contribuem para a formação de AGEs (TORRES *et al.*, 2018). Assim, a capacidade de captura de MGO, um composto dicarbonílico produzido durante a glicação, é um passo importante contra a formação de AGEs.

5.5.3 Efeito sob a formação de fibrilas amiloides *in vitro*

A glicação de proteínas desempenha um papel importante no desencadeamento da agregação de proteínas, através da formação de estruturas β reticuladas que, por sua vez, levam à formação de fibrilas amiloides (TAGHAVI *et al.*, 2017). Assim, o potencial dos extratos e PIC para inibir a formação de fibrilas amiloides foi avaliado em dois sistemas

diferentes, um com BSA na presença de glicose e frutose (BSA/Fru + Gli) e outro na presença de MGO (BSA/MGO). O ensaio de fluorescência ThT foi usado como um indicador geral para a formação de fibrilas amiloides.

A formação de fibrilas β -amiloides diminuiu à medida que a concentração da amostra aumentou para ambos os sistemas, atingindo 100% de inibição em concentrações mais altas testadas (400 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 8). Por exemplo, o sistema BSA/Fru+Gli tratado com 200 $\mu\text{g/mL}$ de EPED1 e PIC preveniu, respectivamente; 87,4 e 100% da formação de fibrilas β -amiloides durante a glicação. Da mesma forma, maior inibição foi obtida quando o sistema BSA/MGO foi tratado com 200 $\mu\text{g/mL}$ de EPED1 (71,9%) e PIC (100%). Nossos achados sugerem que compostos presentes em extratos etanólicos de sementes de maracujá podem proteger a estrutura proteica, uma vez que o tratamento com EPED1 e PIC diminuiu a formação de fibrilas amiloides na BSA.

Tabela 8 - Porcentagem de inibição de fibrilas amiloides em albumina do soro bovino (BSA) submetida a glicação com frutose e glicose (Fru+Gli) ou metilglioxal (MGO).

Sistema	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição (%) BSA/Fru+Gli	Inibição (%) BSA/MGO
EPEE1	300	94,3	100
	200	87,4	71,9
EPED2	300	92,0	77,7
	200	83,6	14,1
EPCIN	300	nd	nd
	200	nd	nd
PIC	100	100	100
	200	100	100
AMG	100	35,0	30,3

EPED1, *Passiflora edulis* de Alagoas, EPED2, *P. edulis* da Bahia, EPCIN, *P. cincinnata* de Alagoas; PCI, piceatanol; AMG, aminoguanidina nd., não detectada nas concentrações indicadas.

Fonte: Autora (2022).

5.6 Viabilidade Celular Pelo Método de MTT

A detecção da citotoxicidade dos componentes visa avaliar sua segurança, o que é importante no desenvolvimento de medicamentos, nutracêuticos ou suplementos alimentares. Atualmente, diversas técnicas têm sido desenvolvidas e aplicadas para a avaliação da viabilidade celular. Para determinar de forma precisa e quantitativa a viabilidade celular, foi utilizado o MTT para discriminar entre células vivas e mortas. O MTT é uma sonda colorimétrica de tetrazólio que pode ser reduzido a formazan pelo fluxo NADH/NADPH durante o metabolismo de células vivas e, portanto, têm sido amplamente utilizados para determinar a porcentagem de células viáveis (KAMILOGLU *et al.*, 2020).

Quando a viabilidade celular é superior a 90%, a amostra é considerada atóxica em uma determinada dose (SJÖGREN; SLETTEN; DAHL, 2000). A Figura 24 mostra que os declínios responsivos à dose em células cultivadas BEAS-2B, AML-12 e MCF-10A foram observados com o aumento das concentrações de EPED1 e PIC ($p \leq 0,05$).

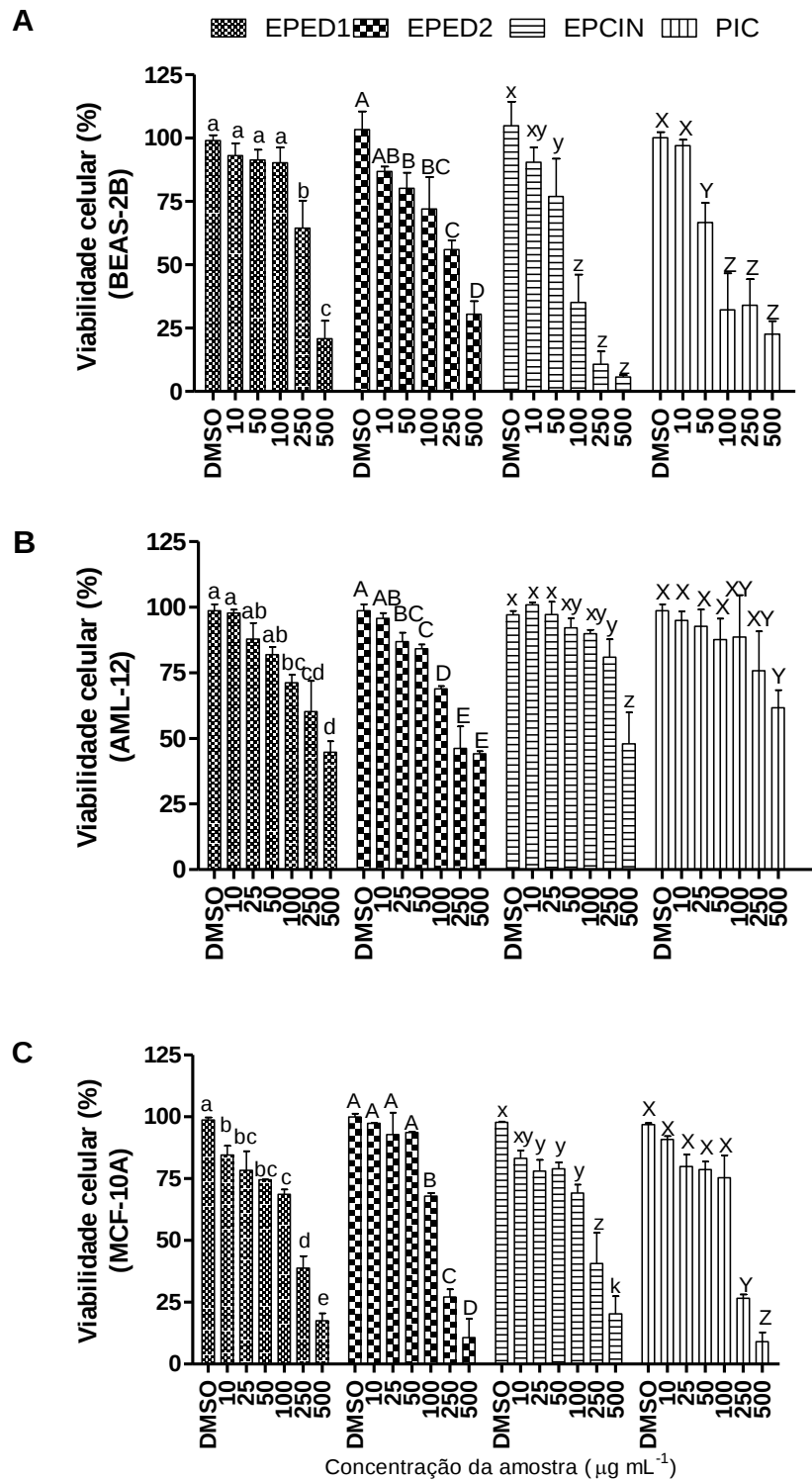
O EPED1 não diminuiu a viabilidade das células BEAS-2B até uma concentração de 100 µg/mL, enquanto nas células AML-12 e MCF-10A a viabilidade celular foi reduzida para 75% nessa concentração. EPED2 em concentrações menores que 50 µg/mL manteve as células MFC-10A viáveis. EPCIN manteve a viabilidade celular até 250 µg/mL.

A PIC manteve a viabilidade das células AML-12A até 250 µg/mL. Enquanto na presença de células MCF-10A, a viabilidade foi mantida acima de 80% até 100 µg/mL. As células BEAS-2B parecem ser mais sensíveis ao PIC, com redução de aproximadamente 50% da viabilidade celular na concentração de 100 µg/mL. Apesar da viabilidade de algumas células variar conforme a concentração da amostra, EPED1 não reduziu a viabilidade celular de BES-2B nas concentrações necessárias para exercer o potencial antioxidante e inibição da α -amilase, α -glicosidase e inibição de DPP-4. Além disso, as células AML-12A e MCF-10A manteve-se viáveis quando tratadas com PIC em concentrações menores que 100 µg/mL, ou seja, PIC é atóxico para células nas concentrações em que o PIC atua como antioxidante (entre $1,2 \pm 0,5$ µg/mL a $7,3 \pm 0,02$ µg/mL), antidiabético ($20,4 \pm 7,6$ µg/mL para α -amilase e $85,4 \pm 0,7$ µg/mL para α -glicosidase) e antiglicante ($51,5 \pm 1,4$ µg/mL no sistema BSA/Fru+Gli e $67,4 \pm 4,6$ µg/mL no sistema BSA/MGO).

Yepes e colegas relataram que o extrato etanólico de sementes de maracujá roxo em concentrações de 1000 e 4000 µg/mL não diminuiu a viabilidade das células leucocitárias humanas, o que contrasta com os resultados do presente estudo (YEPES *et al.*, 2021). Outro estudo afirmou que um extrato de semente de maracujá amarelo desengordurado obtido usando extração líquida pressurizada diminuiu significativamente a viabilidade em todas as linhagens celulares de câncer de próstata (PC-3, 22Rv1, LNCaP e VCaP) de maneira dose (10, 20, e 30 µM) e tempo dependente (KIDO *et al.*, 2020).

A citotoxicidade do extrato etanólico de sementes de maracujá foi investigado na linhagem celular Vero E6 e não foi observado nenhuma diminuição na viabilidade celular, contudo na concentração mais alta testada (100 µg/mL) houve um aumento na viabilidade, o que de acordo com os autores pode estar relacionado a um possível aumento na proliferação ou atividade mitocondrial). Também foi testada a viabilidade celular de células HTR-8/SVneo placentárias humanas na presença do extrato, também sem redução na viabilidade celular em qualquer concentração utilizada (100 µg/mL) (XAVIER *et al.*, 2022).

Figura 23 - Efeito dose-dependente do extrato etanólico de sementes de maracujá na viabilidade de células epiteliais brônquicas humanas normais (BEAS-2B), células normais de fígado de camundongo alfa (AML-12) e células epiteliais mamárias não malignas (MCF-10A) após 24 h de incubação.



DMSO, dimetilsulfóxido controle a 0,5 %, EPED1, *Passiflora edulis* de Alagoas, EPED2, *P. edulis* de Bahia, EPCIN, *P. cincinnata* de Alagoas; PIC, piceatanol. a-c, A-D, x-z, X-Z, média $\pm$ SP seguido de letras diferentes dentro da mesma amostra representam diferenças significativas (teste de Tukey, $p < 0,05$). Os dados são médias da triplicata.

Fonte: Autora (2022).

A hiperglicemia está bem documentada como tendo efeitos a longo prazo em vários órgãos, incluindo rins, coração, cérebro, fígado e olhos. O diabetes também afeta a função pulmonar ao induzir processos inflamatórios e alterações fibróticas no tecido (TALAKATTA *et al.*, 2018). Aqui, nossos resultados sugerem que EPED1 e PIC são relativamente seguros para células normais do fígado e do pulmão e, portanto, podem não ser prejudiciais aos órgãos e tecidos. No entanto, extensas avaliações toxicológicas usando modelos animais experimentais precisam ser realizadas.

5.7 Detecção de EROs Total Intracelular

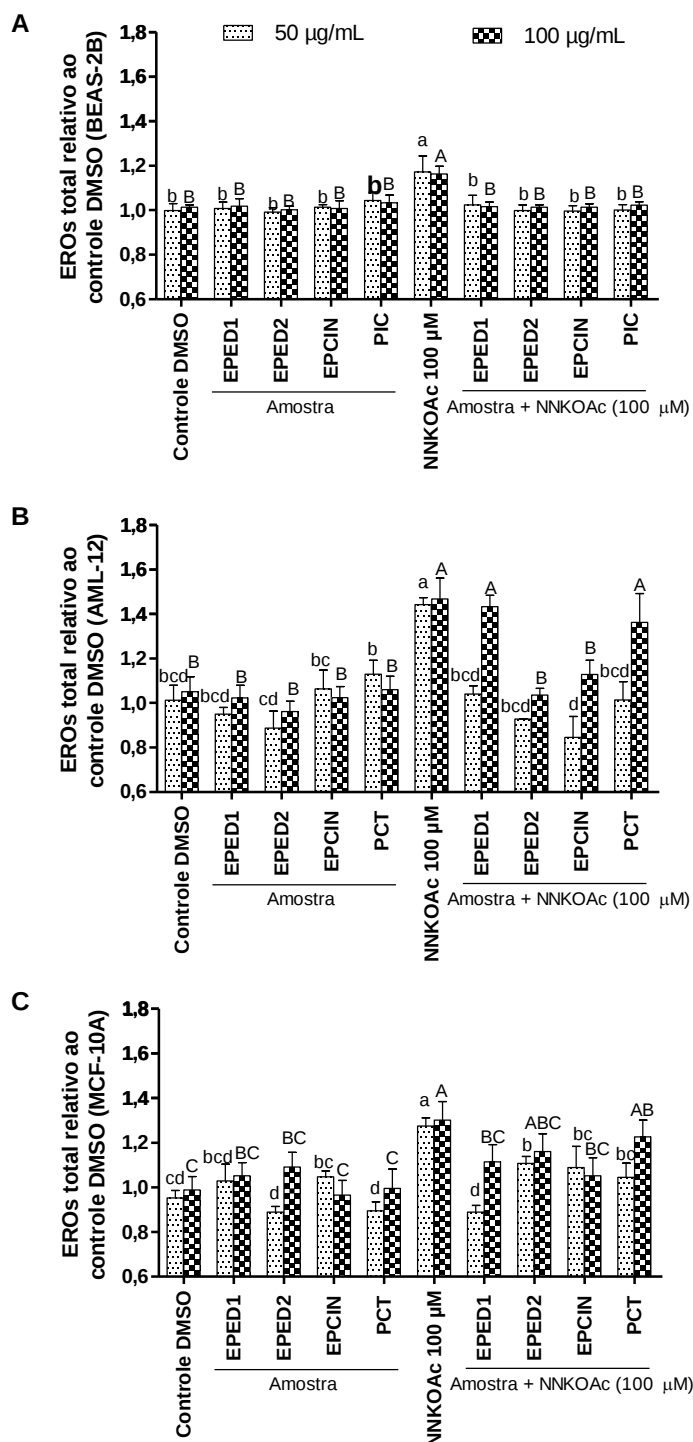
Os efeitos pró-oxidantes e antioxidantes de EPED1, EPED2, EPCIN e PIC foram investigados em três linhagens celulares distintas (BEAS-2B, AML-12 e MCF-10A). Estas células foram expostas a um agente químico carcinógeno (NNKOAc, 100 μ M) isoladamente ou foram pré-tratadas com as amostras antes de serem expostas ao NNKOAc.

A Figura 25 mostra que EPED1, EPED2, EPCIN e PIC a 50 e 100 μ g/mL não induziram a formação de EROs. Todas as células expostas a apenas 100 μ M de NNKOAc induziram a formação de EROs quando comparadas ao controle ($p \leq 0,05$), sendo esta produção mais pronunciada nas células AML-12 e MCF-10A.

Ainda, observa-se na Figura 22 que EPED1, EPED2, EPCIN e PIC a 50 e 100 μ g/mL foram capazes de proteger as células BEAS-2B cultivadas do estresse oxidativo causado pelo carcinógeno. Além disso, todas as amostras, nas concentrações de 50 μ g/mL, preveniram o estresse oxidativo nas células AML-12 e MCF-10A. No entanto, EPED1 e PIC a 100 μ g/mL não foram capazes de prevenir a geração de EROs nas células AML-12 com NNKOAc. EPED2 e PIC nestas mesmas concentrações também não protegeram as células MFC-10A dos efeitos do carcinógeno.

Há muito se reconhece que a hiperglicemia induz a formação de EROs, incluindo $O_2^{\bullet-}$, radical hidroxila ($\bullet OH$), íon hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em condições aeróbicas, as EROs são geradas durante as atividades metabólicas normais, mas o desequilíbrio entre a geração excessiva de EROs e a falta de defesa antioxidante são os principais fatores que podem causar peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas e mutação do DNA em células saudáveis. Essas espécies reativas deterioram a função das células β e aumentam a resistência à insulina, o que desencadeia o agravamento do DMT2 (SINGH *et al.*, 2014).

Figura 24 - A quantidade relativa de EROs avaliada em células epiteliais brônquicas humanas normais (BEAS-2B), células normais de fígado de camundongo (AML-12) e células epiteliais mamárias não malignas (MCF-10A) após exposição ao carcinógeno sozinho ou com pré-tratamento de extrato etanólico de sementes de maracujá e composto de referência.



EPED1, *Passiflora edulis* de Alagoas, EPED2, *P. edulis* da Bahia, EPCIN, *P. cincinnata* de Alagoas; PCT, piceatanol; NNKOAc, 4-(acetoximetilnitrosoamino)-1-(3-piridil)-1-butanona. A) BEAS-2B; B) AML-12; C) MCF-10A. a-b, média $\pm$ SD seguida de letras diferentes representam diferenças significativas (teste de Tukey, $p \leq 0,05$). Os dados são médias da triplicata.

Fonte: Autora (2022).

Nossos resultados demonstram que o EPED1, EPED2, EPCIN e PIC podem mitigar a geração de EROs, especialmente sob estresse oxidativo, o qual é considerado um evento primário no desenvolvimento de várias doenças crônicas, como a diabetes. Além disso, o tratamento com extrato etanólico de sementes de maracujá e PIC em concentrações mais baixas pode proteger as células contra a toxicidade do alto teor de glicose através da eliminação de EROs.

5.8 CONCLUSÃO

As sementes de maracujá, subproduto da indústria de sucos, têm potencial para ser usadas como fonte antioxidante de baixo custo para o desenvolvimento de nutracêuticos e suplementos alimentares que combatam a hiperglicemia e, conseqüentemente, atenuar a progressão das complicações causadas pelo DMT2.

Neste trabalho, o EPED1, EPED2, EPCIN e PIC apresentaram potente potencial antioxidante. EPED1 e EPED2 destacaram-se em termos de atividade antidiabética frente a inibição da α -amilase, α -glicosidase e DPP-4. Além disso, EPED1 mostrou-se se atóxico para células BEAS-2B na concentração esperada para exibir atividade antidiabética e antioxidante.

Observou-se também que EPED1, EPED2, EPCIN e PIC a 100 $\mu\text{g/mL}$ protegeram a linhagem celular BEAS-2B do estresse oxidativo causado por a presença do carcinógeno químico, NNKOAc. E nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$, preveniram o estresse oxidativo nas células BEAS-2B, AML-12 e MCF-10A.

Embora ainda seja cedo para sugerir o uso de extrato etanólico de sementes de maracujá no tratamento de DMT2, este trabalho demonstra seu potencial em inibir mecanismo que aumenta a concentração de glicose no sangue, portanto há possibilidades de seu uso como meio de intervenção ou complementação aos medicamentos atuais no controle dos níveis glicêmicos.

5.9 PERSPECTIVAS

Padronizar os extratos para fins de comercialização e realizar ensaio antidiabético em modelo animal (ratos). Para assim, desenvolver suplementos ou nutracêuticos orais a partir de extratos de resíduos de sementes de Passiflora que possam ser utilizados em terapias de prevenção ou tratamento de DM2. E assim, reduzir os sintomas causados pela doença ou diminuir a progressão das complicações causadas pelo diabetes.

REFERÊNCIAS

ALDINI, G. et al. Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycoxidation and advanced lipoxidation end products. **Free Radical Research**, v. 47, n. S1, p. 93–137, 2013.

ALQAHTANI, A. S. et al. Alpha-amylase and alpha-glucosidase enzyme inhibition and antioxidant potential of 3-oxolupenal and katononic acid isolated from *Nuxia oppositifolia*. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, 2020.

AMARARATHNA, M.; HOSKIN, D. W.; RUPASINGHE, H. P. V. Anthocyanin-rich haskap (*Lonicera caerulea* L.) berry extracts reduce nitrosamine-induced DNA damage in human normal lung epithelial cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 141, n. March, p. 111404, 2020.

APAK, R. et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1496–1547, 2007.

ARELI MONDACA-NAVARRO, B. et al. Glycation of Animal Proteins Via Maillard Reaction and Their Bioactivity. **Food Processing**, 2020.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547–553, 2016.

ATHAYDES, B. R. et al. Avocado seeds (*Persea americana* Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. **Food Research International**, v. 119, p. 751–760, 2019.

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

BALLESTEROS-VIVAS, D. et al. An integrated approach for the valorization of mango seed kernel: Efficient extraction solvent selection, phytochemical profiling and antiproliferative activity assessment. **Food Research International**, v. 126, n. May, p. 108616, 2019.

BARBOSA, J. H. P. et al. DETERMINATION OF ADVANCED GLYCATION (AGEs) AND LIPOXIDATION (ALEs) END PRODUCTS IN FOODS AND BIOLOGICAL SYSTEMS: ADVANCES, CHALLENGES AND PERSPECTIVES. **Química Nova**, v. 39, n. 5, p. 608–620, 2016.

BARRERA, G. et al. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and

malondialdehyde in aging-related disorders. **Antioxidants**, v. 7, n. 8, 2018.

BENATTI, A. et al. Biomedicine & Pharmacotherapy Annona muricata Linn . leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase , α -glucosidase , lipase , non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 100, n. January, p. 83–92, 2018.

BILLAUD, C.; ADRIAN, J. Louis-Camille Maillard, 1878–1936. **Food Reviews International**, v. 19, n. 4, p. 345–374, 2003.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–1625, 2005.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287–299, 2011.

CAI, Z.; YAN, L.-J. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. **Journal of biochemical and pharmacological research**, v. 1, n. 1, p. 15–26, 2013.

CAO, Q. et al. Phenolic compounds, bioactivity, and bioaccessibility of ethanol extracts from passion fruit peel based on simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 356, n. March, p. 129682, 2021.

CARMO, M. A. V. DO et al. Hydroalcoholic Myrciaria dubia (camu-camu) seed extracts prevent chromosome damage and act as antioxidant and cytotoxic agents. **Food Research International**, v. 125, n. June, p. 108551, 2019.

CELI, P.; GABAI, G. Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: The role of protein oxidation. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, n. OCT, p. 1–13, 2015.

CHEN, R. et al. Reactive oxygen species formation in the brain at different oxygen levels: The role of hypoxia inducible factors. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, n. OCT, p. 1–12, 2018.

CICCO, N. et al. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical Journal**, v. 91, n. 1, p. 107–110, 2009.

COLLIN, F. Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, 2019.

COUTINHO, W. F.; SILVA JÚNIOR, W. S. Diabetes Care in Brazil. **Annals of Global Health**, v. 81, n. 6, p. 735–741, 2015.

CROTTI, A. E. M.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones : a study of goyazensolide and its congeners. **Journal**

of **Mass Spectrometry**, v. 40, n. June, p. 1030–1034, 2005.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. **Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants** *Frontiers in Environmental Science*, 2014. Disponível em: <www.frontiersin.org>

DE SILVA, A. B. K. H.; RUPASINGHE, H. P. V. Polyphenols composition and anti-diabetic properties in vitro of haskap (*Lonicera caerulea* L.) berries in relation to cultivar and harvesting date. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 88, n. December 2019, p. 103402, 2020.

DEMARQUE, D. P. et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization. **Natural Product Reports**, n. 3, p. 432–455, 2016.

ELOSTA, A.; GHOU, T.; AHMED, N. Natural Products as Anti-glycation Agents: Possible Therapeutic Potential for Diabetic Complications. **Current Diabetes Reviews**, v. 8, n. 2, p. 92–108, 2012.

FALEIRO, F. G. et al. Maracujá *Passiflora* spp. **Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)**, 2017.

FALEIRO, F. G. E. C.; JUNQUEIRA, T. V. E. C. **Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. [s.l.: s.n.]. v. 148

FIDELIS, M. et al. Fruit seeds as sources of bioactive compounds: Sustainable production of high value-added ingredients from by-products within circular economy. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 1–54, 2019.

FORBES, H.; QUESTED, T.; O'CONNOR, C. **Food waste index report 2021**. Nairobi: [s.n.].

FORRESTER, S. J. et al. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. **Circulation Research**, v. 122, n. 6, p. 877–902, 2018.

FOWLER, M. J. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. **Clinical Diabetes**, v. 26, n. 2, p. 116–122, 2008.

FRANCISCHINI, D. DA S. et al. Development and application of green and sustainable analytical methods for flavonoid extraction from *Passiflora* waste. **BMC Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2020.

FRANCISQUINI, J. D. et al. Reação De Maillard: Uma Revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 1, p. 48, 2017.

FREITAS, C. M. P. DE et al. Passion Fruit By-Product: Process Design of Pectin Production. **International Journal of Research -GRANTHAALAYAH**, v. 8, n. 10, p. 58–

69, 2020.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058–1070, 2010.

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.

GREGG, E. et al. Improving Health Outcomes of People with Diabetes Mellitus: Target Setting to Reduce the Global Burden of Diabetes Mellitus by 2030. **World Health Organization**, v. 8, 2021.

HACKE, A. C. M. et al. Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) Seeds: Chemical Characterization and Extraction of Antioxidant and Antimicrobial Compounds. **Journal of food science**, v. 81, n. 9, p. C2206–C2217, 2016.

HALLIWELL, B.; GRUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology & Medicine**. [s.l.: s.n.]. v. 5 edition

HAMINIUK, C. W. I. et al. Invited review Phenolic compounds in fruits – an overview. p. 1–22, 2012.

HAYYAN, M.; HASHIM, M. A.; ALNASHEF, I. M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 5, p. 3029–3085, 2016.

HE, X. et al. *Passiflora edulis*: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. May, p. 1–16, 2020.

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.

HILLION, M.; ANTELMANN, H. Thiol-based redox switches in prokaryotes. **Biological Chemistry**, v. 396, n. 5, p. 415–444, 2015.

IBGE. Produção agrícola municipal. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, p. 4–7, 2020a.

IBGE. **Produção de Maracujá**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/maracuja/br>>.

JAHAN, H.; CHOUDHARY, M. I. Glycation, carbonyl stress and AGEs inhibitors: A patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 25, n. 11, p. 1267–1284, 2015.

JIANG, L. et al. **Exploring the inhibitory mechanism of piceatannol on α -glucosidase relevant to diabetes mellitus**RSC Advances, 2020.

KAMILOGLU, S. et al. Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, v. 1, n. 3, p. 332–349, 2020.

KARASAWA, M. M. G.; MOHAN, C. Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 8, n. 5, p. 335–346, 2018.

KAWAKAMI, S. et al. Constituent characteristics and functional properties of passion fruit seed extract. **Life**, v. 12, n. 1, 2022.

KERSHAW, J.; KIM, K. H. The Therapeutic Potential of Piceatannol, a Natural Stilbene, in Metabolic Diseases: A Review. **Journal of medicinal food**, v. 20, n. 5, p. 427–438, 2017.

KHUWIJITJARU, P.; KLINCHONGKON, K. Passion fruit. In: GALANAKIS, C. (Ed.). **Valorization of Fruit Processing By-products**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. p. 177–195.

KIDO, L. A. et al. Prevention of Prostate Cancer in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate Mice by Yellow Passion Fruit Extract and Antiproliferative Effects of Its Bioactive Compound Piceatannol. **Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 2, p. 87–99, 2020.

KIM, C.-S.; PARK, S.; KIM, J. The role of glycation in the pathogenesis of aging and its prevention through herbal products and physical exercise. **Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**, v. 21, n. 3, p. 55–61, 2017.

KIM, J. H. et al. Rapid identification of methylglyoxal trapping constituents from onion peels by pre-column incubation method. **Natural Product Sciences**, v. 23, n. 4, p. 247–252, 2017.

KIM, K. Y.; KIM, C. Y. Inhibitory effects of curcumin on high glucose-induced damages: Implications for alleviating diabetic complications. **Korean Journal of Food Preservation**, v. 24, n. 4, p. 536–541, 2017.

KITADA, M. et al. The effect of piceatannol from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds on metabolic health in humans. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1–17, 2017.

KONG, Y. et al. Pathological Mechanisms Linking Diabetes Mellitus and Alzheimer ' s Disease : the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE). **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 12, n. 217, p. 1–10, 2020.

KRAMBECK, K. et al. Identification and quantification of stilbenes (Piceatannol and resveratrol) in *passiflora edulis* by-products. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 4, 2020.

KRUMOVA, K. et al. Section I: Fundamentals. **Singlet Oxygen : Applications in Biosciences and Nanosciences**, p. 1–4, 2016.

KUETE, V.; TAIWE, G. S. *Passiflora edulis*. In: **Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and**

Systemic Diseases. 1st. ed. [s.l.] Elsevier Science & Technology, 2017. p. 513–523.

LAZAROVA, I. et al. HPLC-DAD analysis of phenolic compounds and antioxidant properties of *Asphodeline lutea* roots from Bulgaria and Turkey. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 438–441, 2014.

LOIZZO, M. R. et al. Native Colombian fruits and their by-products: Phenolic profile, antioxidant activity and hypoglycaemic potential. **Foods**, v. 8, n. 3, 2019.

LUCAS, M. et al. The scavenging effect of curcumin, piperine and their combination against physiological relevant reactive pro-oxidant species using in vitro non-cellular and cellular models. **Chemical Papers**, v. 75, n. 10, p. 5269–5277, 2021.

MARÍN-PENÁLVER, J. J. et al. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v. 7, n. 17, p. 354, 2016.

MARLENE, V. et al. **Estudo farmacognóstico comparativo de espécies medicinais de Passiflora L.: P.alata Curtis; P.caerulea L.; P.edulis Sims. forma flavicarpa Degener; P.incarnata L. e P.quadrangularis L.** São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, 2005.

MARTINS, S. I. F. S. **Unravelling the Maillard reaction network by multiresponse kinetic modelling**. [s.l: s.n.]. v. PhD

MARUKI-UCHIDA, H. et al. Effect of passion fruit seed extract rich in piceatannol on the skin of women: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 64, n. 1, p. 75–80, 2018.

MATSUI, Y. et al. Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 11112–11118, 2010.

MELO, I. S. V. DE et al. Oncocalyxone a functions as an anti-glycation agent in vitro. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–8, 2015.

MERLIN, J. P. J. et al. Vitamin-containing antioxidant formulation reduces carcinogen-induced dna damage through atr/chk1 signaling in bronchial epithelial cells in vitro. **Biomedicines**, v. 9, n. 11, 2021.

MINAKAWA, M.; MIURA, Y.; YAGASAKI, K. Piceatannol, a resveratrol derivative, promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and suppresses blood glucose levels in type 2 diabetic model db/db mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 422, n. 3, p. 469–475, 2012.

MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. et al. Natural peptide anti-glycation effect in the presence of Aloe vera phenolic components on human serum albumin. **RSC Advances**, v. 5,

n. 1, p. 248–254, 2015.

MORAIS, D. R. et al. Antioxidant activity, phenolics and UPLC-ESI(-)-MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, v. 77, p. 392–399, 2015.

NAGAI, R. et al. Chelation: A fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications. **Diabetes**, v. 61, n. 3, p. 549–559, 2012.

NAGAI, R. et al. Inhibition of AGEs formation by natural products. **Amino Acids**, v. 46, n. 2, p. 261–266, 2014.

NAGAPAN, T. S. et al. Photoprotective effect of stilbenes and its derivatives against ultraviolet radiation-induced skin disorders. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 11, n. 3, p. 1199, 2018.

NORIEGA, P. et al. Passiflora alata curtis: A brazilian medicinal plant. **Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 10, n. 5, p. 398–413, 2011.

OLIVEIRA, D. A. et al. Nanoencapsulation of passion fruit by-products extracts for enhanced antimicrobial activity. **Food and Bioproducts Processing**, v. 104, p. 137–146, 2017.

OLIVEIRA, A. C. DE et al. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, p. 469–475, 2009.

OMENA, C. M. B. et al. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 334–344, 2012.

PAN, Z. H. et al. Preparative Isolation of Piceatannol Derivatives from Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seeds by High-Speed Countercurrent Chromatography Combined with High-Performance Liquid Chromatography and Screening for α -Glucosidase Inhibitory Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 6, p. 1555–1562, 2020.

PELEGRINI, P. B. et al. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1764, n. 6, p. 1141–1146, 2006.

PENG, X. et al. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. **Food and Function**, v. 2, n. 6, p. 289–301, 2011.

PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

PUROHIT, V.; SIMEONE, D. M.; LYSSIOTIS, C. A. Metabolic regulation of redox balance in cancer. **Cancers**, v. 11, n. 7, p. 1–24, 2019.

RABBANI, N.; XUE, M.; THORNALLEY, P. J. Dicarbonyl stress, protein glycation and the unfolded protein response. **Glycoconjugate Journal**, v. 38, n. 3, p. 331–340, 2021.

RAMAKRISHNAN, S.; SULOCHANA, K. N.; PUNITHAM, R. Two new functions of inositol in the eye lens: Antioxidation and antiglycation and possible mechanisms. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 36, n. 2, p. 129–133, 1999.

REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. In: **Intech**. [s.l: s.n.].

ROTTA, E. M. et al. Use of passion fruit seed extract (*Passiflora edulis* Sims) to prevent lipid oxidation in dairy beverages during storage and simulated digestion. **Lwt**, v. 123, n. October 2019, p. 109088, 2020.

RUDNICKI, M. et al. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 719–724, 2007.

RUIZ, C. S. B. Universidade de são paulo instituto de geociências. p. 246, 2003.

SAEEDI, P. et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 157, p. 107843, 2019.

SALEHI, B. et al. The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2019.

SARAVANAN, S.; SERGIPE, U. F. DE; THANGARAJ, P. Total phenolic content , Free radical scavenging and Antimicrobial activities of *Passiflora subpeltata* seeds. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. August 2016, p. 067–072, 2013.

SEKHON-LOODU, S.; RUPASINGHE, H. P. V. Evaluation of antioxidant, antidiabetic and antiobesity potential of selected traditional medicinal plants. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, n. 53, 2019.

SEYED, M. A. et al. A Comprehensive Review on the Chemotherapeutic Potential of Piceatannol for Cancer Treatment, with Mechanistic Insights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 725–737, 2016.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: Implicações para a saúde. **Revista de Nutricao**, v. 24, n. 6, p. 895–904, 2011.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual Review of**

Biochemistry, p. 715–748, 2017.

SINGH, A. et al. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1–20, 2019.

SINGH, V. P. et al. Advanced glycation end products and diabetic complications. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2014.

SJÖGREN, G.; SLETTEN, G.; DAHL, J. E. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 84, n. 2, p. 229–236, 2000.

SMITH, B. Y. J. L. the Pathological Effects Due To Increase. **Journal Physiol**, v. 24, p. 19–25, 1849.

SONG, H. et al. Inhibition of tumor progression by oral piceatannol in mouse 4T1 mammary cancer is associated with decreased angiogenesis and macrophage infiltration. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 11, p. 1368–1378, 2015.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging and age-related diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 928, p. 22–38, 2001.

SULERIA, H. A. R.; BARROW, C. J.; BUNSHEA, F. R. Screening and Characterization of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Capacity in Different Fruit Peels. **Foods**, v. 9, n. 1206, 2020.

SUN, C. et al. Dietary polyphenols as antidiabetic agents: Advances and opportunities. **Food Frontiers**, v. 1, n. 1, p. 18–44, 2020.

SUN, L.; MIAO, M. Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 4, p. 541–555, 2020.

SURH, Y.-J.; NA, H.-K. Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases. In: GUPTA, S. C.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. (Eds.). . **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer International Publishing, 2016. v. 928p. 185–212.

TAGHAVI, F. et al. The status of glycation in protein aggregation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 100, p. 67–74, 2017.

TALAKATTA, G. et al. Diabetes induces fibrotic changes in the lung through the activation of TGF- β signaling pathways. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

TORRES, N. M. P. D. O. et al. The chemistry of advanced glycation end-products. **Revista Virtual de Quimica**, v. 10, n. 2, p. 375–392, 2018.

TUPAS, G. D. et al. Antidiabetic lead compounds and targets for drug development. In: EGBUNA, C. et al. (Eds.). . **Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug**

Discovery. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 127–141.

UCHIDA-MARUKI, H. et al. Piceatannol lowers the blood glucose level in diabetic mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 629–633, 2015.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination. **Quimica Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VILLACÍS-CHIRIBOGA, J. et al. Valorization of byproducts from tropical fruits: Extraction methodologies, applications, environmental, and economic assessment: A review (Part 1: General overview of the byproducts, traditional biorefinery practices, and possible applications). **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 405–447, 2020.

VIUDA-MARTOS, M.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. Passion fruit. **Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables**, p. 581–594, 2020.

WANG, W. et al. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2666–2673, 2011.

XAVIER, J. A. et al. Anti-Zika Virus Effects, Placenta Protection and Chemical Composition of Passiflora edulis seeds ethanolic extract. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 00, n. 00, p. 1–14, 2022.

XAVIER, J. DE A. et al. Polyphenol profile by uhplc-ms/ms, anti-glycation, antioxidant and cytotoxic activities of several samples of propolis from the northeastern semi-arid region of brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1884–1893, 2017.

YEPES, A. et al. Purple passion fruit seeds (Passiflora edulis f. edulis Sims) as a promising source of skin anti-aging agents: Enzymatic, antioxidant and multi-level computational studies. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 102905, 2021.

ZAMAN, M. et al. Protein misfolding, aggregation and mechanism of amyloid cytotoxicity: An overview and therapeutic strategies to inhibit aggregation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 1022–1037, 2019.

ZARGOOSH, Z. et al. Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of Scrophularia striata Boiss. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá : um alimento funcional ? Revisão. v. 20, n. March, p. 459–471, 2010.

ZHANG, D.; WANG, Y.; LIU, H. Corn silk extract inhibit the formation of N ϵ -carboxymethyllysine by scavenging glyoxal/methyl glyoxal in a casein glucose-fatty acid model system. **Food Chemistry**, v. 309, n. October 2019, p. 125708, 2020.

ZHAO, M. et al. Piceatannol attenuates streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice. **Biocell**, v. 44, n. 3, p. 353–361, 2020.