



RENORBIO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Ingrid Sofia Vieira de Melo

Determinação da atividade antiglicante de extratos de plantas sobre
Produtos de Glicação Avançada (AGE) *in vitro*

Maceió – AL

2015

Ingrid Sofia Vieira de Melo

Determinação da atividade antiglicante de extratos de plantas sobre
Produtos de Glicação Avançada (AGE) *in vitro*

Documento apresentado como exigência
para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia, área de concentração
Saúde, à Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana

Maceió- AL

2015

Catlogação na fonte
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

M528d Melo, Ingrid Sofia Vieira de.

Determinação da atividade antiglicante de extratos de plantas sobre Produtos de Glicação Avançada (AGE) *in vitro* / Ingrid Sofia Vieira de Melo. – 2015.
129 f. : il.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Santana.
Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Produtos de glicação avançada. 2. Atividade antiglicante. 3. Produtos naturais. 4. Plantas medicinais. I. Título.

CDU: 543.64:615.322

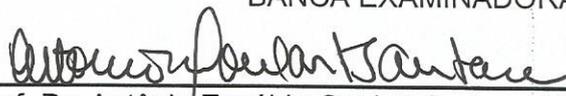
INGRID SOFIA VIEIRA DE MELO

Determinação da atividade antiglicante de extratos de plantas sobre produtos de glicação avançada (AGE) *in vitro*

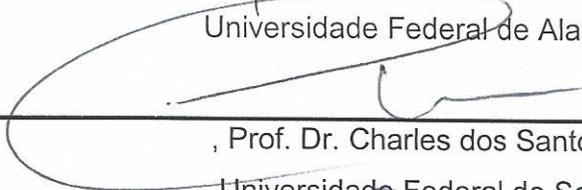
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 20/02/2015.

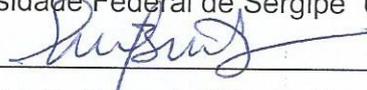
BANCA EXAMINADORA



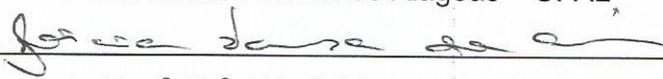
Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana (Orientador/Presidente)
Universidade Federal de Alagoas - UFAL



, Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam,
Universidade Federal de Sergipe UFS



Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto
Universidade Federal de Alagoas – UFAL



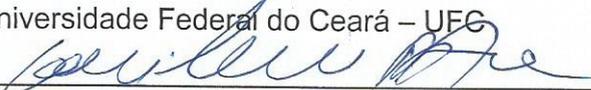
Profª. Drª. Márcia Vanusa da Silva



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Profª. Drª. Maria Teresa Salles Trevisan

Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta

RENORBIO/UNCISAL

Aos meus pais, Luiz e Nizete; ao meu irmão Ítalo e ao meu noivo, Nassib. Dedico também, a todas as cidadãs e cidadãos brasileiros, principalmente aqueles que jamais puderam frequentar a escola, e ainda assim contribuíram para a minha formação.

AGRADECIMENTOS

A capes, por concessão de bolsa de estudos, peça fundamental para a minha formação;

A Universidade Federal de Alagoas, por possibilitar minha formação acadêmica nos últimos 11 anos;

Ao professor Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana, por acreditar em uma desconhecida cheia de sonhos, e, a todos que fazem o Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais;

Aos meus amados pais, verdadeiros realizadores de sonhos. Aqueles que jamais mediram esforços para concretizar todos os meus desejos e necessidades;

Ao meu amado irmão, Ítalo Melo, por sua companhia maravilhosa, durante toda a minha vida;

Ao meu maravilhoso noivo Nassib Bueno, por ser mais que meu companheiro de vida e dedicar todo o carinho que eu poderia receber, mas também pelas imensas contribuições científicas;

A professora Dra. Terezinha da Rocha Ataíde, por ter despertado em mim o desejo pela pesquisa;

A professora Dra. Aldenir Feitosa, uma coorientadora “adotiva”, que se tornou uma grande amiga, uma grata surpresa da ciência;

A amiga Carla Karine Barbosa, uma pessoa iluminada que cruzou o meu caminho;

Ao amigo Aldy, que foi um anjo de proteção durante esta trajetória;

A estudante do programa de iniciação científica, Regina Acácia, pela fundamental ajuda;

A todos os meus amigos, principalmente pela compreensão;

A todas as cidadãs e cidadãos brasileiros que por meio das suas contribuições custearam meus estudos. Principalmente, aqueles que por falta de oportunidades, não tiveram as mesmas chances que eu, ou ainda não puderam proporcioná-las aos seus filhos. Desejo, profundamente, retornar a sociedade tudo que foi investido em mim, através do meu trabalho.

Finalmente e não menos importante, a um ser supremo que rege todos os meus atos e me guia diariamente, sem cessar.

RESUMO

Os produtos de glicação avançada (AGE) englobam uma série de compostos, bastante diferentes entre si, cuja atividade está relacionada à capacidade destes de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Diversos estudos, inclusive que utilizaram animais, apontam que a restrição de AGE na dieta pode exercer diversos efeitos protetores. Além disso, o uso de determinadas plantas medicinais parece oferecer benefícios adicionais, especialmente, para indivíduos que sofrem com transtornos associados ao acúmulo exagerado de AGE. Acredita-se que plantas que combiam propriedades antiglicantes e antioxidantes, exercem efeitos positivos sobre a inibição da glicação. Este fato tem atraído o interesse da comunidade científica, visto que pode oferecer importante potencial terapêutico. Embora nenhum componente seja ainda especificamente indicado como redutor de AGEs no contexto do corpo humano, em estudos *in vitro* algumas substâncias demonstraram efeitos anti-AGE importantes e merecem investigações adicionais, tais como piridoxamina, alilcisteína (componente do extrato de alho), compostos fenólicos, vitaminas C e E, tiamina, taurina e carnosina, reconhecidos por suas propriedades antioxidantes. Por esta razão o objetivo da presente proposta foi determinar a atividade antiglicante de extratos de plantas nativas da flora brasileira, que tenham reconhecida atividade antioxidante. Todos os extratos estudados fazem parte do banco de extratos vegetais pertencentes ao Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais (LPqRN), do Instituto de Química e Biotecnologia –UFAL. Para tanto, a presente tese foi dividida em três partes, que geraram três artigos. O primeiro deles intitulado “*Atividade antioxidante de extratos de plantas nativas da flora brasileira pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC*”, teve como objetivo investigar a capacidade antioxidante de diferentes extratos de plantas, por diferentes ensaios *in vitro* (ABTS, DPPH, FRAP, ORAC), e determinar se existe correlação entre os métodos testados. Nesta proposta, foram estudadas 49 amostras vegetais, pelos ensaios de capacidade antioxidante, DPPH; ABTS; FRAP e ORAC. Adicionalmente foram realizados testes para verificar se existia correlação entre os métodos. Os resultados foram uma triagem para dar sequência às pesquisas, especificamente, da atividade antiglicante, que se acredita haver relação com a atividade antioxidante. Assim o segundo artigo intitulado “*Atividade antiglicante in vitro de extratos de plantas nativas da flora brasileira*”, teve como objetivo determinar a atividade antiglicante de extratos de plantas nativas da flora brasileira, com reconhecida atividade antioxidante e a possibilidade de correlação entre os testes, antiglicante e antioxidantes. Para isto 18 extratos, que haviam sido classificados como importantes fontes de componentes antioxidantes, foram testados para atividade antiglicante. A partir do extrato mais promissor, *Auxemma oncocalyx* Taub. (entrecasca) para a atividade, foi testada uma quinona isolada do mesmo, a Oncocalixona A. Esta demonstrou ser um importante agente antiglicante, o que resultou no terceiro artigo, “*Oncocalyxone A functions as an anti-glycation agent in vitro*”, este que foi submetido à revista FOOD CHEMISTRY, ISSN: 0308-8146, Fator de impacto 3.259, no dia 02.12.14, na forma de *Short communication*. A presente tese se reveste de particular importância, uma vez que investigações desta natureza favorecem o desenvolvimento de pesquisas que investiguem potenciais produtos terapêuticos, e que por sua vez, possam ser úteis no tratamento de doenças associadas ao acúmulo exagerado de AGE.

ABSTRACT

Advanced glycation end products (AGE) comprise a series of compounds, quite different, whose activity is related to their ability to modify the chemical and functional properties of diverse biological structures. Several studies, including that used animals, indicate that AGE restriction in the diet can have many protective effects. Furthermore, the use of certain medicinal plants appears to offer additional benefits, especially to individuals suffering from disorders associated with excessive accumulation of AGE. It is believed that plants with antiglycating and antioxidant properties, have positive effects on the inhibition of glycation. This fact has attracted the interest of the scientific community, as it can provide important therapeutic potential. Although any further component is particularly suitable as reducing AGEs in the context of the human body, some substances in vitro studies demonstrated the anti-AGE effects important and worth further investigation such as pyridoxamine, allicin (garlic extract component), phenolics, vitamins C and E, thiamin, taurine and carnosine, recognized for its antioxidant properties. Therefore the aim of this proposal was to determine the antiglycating activity of extracts of plants native to the Brazilian flora of recognized antioxidant activity. All the studied extracts are part of the bank of plant extracts belonging to the Laboratory for Research on Natural Resources (LPqRN), the Institute of Chemistry and Biotechnology -UFAL. Therefore, this thesis was divided into three parts, which generated three articles. The first titled "Antioxidant activity of native plant extracts of flora by ABTS methods, DPPH, FRAP and ORAC", aimed to investigate the antioxidant capacity of different plant extracts, by different in vitro assays (ABTS, DPPH, FRAP, ORAC), and determine whether there is correlation between the tested methods. In this proposal, 49 plant samples were studied, the tests of antioxidant capacity, DPPH; ABTS; FRAP and ORAC. Further tests were conducted to see if there was a correlation between the methods. The results were screened for to follow up the research, specifically, the antiglycating activity, believed to be related to the antioxidant activity. So the second article entitled "antiglycating in vitro activity of native plant extracts of flora", aimed to determine the antiglycating activity of native plant extracts of Brazilian flora, with recognized antioxidant activity and the possibility of correlation between tests, antiglycating and antioxidants. For this 18 extracts, which had been classified as important sources of antioxidant compounds were tested for activity antiglycating. From the most promising extract, *Auxemma oncocalyx* Taub. (Bark) for activity, an isolated quinone thereof was tested in *Oncocalixona A*. This may be an important antiglycating agent, which resulted in the third section, "Oncocalixone The functions of an anti-glycation agent in vitro", that this was submitted to the journal *FOOD CHEMISTRY*, ISSN: 0308-8146, Impact factor 3.259, on 02/12/14, in the form of Short communication. The particular this thesis is of importance, since investigations of this nature favors the development of research investigating potential therapeutic products, and that in turn may be useful in treating diseases associated with excessive accumulation of AGE

LISTA DE FIGURAS

Seção: 3. Revisão da literatura

Figura 1. Glicação de proteínas e a consequente formação de Produtos de Glicação Avançada (AGE).....	20
Figura 2. Estruturas químicas de AGE.....	23
Figura 3. Estruturas químicas de Cafeína (a) e Teanina (b).....	32

Seção: 4.1. Atividade antioxidante de extratos de plantas nativos da flora brasileira pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC

Figura 1. Procedimento de preparo do ensaio DPPH utilizando os extratos.....	50
Figura 2. Procedimento de preparo do ensaio DPPH utilizando Composto padrão, Trolox®.....	50
Figura 3. Esquema de análise método ABTS, utilizado para identificação da atividade antioxidante tanto dos extratos quanto do composto padrão.....	52
Figura 4. Esquema na análise FRAP.....	53
Figura 5. Correlação entre os ensaios ABTS e ORAC, coeficiente de correlação 0,535 (a); Correlação entre os ensaios DPPH e ORAC, coeficiente de correlação R 0,633 (b); Correlação entre os ensaios FRAP e ORAC, coeficiente de correlação $r = 0,378$	65

Seção: 4.2. Atividade antiglicante *in vitro* de extratos de plantas nativos da flora brasileira

Figura 1. (a) Esquema de fracionamento de extrato, acompanhado pelo biomonitoramento da atividade antiglicante (b) Esquema da purificação por técnicas de Cromatografia líquida.....	87
--	----

Seção: 4.3. Oncocalixona A exerce efeito de antiglicação *in vitro*

Figure 1. Chemical structure of Oncocalyxone A.....106

Figure 2. Dose-dependent inhibition of the fluorescent AGE formation by the Onco A, via spectrofluorimetric method. r^2 0.98.....107

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Seção: 3. Revisão da literatura

Quadro 1. Produtos naturais com atividade antiglicante.....33

Seção: 4.1. Atividade antioxidante de extratos de plantas nativos da flora brasileira pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC

Quadro 1. Espécies vegetais testadas.....46

Tabela 1. Determinação da capacidade antioxidante de 50 extratos vegetais. Os resultados são apresentados em $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco.....59

Quadro 2. Distribuição da capacidade antioxidante dos extratos que apresentaram alta atividade nos diferentes métodos.....64

Tabela 2. Coeficiente de correlação (r) entre os ensaios.....65

Tabela 3. Comparação de pares de métodos antioxidantes pelo teste z.....67

Seção: 4.2. Atividade antiglicante *in vitro* de extratos de plantas nativos da flora brasileira

Tabela 1. Comparação dos extratos de plantas testadas para atividade antiglicante e do composto padrão aminoguanidina.....85

Tabela 2. Coeficiente de correlação (r) entre os ensaios que medem a capacidade antioxidante dos extratos e a atividade antiglicante.....88

Seção: 4.3. Oncocalixona A exerce efeito de antiglicação *in vitro*

Table 1. Anti-glycation activity of pure compounds.....108

LISTA DE ABREVIATURAS

3-DG – 3-deoxiglicosona

ABTS – 3-etil-benzotiazolina-6- ácido sulfônico

AFGP – 1 – alquil – 2 – formil – 3,4 – diglicosil pirrolinas

AGE – Produtos de Glicação Avançada

AGE-R1 – oligosacaril transferase-48

AGE-R2 - 80K-H fofosproteína

AGE-R3 - galectina-3

ALE – Produtos de lipoxidação avançada

ALI – arginina-lisina imidazol

ALT – Alanina-amino transferase

ANOVA – Análise de variância

APPH - 2,2'-Azibis 2-amidino-propano diidrocloreto

AST – Aspartato-amino transferase

AUC – área sobre a curva

BHT – hidroxitolueno butilado

BSA – Albumina sérica bovina

CCl₄ – tetracloreto de carbono

CEL – Carboxetilisina

cGMP – Monofosfato guanosina cíclico

CML – Carboximetilisina

DP – Desvio-padrão

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilidrazil

ET – equivalente trolox

EtOH – Etanol

FeCl₃ · 6H₂O – cloreto férrico hexa-hidrato

FFI – (2-furoil)-4(5)-(2-furanil)-1 imidazol

FRAP – Poder antioxidante de redução do íon férrico

GOLD – dímero glioxal-lisina

GP Iba – Gliproteína Iba

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

IC₅₀ – Concentração inibidora 50

IL - 6 α – Interleucina 6 α

IL-1 α – Interleucina 1 α

LPqRN – Laboratório de pesquisa em recursos naturais

MGO – metilglioxal

MOLD – dímero metilglioxal-lisina

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NC1 – Domínio não-colágeno 1

NF-KB – Fator nuclear *kappa* B

NO – Óxido nítrico

O₂^{•-} - ânion superóxido

OH[•] - radical hidroxil

OncA - Oncocalixona A

ORAC – Capacidade de absorção do radical oxigênio

PAI-1 – Inibidor do ativador de plasminogênio 1

PGI₂ – Prostaciclina

RAGE – receptor para AGE

RMN – Ressonância magnética nuclear

RNS – Espécies reativas de nitrogênio

ROS – espécies reativas de oxigênio

TEAC – capacidade antioxidante equivalente trolox

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazina

Trolox - 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

VCAM1 – proteínas celular de adesão vascular 1

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1 Formação de Produtos de glicação avançada (AGE's).....	20
3.2 A relação entre formação de espécies reativas e AGE's – mecanismos sugeridos.....	28
3.3 Inibidores naturais da reação de glicação.....	33
4. ARTIGOS DERIVADOS DA TESE.....	36
4.1 Artigo: Atividade antioxidante de extratos de plantas nativas da flora brasileira pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC.....	38
4.2 Artigo: atividade antiglicante in vitro de extratos de plantas nativas da flora brasileira.....	76
4.3 Artigo: Oncocalixona A exerce efeito de antiglicação in vitro.....	93
5. CONCLUSÃO GERAL.....	110
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
REFERÊNCIAS.....	116

Açúcares redutores, seus produtos de oxidação ou lipídios oxidados podem reagir não enzimaticamente com grupos amina de proteínas e formar os produtos de Amadori, que representam a glicação inicial da reação de Maillard. Quando submetidos a reações complexas como a reorganização, desidratação e condensação, os produtos de Amadori, formam derivados fluorescentes irreversíveis, chamados Produtos de Glicação Avançada (AGE) (YAMAGISHI et al., 2010).

Os AGE são um grupo heterogêneo de compostos, cuja atividade está relacionada à capacidade destes de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas, por meio da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou ainda, de interações com receptores celulares, promovendo, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (JAKUS e RIETBROCK, 2004).

A contribuição dos AGE para o desenvolvimento e a progressão de algumas situações clínicas, que estão associadas ao acúmulo de AGE, encontra-se bem evidenciada na literatura, a mais estudada delas é o diabetes. A dieta é considerada a principal fonte exógena de AGE e, embora o real impacto dos AGE dietéticos sobre a saúde humana esteja ainda pouco esclarecido, há evidências de que esses se somam ao pool de AGE endógenos, favorecendo o surgimento e a progressão das diversas complicações do diabetes (URIBARRI et al., 2010).

Um aspecto que tem atraído o interesse dos pesquisadores é a presença de compostos que combinam propriedades de antiglicação e antioxidantes nos alimentos e bebidas, os quais podem oferecer potencial terapêutico para os portadores de diabetes ou de outras doenças associadas ao acúmulo degenerativo de AGE (BEAULIEU et al., 2010). Embora nenhum alimento ou componente alimentar seja ainda especificamente indicado como um redutor de AGE *in vivo*, algumas substâncias demonstraram efeitos anti-AGE importantes e merecem investigações adicionais, tais como piridoxamina, alilcisteína (componente do extrato de alho), compostos

fenólicos, vitaminas C e E, tiamina, taurina e carnosina (AHMAD e AHMED, 2006; BABAEI-JADIDI et al., 2003; BOUSOVÁ et al., 2005; HOBART et al., 2004; LUNCEFORD e GUGLIUCCI, 2005; McCARTY, 2005; MUSTATA et al., 2005; REDDY e BEYAZ, 2006).

Nakagawa et al. (2002), ao estudarem o extrato e taninos de chá verde, demonstraram que além das já reconhecidas propriedades antioxidantes, o chá tem atividade antiglicante importante. Acredita-se que estas propriedades devem-se ao componente tanino do chá, o mais potente inibidor da formação de AGE, quando comparado ao extrato. Adicionalmente, Ahmad e Ahmed (2006), têm demonstrado os benefícios do uso de plantas medicinais, que combinam propriedades antiglicantes e antioxidantes, em pacientes diabéticos.

Estudos em animais sugerem que a restrição de AGE na dieta pode exercer diversos efeitos protetores, como preservação da estrutura morfológica das ilhotas de Langerhans e melhora da sensibilidade à insulina, aumento da concentração sérica das lipoproteínas de alta densidade (HDL colesterol), melhora da cicatrização de feridas no diabetes e prevenção da aterosclerose, da restenose após angioplastia e do desenvolvimento do diabetes tipo 1 (HOFMANN et al., 2002; LIN et al., 2002; PEPPA et al. 2003).

A crescente identificação da associação de diversas doenças ao acúmulo de AGE, tem estimulado pesquisas nas mais diversas áreas, afim de que haja melhora na detecção, na prevenção e no tratamento das complicações patológicas, que constituem preocupação crescente para as autoridades de saúde em todo o mundo. Nesse quadro, investigações adicionais das propriedades de antiglicação e antioxidação, combinadas, de compostos presentes em plantas podem oferecer novas perspectivas para o tratamento dessas doenças, e que possam assim, ajudar a reduzir seus gigantescos prejuízos socioeconômicos.

A presente proposta está dividida em três artigos, o primeiro deles intitulado “Atividade antioxidante de extratos de plantas nativas da flora brasileira pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC”, teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante de extratos de plantas

nativas da flora brasileira por diferentes ensaios *in vitro*¹ e determinar se existia correlação entre os métodos testados.

Os extratos testados para atividade antioxidante e que demonstraram melhor desempenho, por uma ou mais das técnicas citadas no parágrafo anterior, foram testados para a atividade antiglicante. Dezoito extratos foram estudados e os resultados geraram o artigo “Atividade antiglicante *in vitro* de extratos de plantas nativas da flora brasileira”.

A terceira parte desta tese, intitulada “Oncocalixona A exerce efeito de antiglicação *in vitro*”, refere-se ao estudo de um composto isolado da planta nativa da flora brasileira, *Auxemma oncocalyx* Taub., cujo extrato bruto da entrecasca, demonstrou ser eficiente em inibir a glicação, levantando a necessidade de reconhecer a possível atividade antiglicante também desta quinona que foi isolado.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antiglicante de extratos de plantas nativas da flora brasileira, que tenham reconhecida atividade antioxidante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar atividade antiglicante de extratos de plantas nativas da flora brasileira, que tenham reconhecida atividade antioxidante.

2.2 Objetivo específicos

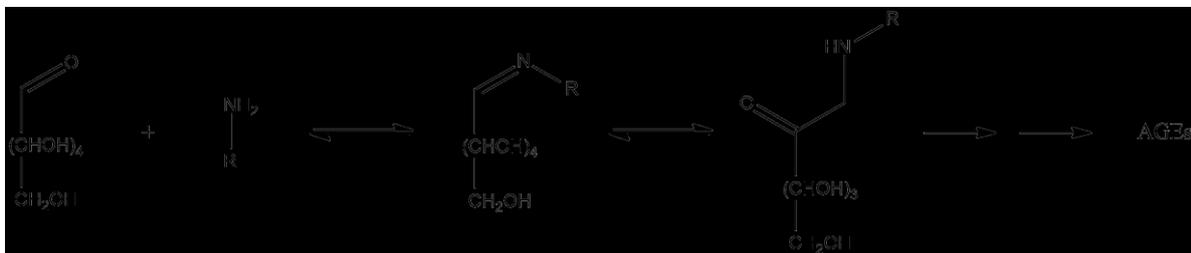
- Determinar a atividade antioxidante de extratos de plantas nativas da flora brasileira, por diferentes métodos;
- Determinar a atividade antiglicante de extratos de plantas nativas da flora brasileira;
- Determinar se existia correlação entre os métodos antiglicante e antioxidantes, para os extratos testados;
- Determinar atividade antiglicante do composto Oncocalixona A, isolado do extrato da planta *Auxemma oncocalyx* Taub.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Formação de Produtos de glicação avançada (AGE)

A formação de Produtos de glicação avançada (AGE) e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio guardam entre si íntima relação. A reação de Maillard, cujos produtos são provenientes de uma série de reações complexas entre grupos amina de proteínas e grupos carbonila de carboidratos, em estágios finais, forma os AGE e pode ocorrer nos alimentos e endogenamente. O processo de formação dos AGE, à semelhança da formação de radicais livres consiste em três fases: iniciação, propagação e estágio avançado e acredita-se que a via de formação de AGE nos alimentos e no corpo humano seja semelhante (Figura 1). O tempo reacional está diretamente relacionado ao composto formado, que pode variar de horas a meses (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2002).

Figura 1. Glicação de proteínas e a consequente formação de Produtos de Glicação Avançada (AGE)



Os passos iniciais consistem em reações de adição nucleofílica de grupos carbonila de açúcar redutor, a um grupo amina de peptídeos, aminoácidos ou proteínas, resultando em uma base de Schiff que após sucessivos rearranjos formará o produto de Amadori, mais estável que o anterior e relativamente irreversível. Em sistemas biológicos, as fontes mais importantes de grupos amina são o grupo amina primário de aminoácidos livres, o grupo amina N-terminal de peptídeos e proteínas e o grupo ϵ -amina de resíduos de lisina e arginina. A principal fonte de compostos carbonílicos são açúcares redutores como glicose, frutose, galactose, ribose e seus derivados (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2002; ELOSTA, GHOUS, AHMED, 2012)

A base de Schiff é altamente propensa a oxidação e geração de radicais livres, o que leva a formação de intermediários carbonila reativos. Até este ponto as reações são todas reversíveis e o equilíbrio é altamente dependente da concentração dos substratos e tempo de incubação; por exemplo a base de Schiff é formada algumas horas após o início da reação, enquanto que o produto de Amadori é formado somente após alguns dias (ELOSTA, GHOUS, AHMED, 2012).

Os intermediários carbonil reativos sofrem diversas reações gerando, então, intermediários dicarbonílicos que são mais reativos que os açúcares, os quais participaram da sua origem, e, reagem com grupos amina de proteínas passando por uma ampla faixa de reações como desidratação, condensação, fragmentação, oxidação e ciclização para formar os AGE, um grupo bastante heterogêneo de compostos (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2002; ELOSTA, GHOUS, AHMED, 2012). Outro caminho para a formação de intermediários dicarbonílicos é a autooxidação da glicose que formará peróxido de hidrogênio e cetoácidos na presença de íons metálicos de transição e subsequentemente aceleram a formação de AGE, este é conhecido como *caminho Wolff* (WOLFF e DEAN, 1987).

A fase de propagação, por sua vez, é entendida como a reação dos produtos de amadori com aminoácidos para formar os produtos N3-(carboximetil)lisina (CML) ou ainda regenerar aminas através da catalise mediada por íons metálicos e oxidação induzida por oxigênio, em que o grupo glicosil é desidratado para formar deoxiglicosona (WU et al., 2011).

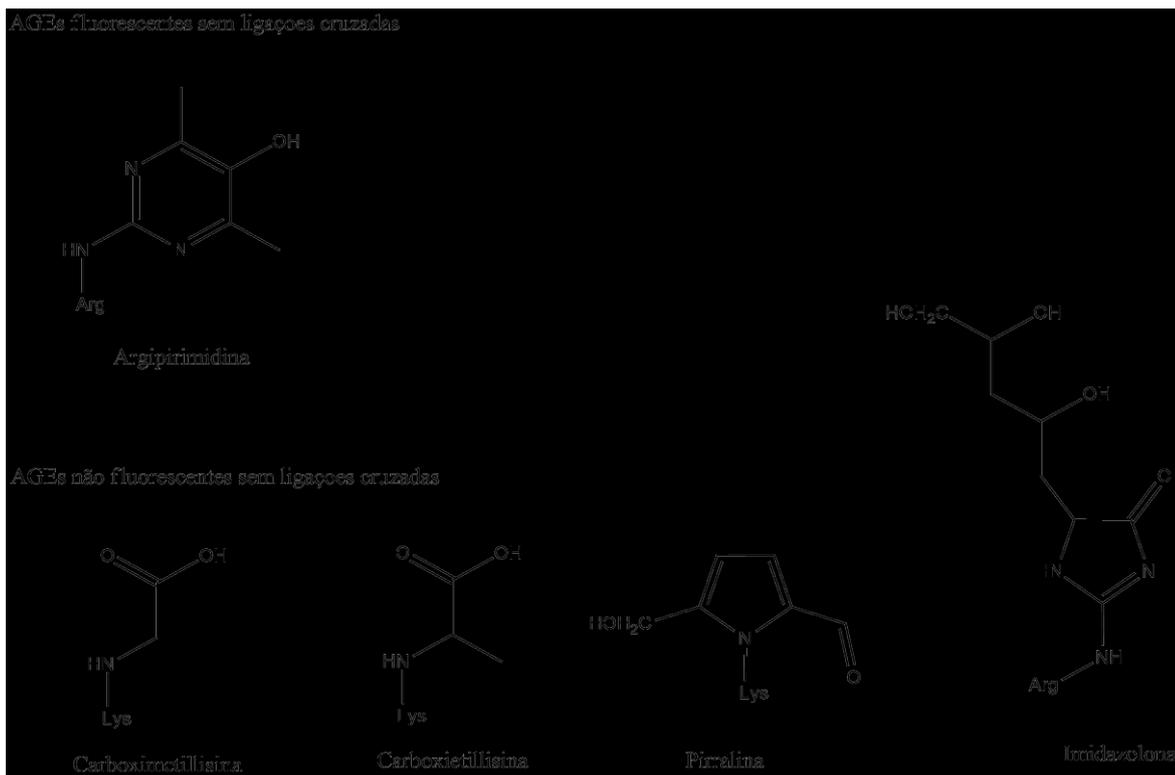
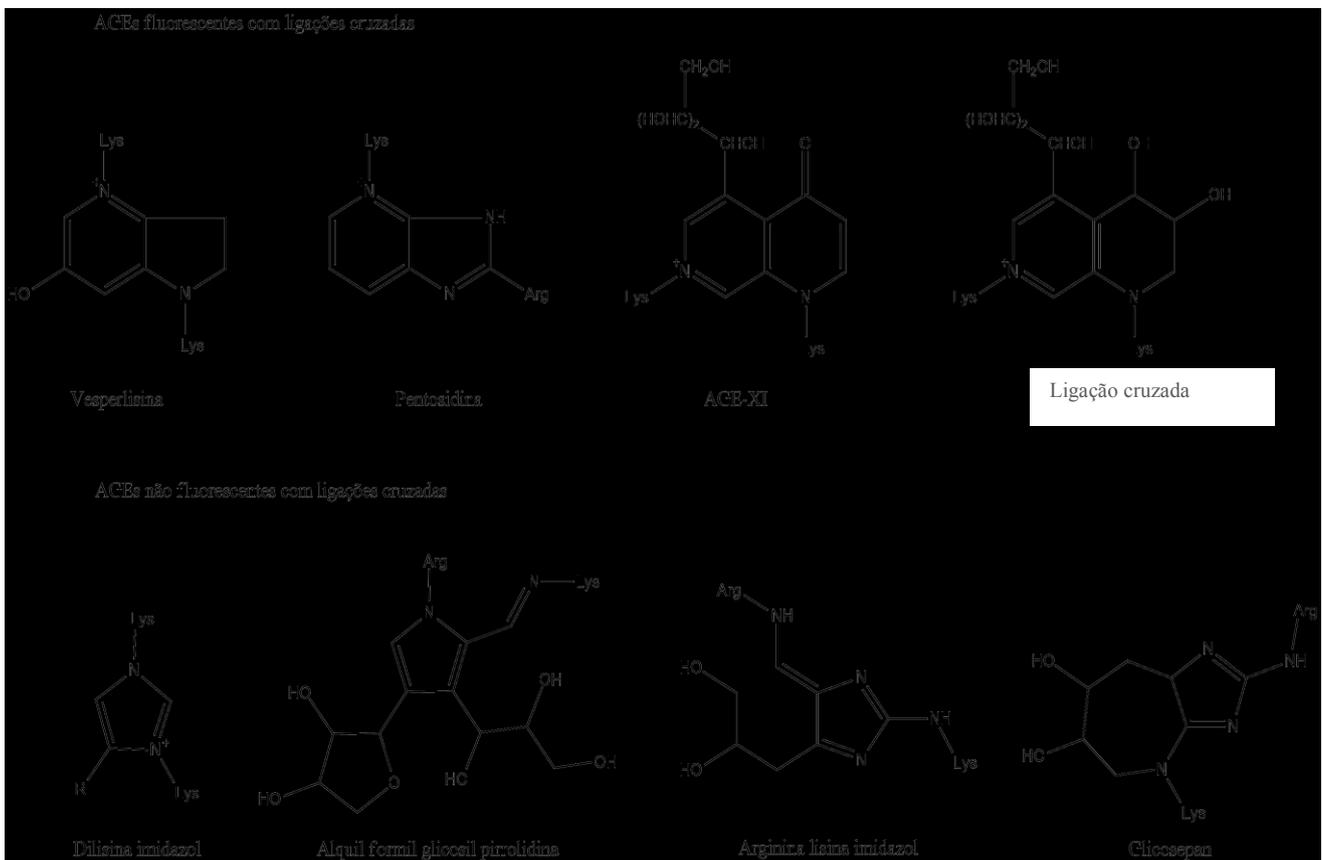
Durante a fase avançada ou fase final da reação de Maillard, a deoxiglicosana, que é altamente reativa, reage com resíduos de lisina para produzir pirralina ou reage com resíduos de lisina e arginina para gerar pentosidina e outros produtos como N3-(carboxietil)lisina (CEL), 2-(2-furoil)-4(5)-(2-furanil)-1imidazol (FFI), dímero glioxal-lisina (GOLD) e dímero metilglioxal-lisina (MOLD) (Figura 2). Em consequência a esse efeito, as proteínas envolvidas, que são desnaturadas, sofrem danos irreversíveis. A desnaturação ocorre uma vez que ligações cruzadas heterocíclicas intramoleculares ou intermoleculares e a fragmentação das moléculas de proteínas são induzidas (WU et al., 2011).

AGE são um grupo de moléculas originalmente caracterizadas por sua cor amarelo amarronzada fluorescente e sua habilidade de formar ligações cruzadas entre grupos amina. A extensão da glicação proteica *in vivo* depende da reatividade dos grupos amino, da meia vida das proteínas e do grau e duração da hiperglicemia (AHMED, 2005). Embora os AGE não sejam totalmente entendidos, muitas estruturas de AGE tem sido identificadas *in vitro* e algumas *in vivo* (ELOSTA, GHOUS, AHMED, 2012).

De acordo com a estrutura química, os AGE podem ser distinguidos segundo as suas propriedades fluorescentes e ligações cruzadas em (A) AGE fluorescentes com ligações cruzadas, como a pentosidina e vesperilina (B) AGE não fluorescentes com ligações cruzadas como glicosepano e dímero metilglioxal-lisina (MOLD), dímero glioxal-lisina (GOLD), 1 – alquil – 2 – formil – 3,4 – diglicosil pirrolinas (AFGPs) e arginina-lisina imidazol (ALI), (C) AGE fluorescentes sem ligações cruzadas, argipirimidina e (D) não fluorescentes e sem ligações cruzadas, carboximetilisina (CML), carboxietilisina (CEL), pirralina e imidazóis, conforme Figura 2 (ELOSTA, GHOUS, AHMED, 2012; NAKAMURA, NAKAZAWA e IENEGA, 1997; ULRICH e CERAMI, 2001; OBAYASHI et al., 1996; DYER et al., 1991; CHELLAN e NAGARAJ, 1988; AL-ABED e BUCALA, 2000; SHIPANOVA, GLOMB e NAGARAJ, 1997; AHMED, THORPE e BAYNES, 1986; AHMED et al., 1986; AHMED et al., 1997; HAYASE et al., 1989; PAUL et al., 1998).

Do ponto de vista biológico, a formação de AGE tem um importante papel, principalmente na progressão de doenças como o diabetes mellitus. Foram encontradas grandes quantidade de AGE nos vasos da retina de ratos diabéticos e nos glomérulos renais de pacientes diabéticos (HORIE et al., 1997; STITT, BUCALA e VLASSARA, 1997; STITT et al., 1997). Os AGE, no meio intracelular, podem surgir da autooxidação de glicose a glioxal, da decomposição de produtos de Amadori a 3-deoxiglicosana, da fragmentação de gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato a metilglioxal (WELLS-KNECHT et al., 1995).

Figura 2. Estruturas químicas de AGE.



As espécies carbonil reativas como glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosana reagem com grupos amino de proteínas extracelulares e intracelulares para formar AGE, as duas primeiras são detoxificadas através de sistema glioxalase e todas são precursoras para outras redutases (THORNALLEY, 1990; SUZUKI et al., 1998).

A importância potencial dos AGE na gênese das complicações diabéticas foi indicada em estudos que observaram que, em modelos animais, a ação de inibidores de AGE estruturalmente não relacionados, preveniam parcialmente várias manifestações estruturais e funcionais da doença microvascular da diabetes na retina, rins e nervos (SOULIS-LIPAROTA et al., 1998; NAKAMURA et al., 1997; HAMMES et al., 1991). A prevenção primária da retinopatia diabética com aminoguanidina, um inibidor da formação de AGE, foi empregada com sucesso em ratos (HAMMES et al., 1991; HAMMES et al., 1994) e a nível de estratégia secundária, a aminoguanidina é tão eficaz quanto o transplante de ilhotas em retardar a progressão da retinopatia diabética (HAMMES et al., 1995).

Os danos causados pela produção intracelular de precursores de AGE podem ser distinguidos por três mecanismos diferentes. O primeiro deles é a modificação, provocada por AGE, de proteínas intracelulares, o segundo é a modificação de componentes da matriz extracelular por precursores de AGE que interagem anormalmente com outros componentes da matriz e com proteínas receptoras que promovem a comunicação da matriz com o meio extracelular (integrinas) e o terceiro, as proteínas do plasma são modificadas por precursores de AGE ligados a seus receptores de células endoteliais, mesangiais e macrófagos, induzindo, a produção mediada por receptor, de espécies reativas de oxigênio. Esta ligação a receptores de AGE ativa o fator nuclear kappa B (NF-KB), causando mudanças na expressão de genes (BROWLEE, 2001).

Em células endoteliais excessivamente expostas a glicose, a formação de AGE intracelular ocorre dentro de algumas semanas. O fator de crescimento básico é uma das principais proteínas modificadas por AGE das células endoteliais. A super expressão de

glioxalase I preveniu completamente tanto a formação de AGE quanto o aumento de endocitose macromolecular induzida pela hiperglicemia (SHINOHARA et al., 1998).

A formação de AGE altera as propriedades funcionais de várias importantes moléculas da matriz. Colágeno do tipo I e tipo IV também são afetados pela formação de AGE, o primeiro devido a ligações cruzadas intermoleculares com AGE, que induzem a expansão do empacotamento molecular. A formação de AGE no colágeno tipo IV a partir da membrana basal inibe a associação lateral a estas moléculas dentro de uma estrutura de forma normal, interferindo na ligação de domínios não colágeno, NC1, a domínios ricos em hélice (TANAKA et al., 1988; TSILBARY et al., 1990), além de promover modificações nos domínios ligados a células diminuindo a adesão de células endoteliais (HAITOGLOU et al., 1992). Essas ligações cruzadas com AGE induzem alterações na função de vasos intactos, como por exemplo diminuem a elasticidade em grandes vasos de ratos diabéticos e aumentam a filtração de flúidos através da artéria carótida (HUJIBERTS et al., 1993). A formação de AGE sobre a matriz extracelular interfere não somente nas interações matriz-matriz, mas também com interações matriz-célula (BROWLEE, 2001).

Os AGE são formados a partir de fontes exógenas, como alimentos e fumo do tabaco, mas a formação endógena também é comum. Alimentos completos que são ricos em carboidratos, lipídeos e proteínas usualmente contêm altos níveis de AGE (GOLDBERG et al., 2004). Em fumantes de tabaco, constatou-se um aumento significativo de AGE no soro desses indivíduos em comparação com os não fumantes, independente se eram diabéticos (NICHOLL et al., 1998).

Cerami et al. (1997), observaram que produtos reativos da glicação estão presentes em extratos aquosos de tabaco, assim como na fumaça e estes podem reagir rapidamente com proteínas para formar AGE. Em fumantes de cigarro os níveis de glicotoxinas foram bem maiores que em indivíduos não fumantes, sugerindo que o aumento da exposição a glicotoxinas

pode contribuir para o aumento da incidência de aterosclerose e alta prevalência de câncer em fumantes.

A semelhança de açúcares redutores, as glicotoxinas formadas a partir do fumo, reagem com proteínas e exibem uma fluorescência específica quando em ligações cruzadas com essas macromoléculas sendo mutagênicas. A fumaça do cigarro contém altas concentrações de glioxal e metilglioxal que são derivados a partir da decomposição térmica de sacarídeos, por isso são considerados como essenciais precursores de AGE associados ao tabagismo. Além disso, o processo de cura do tabaco cria glicotoxinas altamente reativas, que entram no sangue e são transmitidas através dos pulmões e aceleram a formação de AGE (CERAMI et al., 1997).

O acúmulo de AGE nos tecidos pode ser resultado tanto da sua produção acelerada como da degradação diminuída deles. Os produtos finais de glicação avançada podem causar danos aos tecidos por meio de vários mecanismos, como inibição das funções das proteínas específicas, agregação de proteínas, produção de radicais livres, formação de reticulação e interação com os receptores celulares específicos, ou ainda os AGE podem iniciar uma variedade de efeitos biológicos mediados por processos independentes de receptores ou por sistemas celulares dependentes de receptor (VITEK et al., 1994; ULRICH e ZHANG, 1997; BACH et al., 2005; YAN et al., 1994) .

As modificações de proteínas causadas por AGE podem alterar a atividade de algumas enzimas e ainda diminuir o tempo de meia vida das proteínas (VLASSARA e PALACE, 2002), porém esses não são os únicos efeitos prejudiciais dos AGE, essas alterações podem incluir ainda defeitos as lipoproteínas do plasma (STITT; BUCALA; VLASSARA, 1997). A maioria dos efeitos de AGE na matriz extracelular são devido à seu acúmulo em proteínas de longa duração, como o colágeno e vários outros tecidos. Apesar das proteínas de longa duração serem mais suscetíveis ao acúmulo de AGE, eles também podem se formar em proteínas de meia vida curta (MEERWALDT et al., 2008; MONIER, KOHN e CERAMI, 1984; TARSIO et al., 1985).

Dentre os efeitos dependentes de receptor o principal meio através do qual os AGE podem influenciar ações celulares é através da ligação a receptores específicos, como receptores sequestradores de macrófagos tipo A e B1 (CD36), e os receptores de AGE, como o oligosacaril transferase-48 (AGE-R1), 80K-H fosfoproteína (AGE-R2), galectina-3 (AGE-R3) e o mais conhecido e característicos dos receptores para AGE (RAGE) (LI et al., 1996; OHGAMI et al., 2002).

Os RAGE pertencem a uma superfamília de imunoglobulinas de moléculas de superfície celular e têm sido observado em macrófagos, células epiteliais, músculo liso, células endoteliais e células mesangiais (BASTA, 2008). A interação entre AGE e RAGE promove modificações na expressão de moléculas de adesão e na expressão de moléculas proinflamatórias e protrombóticas, como a proteína celular de adesão vascular 1 (VCAM-1) (RAMASAMY et al., 2005). RAGE tem sido apontado com o mediador da transdução do sinal, através da geração de espécies reativas de oxigênio as quais ativam ambos o NF- κ B e p21^{Ras} (YAN et al., 1994; LANDER et al., 1997). Em consequência há o aumento da liberação de citocinas tais como o fator de necrose tumoral α (TNF - α), interleucina - 1 α (IL - 1 α) e interleucina - 6 α (IL - 6 α), aumento da produção de fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o qual leva a angiogênese (SCHIMIDT et al., 2001; BIERHAUS et al., 2005; MA et al., 2007).

Sabe-se que os radicais livres derivados de glicação podem causar oxidação de proteínas e a fragmentação dos lipídios e ácidos nucleicos (AYALA e CUTLER, 1996). A este respeito, a glicação de lipídios *in vitro* pode formar AGE através de uma reação entre aminofosfolípidos, tais como resíduos de fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina, com glicose e pode subsequentemente induzir a peroxidação lipídica. A ligação de AGE ao RAGE também induz a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS), possivelmente pela ativação do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida - oxidase (NADPH-oxidase) (WAUTIER et

al., 2001) . Em condições fisiológicas essas alterações predisõem os pacientes diabéticos a desenvolverem consequências micro e macrovasculares (ELOSTA, GHOUS, AHMED, 2012).

3.2 A relação entre formação de espécies reativas (oxigênio e nitrogênio) e AGE – mecanismos sugeridos

O processo de glicação é geralmente acompanhado por reações de oxidação, no entanto a sequência das reações que envolvem glicação e oxidação é ainda pouco esclarecida. O papel das reações de oxidação e íons metálicos catalíticos na glicação já é parcialmente reconhecido. A formação dos produtos de Amadori é independente de oxigênio, enquanto que passos mais avançados, para a formação de AGE, envolvem reações de oxidação (FU et al., 1994). Ainda não está claro se a glicação antecede a oxidação ou se o inverso é verdadeiro (ELOSTA, GHOUS e AHMED, 2012)

Os AGE podem ser produtos de vários caminhos reacionais entre eles a autooxidação da glicose, catalisada por íons metálicos de transição, nomeada por muitos pesquisadores de glicação autoxidativa, termo que caracteriza os produtos formados pela sequência de reações de glicação e oxidação, e, que atualmente tem sido usado para descrever a autooxidação dos produtos de Amadori (AHMED, 2005).

O produto da glicoxidação é um radical enediol, que reduz moléculas de oxigênio para gerar intermediários oxidados como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio e cetoaldeídos, simultaneamente, e a repercussão dessas espécies reativas de oxigênio pode gerar prejuízos importantes, como danos as proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Adicionalmente, os cetoaldeídos produzidos por este caminho podem reagir com grupos amino de proteínas, formando cetoiminas altamente reativas, que em determinadas circunstâncias podem formar AGE (AHMED, 2005).

Um dos caminhos apontados para a formação de AGE envolve a formação de compostos dicarbonílicos a partir da fragmentação da base de Schiff, antes mesmo da formação do produto de Amadori. Essa fragmentação seria acompanhada pela formação de radicais livres, e conseqüente a formação de glioxal e metilglioxal (ELOSTA, GHOUS e AHMED, 2012). Uma vez formados, os compostos dicarbonílicos de proteínas podem contribuir para a formação de AGE (AHMED, 2005). As reações de glicoxidação podem formar AGE, como a carboximetilisina ou pentosidina, assim como produtos finais da lipoxidação (MONIER, 2005).

Várias hipóteses se sobrepõem e se entrelaçam: A formação de AGE e a via do polioliol ativadas podem levar ao estresse oxidativo; o estresse oxidativo pode acelerar a formação de AGE; o estresse redutor pode levar a ativação da proteína cinase C; AGE podem induzir estresse oxidativo e a expressão do fator de crescimento e assim por diante (BAYNES e THORPE, 1999).

Em nível celular, daquelas cujo transporte de glicose não depende de insulina, como as células endoteliais, o aumento do fluxo de glicose a piruvato e de NADH dentro da mitocôndria leva a um aumento mitocondrial do vazamento de elétrons e redução do oxigênio a ânion superóxido, segundo a teoria unificadora das complicações diabéticas (SAKAMOTO E BROWNLEE, 2003). O ânion superóxido é transformado, pela ação da superóxido dismutase, a H_2O_2 , o que resultaria em um dano oxidativo da gliceraldeído 3-P desidrogenase e ativação de vias deletérias desta enzima: Formação de AGE derivada de metilglioxal, ativação de proteína cinase C, ativação da via hexosamina levando a o aumento de genes de transcrição como a Inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) e aumento da atividade da aldose redutase, os quais favorecem a produção de metilglioxal e subsequente produção de AGE (MONIER, 2003).

Alguns AGE são produtos de caminhos de glicoxidação e da lipoxidação. A oxidação de ácidos graxos poliinsaturados pode levar a formação de glioxal e metilglioxal, além das características de produtos de lipoxidação avançada (ALE) como o malonaldeído ou 4-

hidroxinonenal. Glioxal reage com argininas livres para produzir hidroimidazolonas. Por outro lado, alguns AGE são produzidos somente através de glicoxidação (MONIER, 2003).

O estresse carbonílico é também uma explicação alternativa para o aumento da modificação química de proteínas no diabetes, uremia e outras doenças, que pode ser causado por um aumento generalizado da concentração de precursores carbonílicos reativos de AGE, glicoxidação e produtos da lipoxidação (BAYNES e THORPE, 1999).

O estresse carbonílico pode resultar de um aumento dos substratos do seu estresse e/ou diminuição na eficiência de desintoxicação de compostos carbonílicos. A distinção entre o estresse oxidativo e carbonílico consiste na natureza do composto carbonílico, ou seja, se as carbonilas são derivadas exclusivamente de reações oxidativas ou não. Se as carbonilas são derivadas, no todo ou em parte, de processos não oxidativos é apropriado chamar de estresse carbonílico. Em comparação com o termo estresse oxidativo, estresse carbonílico é um termo mais abrangente que inclui aumento de carbonilas derivadas tanto de reações oxidativas quanto não oxidativas. Em condições como o diabetes e uremia, há aumento não só da glicoxidação, lipoxidação, mas também de produtos gerados a partir de interações proteínas-compostos dicarbonílicos, formadas por mecanismos não oxidativos (BAYNES e THORPE, 1999).

Em estudos anteriores percebeu-se que ambos, AGE derivados de reações oxidativas (CML e pentosidina) e não oxidativas (3-DG, MGO e derivados), estão elevados em quadros de diabetes e uremia (NIWA et al., 1995; YAMADA et al., 1994; HAMADA et al., 1997; NIWA et al., 1997; NIWA et al., 1996). O aumento simultâneo em nível tecidual, de mecanismos oxidativos e não oxidativos de formação de AGE indica que diabetes e uremia são caracterizadas por um aumento geral de precursores de carbonila, indicativo de estresse carbonílico, em vez de um aumento seletivo de carbonilas, apenas oxidativas, indicativo de estresse oxidativo. Mesmo quando os níveis de produtos de oxidação em estado estacionário, tal como glioxal ou desidroascorbato, estão aumentados. Este evento pode ser resultado de deficiências em sistemas de desintoxicação ou de reciclagem, em vez de aumento da produção, como resultado do estresse

oxidativo, somente (BAYNES e THORPE, 1999). Os mesmos autores propuseram que o aumento do estresse carbonílico em quadros de diabetes é causado por deficiências ou sobrecarga nas vias de desintoxicação de compostos dicarbonílicos, ou seja, desequilíbrio entre as taxas de produção e desintoxicação de carbonilas reativas. Tal fato poderia explicar, por exemplo, o aumento de 3-DG e MGO na ausência de aumento estresse oxidativo.

Por outro lado, os inibidores de glicação tem atraído bastante interesse devido ao seu potencial terapêutico (MONIER, 2003). Compostos antiglicates irão atuar bloqueando grupos carbonílicos de açúcares redutores, os produtos de Amadori, e 3-deoxiglucosona para inibir a formação de AGE. Certas enzimas podem impedir a glicação de produtos de Amadori e são referidos como Amadoriases. Alguns fármacos têm sido apontados como possíveis inibidores de ligações cruzadas de AGE, o que levanta a hipótese de possível reversão das complicações diabéticas (VASAN; FOILES e FOUNDS, 2003). Muito interesse tem sido devotado para bloqueadores dos RAGE e a sua capacidade para proteger os indivíduos das complicações diabéticas (STERN et al., 2003).

A aminoguanidina, composto hidrazina nucleofílico, recebeu o maior interesse e é eficaz na redução da formação de AGE tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O mecanismo de atuação da aminoguanidina ainda é incerto, mas acredita-se que ela pode agir bloqueando grupos carbonila em açúcares livres, produtos de Amadori, ou intermediários dicarbonílicos tais como 3-DG. No entanto, ensaios clínicos de fase III, em que a terapia de aminoguanidina foi utilizada para tratar a nefropatia diabética, não foram bem sucedidos por causa da elevada toxicidade encontrada em muitos pacientes (THORNALLEY, 2003).

Outros compostos, como a aspirina também tem efeito protetor por atuar acetilando os grupos amino livres, protegendo-os, assim, contra a glicação (SWAMY e ABRAHAM, 1989). No entanto, há sérias preocupações sobre a toxicidade de muitos destes fármacos. Além disso, alguns destes compostos não possuem atividade antioxidante, e estudos recentes sugerem que a

glicação e toxicidade induzida por AGE estão associados com o aumento da atividade dos radicais livres.

Os antioxidantes podem proteger contra os radicais livres derivados de glicação, enquanto quelantes removem metais de transição, evitando a auto-oxidação da glicose e produtos de Amadori (HUNT, BOTTOMS e MITCHINSON, 1993; NAKAGAWA et al., 2002). Duraisamy et al. (2003), demonstraram os benefícios da utilização de compostos que combinam propriedade antiglicante e propriedades antioxidantes. Esses compostos não só previnem a formação de AGE, como parecem reduzir a toxicidade mediada pelos radical livre (AHMAD e AHMED, 2006).

Estudos recentes têm destacado os benefícios do uso de plantas medicinais que combinam propriedades antiglicante e antioxidantes em pacientes diabéticos. O chá verde das folhas da *Camellia sinensis* é uma bebida popular em todo o mundo. Ela contém uma grande quantidade de taninos (flavonóides), que são conhecidas pelas suas propriedades antioxidantes. Recentemente, um estudo mostrou que o chá verde tem atividade antiglicante além da atividade antioxidante e acredita-se que ambas as propriedades são devidas aos taninos do chá verde. Neste estudo, tanto o extrato de chá verde quanto os taninos inibiram a formação de AGE num comportamento dose-resposta, sendo o tanino o inibidor mais potente. Outros compostos como a cafeína e teanina não tiveram nenhum efeito sobre AGE. Tanto o extrato de chá verde como os taninos apresentaram atividade antioxidante, mas o tanino teve maior efeito. Mais uma vez, substâncias relacionadas, tais como a cafeína e teanina apresentaram baixa atividade antioxidante (NAKAGAWA et al., 2002).

Figura 3. Estruturas químicas de Cafeína (a) e Teanina (b)

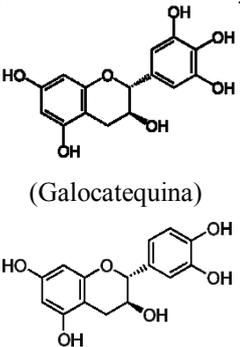


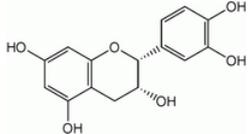
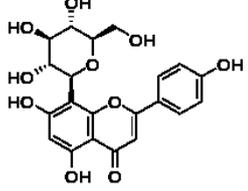
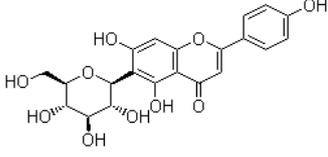
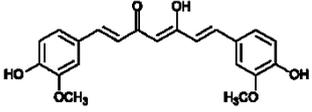
Yamaguchi et al. (2000), demonstraram que o garcinol (Quadro 1), isolado a partir da casca do fruto *Garcinia indica*, possui atividade antioxidante e é um inibidor de AGE mais potente que aminoguanidina. Em outro estudo, uma fração solúvel em água, obtido a partir de pasta de tomate inibiu a formação de AGE e provou ser mais eficaz do que a aminoguanidina (KIHO et al., 2004). O extrato continha rutina, um potente antioxidante e também responsável pela atividade antiglicante (AHMAD e AHMED, 2006). Portanto, é necessário ressaltar a importância de estudos adicionais a respeito da relação existente entre atividade antioxidante e antiglicante.

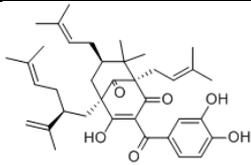
3.3 Inibidores naturais da reação de glicação

Plantas medicinais têm sido usadas ao longo de anos para o tratamento de diversas doenças, porém a comprovação destes efeitos nem sempre foram determinados. Muitas plantas são usadas popularmente como atenuadores de doenças, especialmente em países subdesenvolvidos, como uma forma, rápida, prática e menos custosa. Muitas plantas contêm compostos químicos ativos que podem ser usados diretamente ou conduzir ao desenvolvimento de novas drogas (ELOSTA, GHOUS e AHMED, 2012). No quadro 1 são elencados alguns produtos naturais com atividade antiglicante (Quadro 1).

Quadro 1. Extratos de plantas e/ou compostos isolados com atividade antiglicante

Nome popular	Nome botânico	Composto isolado	Fonte
Luobuma	<i>Apocynum venetum</i> L.	 (Galocatequina)	Yokozawa e Nakagawa (2004)

		<p>(Catequina)</p>  <p>(Epicatequina)</p>	
Mung Bean	<i>Vigna radiata</i> (L) <i>R. Wilczek.</i>	 <p>(Vitexina)</p>  <p>(Isovitexina)</p>	Peng et al. (2008)
Curcuma	<i>Curcuma Linga</i>	 <p>(Curcumina)</p>	Sajithlal, Chithra e Chandrakasan (1998)
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	–	Kiho et al. (2004)
Fragrant Granadilla	<i>Passiflora alata</i> D.	–	Rudnicki et al., (2007)
Maracujá	<i>Passiflora edulis</i> S.	–	Rudnicki et al., (2007)
Goiaba	<i>Psidium guajava</i> L.	–	Hsieh et al. (2005)
Chinese Toona	<i>Toona sinnsis</i> Roem	–	Hsieh et al. (2005)
Bitter Gourd	<i>Momordica charantia</i> L.	–	Babu, Sabitha e Shyamaladevi (2008)
Romã	<i>Punica granatum</i> L.	–	Rout e Banerjee (2007)
Nagarmotha	<i>Cyperus rotundus</i> L.	–	Ardestani e Yazdanparast (2007)
Alho	<i>Allium sativum</i>	–	Ahmad, Pischetsrieder e Ahmed (2007)
Cebola	<i>Allium cepa</i>	–	Kim e Kim (2003)
–	<i>Illicium religiosum</i>	–	Kim e Kim (2003)
Trigo sarraceno	<i>Fagopyrum esculentum</i>	–	Kim e Kim (2003)
Alecrim	<i>Origanum officinalis</i>	–	Kim e Kim (2003)
–	<i>Rosmarinus officinallis</i>	–	Kim e Kim (2003)

Pêra asiática	<i>Pyrus pyrifolia</i>	–	Kim e Kim (2003)
Raiz do diabo	<i>Acanthopanax senticosus</i>	–	Kim e Kim (2003) Kim e Kim (2003)
Cravo da Índia	<i>Eugenia caryophyllata</i>	–	Kim e Kim (2003)
Eastern Daisy Fleabane	<i>Erigeron annuus</i>	–	Kim e Kim (2003)
–	<i>Paeonia suffruticosa</i>	–	Kim e Kim (2003)
Tomilho de jardim	<i>Thymus vulgaris</i>	–	Kim e Kim (2003)
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	–	Kim e Kim (2003)
Peônia de jardim	<i>Paeonia lactiflora</i>	–	Kim e Kim (2003)
Chá chinês	<i>Camellia sinensis</i>	–	Kim e Kim (2003)
Sweet Bay	<i>Laurus nobilis</i>	–	Kim e Kim (2003)
Hardy Rubber Tree	<i>Eucommia ulmoides</i>	–	Kim e Kim (2003)
Burning Bush	<i>Euonymus alata</i>	–	Kim e Kim (2003)
Asiatic Dogwood	<i>Cornus officinalis</i>	–	Kim e Kim (2003)
Japanese-Nutmeg	<i>Torreya nucifera</i>	–	Kim e Kim (2003)
Chinese Arborvitae	<i>Thuja orientalis</i>	–	Kim e Kim (2003)
Lizard's Tail	<i>Saururus chinensis</i>	–	Kim e Kim (2003)
Canela	<i>Cinamomum cassia</i>	–	Kim e Kim (2003)
–	<i>Schizandra chinensis</i>	–	Kim e Kim (2003)
Chá verde	<i>Camellia sinensis</i>	–	Babu, Sabitha e Shyamaladevi (2008)
Grosselha indiana	<i>Phyllanthus emblica</i> Linn.	–	Chaiyasut e Chansakaow (2007)
Krachai Dhum	<i>Kaempferia parviflora</i>	–	Chaiyasut e Chansakaow (2007)
Dancing Girl	<i>Globba winitii</i> C.H.	–	Chaiyasut e Chansakaow (2007)
Kokum	<i>Garcinia indica</i>	 (Garcinol)	Yamaguchi et al. (2000)
	<i>Betula / Alba Betula</i>	 (Arbutina)	Jedsadayanmata (2013)

ARTIGOS DERIVADOS DA TESE:

Seção 4.1 Atividade antioxidante de extratos de plantas nativas da flora brasileira pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC.

Seção 4.2. Atividade antiglicante *in vitro* de extratos de plantas nativas da flora brasileira.

Seção 4.3 Oncocalixona A exerce efeito de antiglicação *in vitro*. (Este artigo foi submetido a revista FOOD CHEMISTRY, ISSN: 0308-8146, Fator de impacto 3.259, no dia 02.12.14, na forma de *Short communication*.)

4.1 ARTIGO:

*ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PLANTAS NATIVAS DA FLORA
BRASILEIRA PELOS MÉTODOS ABTS, DPPH, FRAP E ORAC*

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PLANTAS NATIVAS DA FLORA
BRASILEIRA PELOS MÉTODOS ABTS, DPPH, FRAP E ORAC**

Autores:

Ingrid Sofia Vieira de Melo^{a,b}*, Aldenir Feitosa dos Santos^c, Regina Silva Acácio^a,
Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana^a

^a Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas. Endereço:
Cidade universitária, BR 101 (km 14), Tabuleiro dos Martins, CEP 57072-970. Maceió,
AL – Brasil.

^b Departamento de agroindústria, Instituto Federal de Alagoas. Endereço: Conjunto
Residencial Astolfo Lopes, s/n - Cidade Alta, CEP 57820-000. Murici - AL – Brasil.

^c Departamento de Química, Universidade Estadual de Alagoas. Endereço: Av.
Governador Luís Cavalcante, Alto do Cruzeiro, CEP 57312-270. Arapiraca, AL –
Brasil.

* Autor correspondente:

E-mail: ingridsofia_melo@hotmail.com

Telefone: +55 82 8805-1337

+55 82 3214-1388

Palavras chave: estresse oxidativo, antioxidante, ABTS, DPPH, FRAP, ORAC

Os autores declaram não haver conflitos de interesses

RESUMO

O estresse oxidante está envolvido em diversas doenças, tais como o câncer, cardiopatias, catarata e doença de Alzheimer. Atualmente cogita-se que antioxidantes dietéticos podem estimular as defesas corporais e ajudar a evitar que componentes celulares sejam danificados pela ação dos compostos oxidantes, que podem ser naturalmente formados no corpo, ou terem a produção induzida por componentes do ambiente. A busca por antioxidantes de fontes naturais tem recebido especial atenção, e esforços tem sido realizado no sentido de identificar novos recursos naturais que possuam compostos antioxidantes ativos. Portanto o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antioxidante de extratos de plantas nativas da flora brasileira por diferentes ensaios *in vitro*, e determinar se existe correlação entre os métodos testados. Extratos etanólicos produzidos no Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais (LPqRN) do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas – Brasil, foram testados para atividade antioxidante segundo os métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), ABTS (3-etil-benzotiazolina-6- ácido sulfônico), FRAP (Poder antioxidante de redução do íon férrico), ORAC (Capacidade de absorção do radical oxigênio). Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para verificar as relações entre os diferentes pares de métodos de ensaios antioxidantes. A comparação dos coeficientes de correlação entre os diferentes pares foi realizada por meio do teste Z de Fisher. Foi considerada uma abordagem bicaudal e um valor de alfa igual à 5% para todas as análises. Pôde-se perceber que muitos extratos apresentaram atividade antioxidante alta, em todos ou algum ensaio de determinação e também extratos que não apresentaram atividade. Após análise de correlação, observou-se no presente estudo correlação positiva e significativa para os métodos DPPH, FRAP, ABTS e ORAC para

os diferentes extratos testados, sendo que apenas 4 pares de correlação diferiram significativamente uns dos outros. A presente investigação confirma a ideia de que algumas plantas são fontes promissoras de antioxidantes naturais, principalmente no que diz respeito a flora brasileira, que dada a sua diversidade, ainda é pouco estudada. A correlação significativa entre os ensaios antioxidantes indica que as medidas da capacidade antioxidante total dos extratos vegetais são consistentes, visto que os ensaios avaliam diferentes searas do poder antioxidante de cada extrato. No entanto, estudos adicionais são necessários para caracterizar os compostos ativos e as atividades biológicas e estudos *in vivo* devem ser estimulados.

ABSTRACT

Oxidative stress is involved in various diseases such as cancer, heart disease, cataracts, and Alzheimer's disease. Currently it is believed that dietary antioxidants can stimulate the body's defenses and help preventing cellular components from being damaged by the action of oxidizing compounds, naturally formed in the body and induced by environmental components. The search for natural sources of antioxidants has received special attention, and efforts have been made to identify new natural resources that have active antioxidant compounds. Therefore the aim of this study was to evaluate the antioxidant potential of native plant extracts of the Brazilian flora by different *in vitro* assays, and determine whether there is correlation between the tested methods. Ethanol extracts produced at the Research Laboratory of Natural Resources of the Institute of Chemistry and Biotechnology, Federal University of Alagoas - Brazil, were tested for antioxidant activity according to the methods DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilidrazil), ABTS (3 ethyl-6-sulfonic acid benzothiazoline), FRAP (ferric ion

reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorption capacity). We calculated the Pearson correlation coefficient to assess the relationship between the different pairs of methods of antioxidant assays. The comparison of the correlation coefficients between different pairs was performed using Fisher's Z test. A two-sided approach and an alpha value equal to 5% for all analyzes was considered. It could be perceived that many extracts showed significant antioxidant activity in all or some methods of determination and also extracts that showed no activity. After correlation analysis, we observed positive and significant correlation between all methods for the different extracts tested, however, only 4 correlation pairs differed significantly from each other. This research confirms the idea that some plants are promising sources of natural antioxidants, especially with regard to the Brazilian flora, that given its diversity, has been little studied. The significant correlation between antioxidant assays indicates that measures of total antioxidant capacity of the plant extracts are consistent, since the methods evaluate different areas of the antioxidant power of each extract. Nevertheless, further studies are needed to characterize active compounds and biological activity and *in vivo* studies are encouraged.

1. INTRODUÇÃO

Doenças como câncer, diabetes, distúrbios degenerativos, doença de Parkinson, Alzheimer, doenças inflamatórias entre outras estão intimamente relacionadas à produção de radicais livres gerados por reações bioquímicas no corpo, que podem ser inibidas por compostos com atividade antioxidante (GIUDICE et al., 2014). Sabe-se, porém, que o corpo humano é capaz de promover a depuração desses radicais através de diversos mecanismos protetores mediados pelas enzimas superóxido dismutase, catalase

e glutathione peroxidase. No entanto, quando a produção é excessiva esse sistema enzimático, não é suficiente, sendo então necessário o reforço do sistema não enzimático (GOVINDARAJAN; VIJAYAKUMAR e PUSHANGADAN, 2005).

Antioxidantes naturais, especialmente em frutas e vegetais receberam expressiva atenção da comunidade científica nas últimas décadas, principalmente devido a estudos epidemiológicos que indicam que o consumo frequente de antioxidantes naturais está associado ao menor risco de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Os efeitos protetores dos antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados, majoritariamente, a três grupos: vitaminas, carotenóides e compostos fenólicos (CANKURTARAN et al., 2013).

Para avaliar a capacidade antioxidante total de produtos vegetais vários métodos têm sido utilizadas: DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), ABTS (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico), FRAP (Poder antioxidante de redução do íon férrico), ORAC (Capacidade de absorção do radical oxigênio). Por ser o ácido hidroxitetrametilchroman-2-carboxílico (Trolox) um importante padrão de antioxidação, os ensaios citados acima são alguns dos mais comumente utilizados e agrupados como avaliadores da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (OZGEN et al., 2006). Esta forma de análise, TEAC, facilita a comparação dos estudos entre laboratórios e entre os diferentes métodos utilizados por favorecer a padronização dos resultados.

Os antioxidantes podem reduzir os radicais, primariamente por dois mecanismos: transferência de dois elétrons e um próton. ABTS, FRAP e DPPH são métodos que seguem o primeiro mecanismo, e ORAC representa o último (PRIOR; WU e SCHAICH, 2005).

As diversas técnicas têm demonstrado diferentes resultados em diferentes laboratórios e modificações estão progressivamente sendo desenvolvidas (SOCHOR et

al., 2010b; THAIPONG et al., 2006), o que justifica a pesquisa por antioxidantes através de diferentes métodos. A importância dos diferentes métodos reside, principalmente, na caracterização da atividade antioxidante, em condições semelhantes às condições fisiológicas (SOCHOR et al., 2010a).

Atualmente, existem vários ensaios *in vitro* capazes de mensurar a atividade antioxidante, cada um deles com modo de atuação próprio com suas vantagens e desvantagens. Porém, muitas vezes não há correlação entre as atividades determinadas no mesmo material por diferentes ensaios e, entre materiais diferentes, pelo mesmo ensaio, em diferentes laboratórios. É compreensível, uma vez que espécies ativas e mecanismos/características de reações diferentes irão gerar resultados também diferentes (NIKI, 2010). Segundo Carochó e Ferreira (2013) e Niki (2010), não há um método que forneça sozinho resultados totalmente precisos, sendo a melhor saída a utilização de vários métodos em vez de uma abordagem unidimensional.

Devido às diferenças entre os diversos sistemas de teste disponíveis, os resultados de um único ensaio podem acabar gerando somente uma sugestão das propriedades antioxidantes dos extratos, devendo ser interpretados com cautela. Além disso, a complexidade química de extratos de plantas poderia conduzir a resultados inconclusivos, dependendo do ensaio utilizado. Assim, uma abordagem com múltiplos ensaios no trabalho de triagem é altamente recomendável (ARUOMA, 2003; SACCHETTI et al., 2005; SCHLESIER et al., 2002).

Em muitos países, assim como no Brasil, as plantas são utilizadas como caminho para a atenuação ou cura de algumas doenças, quase sempre tendo como base a medicina popular, fato que corrobora a busca científica por novos medicamentos derivados de componentes vegetais. Por meio de técnicas modernas e cada vez mais aprimoradas, essas plantas podem ser fontes valiosas para novas descobertas, além de

representarem alternativa menos custosa, mais disponível e de fácil consumo, quer seja na forma bruta ou através de preparações simples (PARK e PEZZUTTO, 2002). Por isto é cada vez mais valorizado o uso de plantas que medeiam respostas benéficas, devido aos constituintes fitoquímicos encontrados nesse tipo de material e plantas utilizadas como medicinais, são uma importante fonte de antioxidantes (ARUOMA, 2003).

Somando-se ao fato da crescente necessidade de novos antioxidantes, aqueles que são sintéticos podem estar envolvidos com vários efeitos colaterais (ITO et al., 1983) e com vários riscos a saúde, como danos hepáticos e câncer em animais de laboratório (GAO, IGALASHI e NUKINA, 1999; WILLIAMS, IATROPOULOS e WHYSNER, 1999; OSAWA e NAMIKI, 1981). Nesse sentido, se torna clara a necessidade de antioxidantes que reúnam eficácia, baixo custo e menor toxicidade, por isso antioxidantes naturais de plantas se caracterizam como fontes interessantes.

Alguns metabólitos secundários de plantas, como compostos fenólicos e flavonóides têm sido relatados como potentes sequestradores de radicais livres, sendo encontrados em todas as partes das plantas, tais como folhas, frutos, sementes, raízes e casca (MATHEW e ABRAHAM, 2006). Dada à biodiversidade do nosso país, torna-se cada vez mais interessante uma análise sistematizada e extensa de extratos tipicamente brasileiros que possam fornecer compostos com atividade antioxidante.

Um número razoável de antioxidantes naturais já foi descrito, provenientes, principalmente, de diferentes tipos de materiais de plantas, tais como sementes oleaginosas, cereais, legumes, frutas, folhas, raízes, especiarias e ervas (CULLEN et al, 1997.; KAMAT et al, 2000.; DEVASAGAYAM et al, 2001.; DE NIGRIS et al, 2003.; NEGI e JAYAPRAKASHA, 2003, SURVESWARAN et al., 2007, SOURI et al., 2008). A possibilidade de inclusão de componentes fitoquímicos, com reconhecida atividade

antioxidante, no dia a dia dos seres humanos poderia ajudar a proteger o corpo de danos oxidativos, o que é substancialmente importante.

Nesse sentido, buscando avaliar o potencial antioxidante de plantas nativas da flora brasileira o objetivo do presente trabalho foi investigar a capacidade antioxidante de diferentes extratos de plantas, por diferentes ensaios *in vitro* (ABTS, DPPH, FRAP, ORAC), e determinar se existe correlação entre os métodos testados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente diferentes extratos de plantas foram testados para atividade antioxidante segundo os métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), ABTS (3-etil-benzotiazolina-6- ácido sulfônico), FRAP (Poder antioxidante de redução do íon férrico), ORAC (Capacidade de absorção do radical oxigênio), todos adquiridos de Sigma Aldrich (EUA).

Todos os extratos etanólicos das espécies vegetais testadas (Quadro 1) foram produzidos no Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais (LPQRN) do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas – Brasil.

Quadro 1. Espécies vegetais testadas

Família/Planta	Parte	Nome popular	Uso	Ref.
Anacardeaceae				
<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	CC	Braúna, barauna, braúna do sertão	Dor de dentes e ouvido. Anti-histérica, antiinflamatório e anti-séptico	10
<i>Anacardium occidentale</i> L.	F	Cajueiro	Dor de dente, anti-inflamatório, bronquites e artrites, cólicas intestinais	10
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	F	Aroeira do sertão	Tratamento de afecções cutâneas, problemas do aparelho urinário e das vias respiratórias.	10
Anonaceae				
<i>Annona muricata</i> L.	F	Graviola	Problemas do coração, insônia, febre, malária, hepatite, diarreia, tétano, furúnculos.	10

<i>Annona muricata</i> L.	S	Graviola	Atividade antiparasitária, moluscicida e antivírus <i>Herpes simplex</i>	10
Apocynaceae				
<i>Himatanthus obovata</i> Müll. Arg	F	Tibornia, angélica, pau de leite	Tratamento de úlcera gástrica, antielmintico, doença hepática	10
<i>Himatanthus obovata</i> Müll. Arg	CL	Tibornia, angélica, pau de leite	Depurativo	10
<i>Mandevilla hirsuta</i> Rich.	CL	Jasminzinho trepador, cipó de porco, feijão de dois	-	
<i>Mandevilla hirsuta</i> Rich.	F	Jasminzinho trepador, cipó de porco, feijão de dois	Usado para picada de cobra	
Araceae				
<i>Anthurium Affine</i> Schott.	CL	Antúrio, Antúrio Selvagem	Cura de micoses, doenças cardiovasculares e diabetes.	
Asclepiadaceae				
<i>Ditassa crassifolia</i> Decne.	CL		-	
Boraginaceae				
<i>Auxemma oncoalyx</i> Taub.	CC	Pau branco do sertão	Analgésico, anti-inflamatório	10
<i>Auxemma oncoalyx</i> Taub.	EC	Pau branco do sertão	Tratamento de feridas e queimaduras	10
Combretaceae				
<i>Terminalia catappa</i> L.	F	Amendoeira da praia, chapéu de sol, figueira da índia	Agente antibacteriano, antidiabético e antiinflamatório	10
<i>Terminalia catappa</i> L.	M	Amendoeira da praia, chapéu de sol, figueira da índia	-	10
<i>Terminalia catappa</i> L.	C	Amendoeira da praia, chapéu de sol, figueira da índia	Diarreia, febre gástrica e biliar e vermes intestinais.	10
Compositae				
<i>Vernonia brasiliiana</i> L.	CL	Assa peixe, pau de muquém, manjerição de cavalo	Tosse, gripe, liberação das vias aéreas.	
Cordeaceae				
<i>Cordia salzmannii</i> DC.	CL	Maria preta	O óleo é cicatrizante e laxante.	
<i>Cordia salzmannii</i> DC.	F	Maria preta	Antiinflamatória, cicatrizante, diurético, antiulcerogênea.	
Euforbiaceae				
<i>Euphorbia pulcherrima</i> Wild.	CL	(Bico de papagaio)	Processos inflamatórios. Promover a secreção do leite em lactantes.	10
<i>Jatropha curcas</i> L.	F	Pinhão manso, mandubiguaçu, pinhão-de-purga,	Ação cicatrizante, hipogliceminante.	10
<i>Jatropha curcas</i> L.	CL	Pinhão manso, mandubiguaçu, pinhão-de-purga,	O óleo é purgativo e usado no tratamento de reumatismo.	10
Guttiferae				
<i>Rheedia brasiliensis</i> Mart.	CR	Bacuri, bacupari	Expectorante.	10
<i>Rheedia brasiliensis</i> Mart.	F	Bacuri, bacupari	Tratamento de tumores, inflamações do trato urinário e para aliviar dores.	10
Lamiaceae				
<i>Hyptis fruticosa</i> Salzm.	F	Alecrim de Tabuleiro, alecrim do campo	Distúrbios gastrointestinais, infecções de pele, congestão nasal, febre.	
Leguminosae				
<i>Mimosa tenuiflora</i> Wild.	C	Jurema preta	Queimadura, acne, analgésico, sedativo	
<i>Mimosa tenuiflora</i> Wild.	F	Jurema preta	Cicatrizante, anti-inflamatório, antiviral, e	

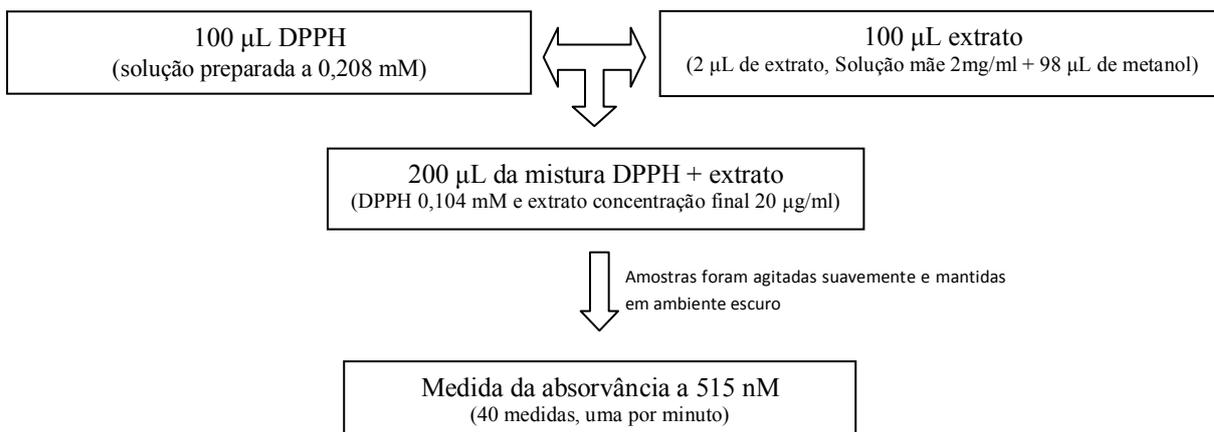
			antisséptico.	
<i>Parkia platycephala</i> Benth.	CL	Fava de bolota, badoqueiro, fava de boi	Tratamento de feridas e diarreia.	10
<i>Pterodon polygalaeflorus</i> Benth.	F	Sucupira, sucupira branca, sucupira lisa	Tratamento de reumatismo, diabetes, dor de garganta.	10
<i>Stryphnodendron obovatum</i> Benth.	F	Barbatimão	Diarreia, agente anti-inflamatório, e cicatrizante.	10
<i>Erythrina mulungu</i> Mart.	F	Mulungú	Tratamento de bronquites e inflamação	10
<i>Erythrina mulungu</i> Mart.	C	Mulungú	Antidepressivo, sedativo, antibacteriano, anti-inflamatório.	10
<i>Erythrina vellutina</i> Wild.	F	Mulungú, mulungú da flor amarela ou da flor vermelha	Histeria, insônia; dores reumáticas, bronquites e asma	10
Moraceae				
<i>Chlorophora tinctoria</i> L.	CR	Amarelinho, amora, amora branca	Cicatrizante, anti-inflamatório e dor de dente	10
<i>Dorstenia bryoniaeflora</i> Mart.	CL	Caiapiá	Diurético, febrífugo	10
<i>Dorstenia bryoniaeflora</i> Mart.	R	Caiapiá	Diurético, febrífugo	10
<i>Dorstenia bryoniaeflora</i> Mart.	F+R	Caiapiá	Diurético, febrífugo	10
Myrtaceae				
<i>Syzygium malaccense</i> L.	F	Jambo, jambo vermelho	Laxativo e antidiabético	
Rubiaceae				
<i>Morinda citrifolia</i> L.	S	Noni	Alergia, asma, câncer, depressão, diabetes, e hipertensão	
Sapindaceae				
<i>Cupania oblongifolia</i> Mart.	C	Camboatá, camboatá folha larga Pau magro	Tratamento de tosse e coqueluche.	10
<i>Cupania platycarpa</i> Radlk.	C	Camboatá, camboatão	Tratamento de tosse e coqueluche.	
<i>Sapindus saponaria</i> L.	CC	Pau de sabão, saboneteiro, sabão de macaco	Úlceras, feridas na pele, e anti-inflamatório.	10
Simaroubaceae				
<i>Simarouba amara</i> Aubl.	F	Marupá, tamanqueira, paraíba, praíba	Anemia, febre, diarreia e parasitas intestinais	10
<i>Simarouba amara</i> Aubl.	CL	Marupá, tamanqueira, paraíba, praíba	Malária e leucemia	10
<i>Quassia amara</i> L.	R	Pau tenente, pau amargo	Energético, antitérmico e vômitos espasmódicos	10
<i>Quassia amara</i> L.	F	Pau tenente, pau amargo	Chá digestivo e tratamento da malária	10
Verbenaceae				
<i>Vitex agnus-castus</i> L.	F	Alecrim de angola, Pimenta do monge	Depressão, distúrbios menstruais, doença do ovário policístico e infertilidade	10
Vochysiaceae				
<i>Vochysia</i> sp.	F	-	Antibacteriano, expectorante, antifúngico e anti-inflamatório	10
Zingiberaceae				
<i>Alpinia speciosa</i> K. Schum	R	Macassá, nóz-moscada	Composição de estimulantes	10

Legenda: F= folha; C= casca; R= raiz; S= semente; CC= Casca do caule; CR= casca da raiz; CL= Caule; M=madeira; F+R= fruto + raiz; F+S= fruto + semente; EC= Entrecasca. ND Não Detectado.

2.1 Determinação da atividade antioxidante pela capacidade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil – Método DPPH

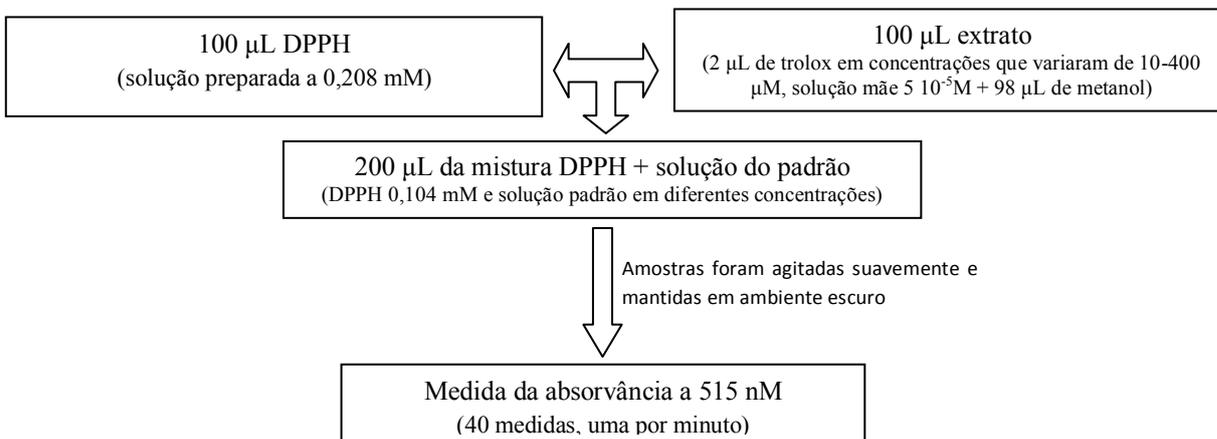
O método colorimétrico que utiliza o radical livre DPPH foi executado segundo Cheng, Moore e Liangli (2006). O DPPH foi dissolvido em etanol, obtendo-se a concentração final de 0,104 mM no experimento, conforme apresentado na Figura 1. Após a etapa de preparo das soluções seguiu-se para a determinação da atividade sequestradora de radicais livres. As soluções referentes ao antioxidante padrão (trolox®) foram preparadas em diferentes concentrações partindo-se da concentração de $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$, conforme Figura 2. As soluções dos extratos etanólicos secos foram preparados a partir de solução estoque de concentração inicial de 2 mg/ml. Rapidamente, utilizando uma microplaca de 96 poços, as soluções contendo 100 μL de cada extrato (98 μL de metanol + 2 μL de solução 2 mg/ml do extrato diluído em metanol) foram misturadas a 100 μL da solução radicalar DPPH a 0,208mM, seguido por agitação suave, resultando na concentração final de 0,02 mg/mL. A absorvância foi medida a 515nm após 40 minutos, por espectrometria. Durante este período a placa foi coberta para evitar a evaporação do solvente e mantida no escuro até determinação. A curva padrão, cuja faixa de concentração variou de 10 μM - 400 μM , foi construída misturando-se 100 μL do composto antioxidante padrão Trolox® (98 μL de metanol + 2 μL de trolox em diferentes concentrações) a 100 μL da solução do radical DPPH (0,208mM), seguido por agitação suave. A absorvância foi medida a 515nm após 40min, por espectrometria. A equação da reta foi determinada com $R^2=0,9908$.

Figura 1. Procedimento de preparo do ensaio DPPH utilizando os extratos



Todas as quantificações foram realizadas em quadruplicata e os resultados foram expressos em μmol de equivalente Trolox por grama de extrato seco ($\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco), representados em tabela por média \pm DP.

Figura 2. Procedimento de preparo do ensaio DPPH utilizando composto padrão, Trolox®.



As análises foram realizadas em espectrofotômetro com leitora de microplaca Thermo Scientific – Multiskan Spectrum (Shimadzu).

2.2 Determinação da Atividade Antioxidante total pela Captura do Radical livre 3-etil-benzotiazolina-6- ácido sulfônico – Método ABTS

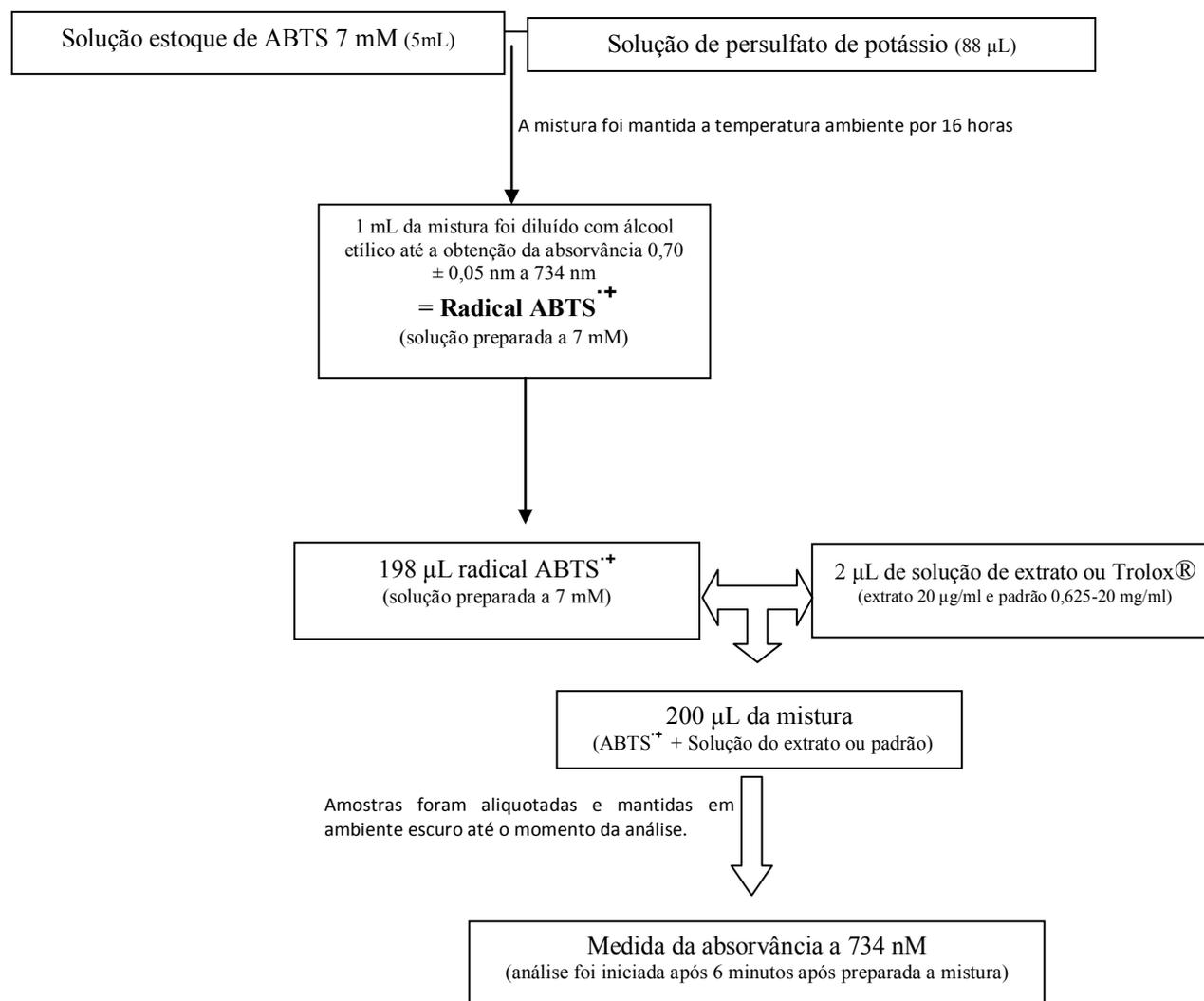
O método colorimétrico que utiliza o radical ABTS (2,2 azino bis (3-etilbenzeno tiazolina 6 ácido sulfônico) foi executado segundo Rufino et al. (2007), com modificações. O radical ABTS foi preparado a partir da reação de 5 mL de solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas.

Na sequência, 1 mL da mistura foi diluído em álcool etílico até obter uma absorbância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm. Em ambiente escuro, foram transferidas alíquotas de 2 µL do extrato (solução estoque de 2mg/ml) e 198 µL do radical ABTS 7 mM foram quantificados a 734 nm por espectrometria, conforme Figura 3. As análises foram realizadas em espectrofotômetro com leitora de microplaca Thermo Scientific – Multiskan (Shimadzu).

A curva padrão foi construída misturando-se 2 µL do antioxidante padrão Trolox® (solução estoque de 2mg/ml) e 198 µL do radical ABTS 7 mM; as concentrações variaram de 50 - 4000µM. A quantificação foi realizada a 734 nm, por espectrofotômetro.

Todas as quantificações foram realizadas em quadruplicata e os resultados foram expressos em µmol de equivalente Trolox por grama de extrato seco, µmol ET/g de extrato seco, (média ± DP), a concentração final das soluções dos extratos adicionados a placa foi 0,02mg/mL ($R^2=0,9985$).

Figura 3. Esquema de análise método ABTS, utilizado para identificação da atividade antioxidante tanto dos extratos quanto do composto padrão.



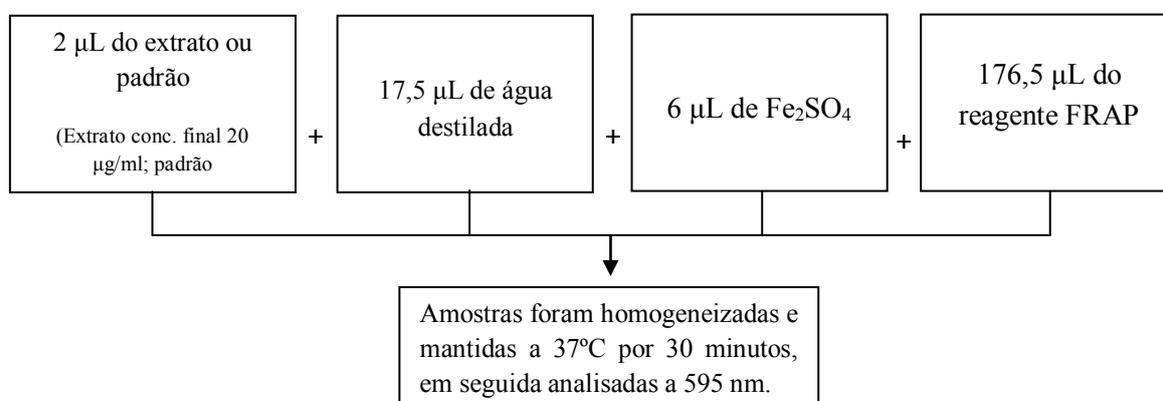
2.3 Determinação da Poder Antioxidante Total pela Redução do Íon Férrico – Método FRAP

O método que utiliza o poder redutor do ferro como quantificador da atividade antioxidante foi realizado segundo Rufino et al. (2006).

Inicialmente, foi transferida, em ambiente escuro, uma alíquota de 2 µL de cada diluição do padrão Trolox®, ou, do extrato para eppendorf's®, e foram acrescentados 17,5 µL de água destilada, 6 µL de Fe₂SO₄ e 176,5 µL do reagente FRAP. Em seguida,

a mistura foi homogeneizada e mantida à 37 °C. A leitura foi realizada a 595 nm, após 30 minutos de preparada a mistura, conforme Figura 4. O reagente FRAP foi utilizado como branco para calibrar o equipamento. Em seguida, foi determinada a equação da reta, de acordo com a faixa de concentração do composto padrão, que variou de 50 - 1000 μ M. As análises foram realizadas em espectrofotômetro com leitora de microplaca Thermo Scientific – Multiskan Spectrum (Shimadzu).

Figura 4. Esquema na análise FRAP



Todas as quantificações foram realizadas em quadruplicata e os resultados foram expressos em μ mol de equivalente Trolox por grama de extrato seco (média \pm DP); a concentração final das soluções dos extratos adicionados a placa foi 0,02mg/ml, $r^2=0,9997$.

2.4 Método Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio - Método ORAC

O procedimento foi baseado em estudos anteriores que utilizaram a fluoresceína como agente fluorescente (OU et al, 2002; OU, HAMPSCH-WOODILL e PRIOR, 2001; PRIOR et al., 2003). O método foi adaptado para avaliação da atividade anti radical livre de antioxidantes lipofílicos (HUANG et al., 2002).

$S_{Mistura} = 1176\mu\text{L de tampão} + 14\mu\text{L de fluoresceína} + 70\mu\text{L de Extrato* ou padrão**} + 140\mu\text{L de APPH}$

Todas as soluções foram preparadas com solução tampão fosfato 75 mM (pH 7,4). Foram preparadas soluções de fluoresceína ($6,3 \times 10^{-6}$ M), dicloridrato de 2,2'-Azibis 2-amidino-propano – AAPH (0,128M), solução do padrão Trolox® (2×10^{-3} M) e a solução contendo extrato vegetal (2mg/ml). A reação foi desencadeada pela adição do AAPH as soluções, conforme:

As medidas foram feitas em duplicata em espectrofluorímetro RF-5301PC (Shimadzu), equipado com célula termostática e agitador. O comprimento de onda de excitação e emissão foram de 493 e 517 nm, respectivamente. A avaliação da inibição foi realizada através da diferença de áreas entre a curva obtida com o controle e as curvas obtidas com as amostras (extratos) (OU et al, 2002; OU, HAMPSCH-WOODILL e PRIOR, 2001; HUANG et al, 2001). Para os extratos ou composto padrão, utilizou-se a seguinte equação, que tem como base a área sob a curva (AUC) (OU; HAMPSCH-WOODILL e PRIOR, 2001):



Os resultados do ensaio ORAC foram expressos em micromoles de equivalente Trolox por grama de extrato seco ($\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco).

2.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A capacidade antioxidante foi expressa em micromol de equivalente Trolox por grama de extrato seco ($\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco). Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson e construídos gráficos de dispersão em pontos para verificar as relações entre os

diferentes pares de métodos de ensaios antioxidantes. A comparação dos coeficientes de correlação entre os diferentes pares foi realizada por meio do teste Z de Fisher. Foi considerada uma abordagem bicaudal e um valor de alfa igual à 5% para todas as análises.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma análise sistemática foi feita no presente estudo, em que diferentes extratos foram testados, como demonstrado na Tabela 1, pelos métodos DPPH, ABTS, FRAP e ORAC. Dos métodos realizados neste estudo, três são baseados em espectrofotometria (DPPH, ABTS, FRAP) e um, em espectrofluorimetria (ORAC). As plantas analisadas são nativas da flora brasileira e são provenientes de diferentes regiões do país, muitas delas são utilizadas na medicina popular.

Dentre os extratos analisados, observou-se grande variação entre as amostras, em todos os testes. Os 10 extratos que apresentaram melhores atividades em cada teste foram ranqueados, conforme enumeração superescrita na Tabela 1 e também podem ser vistos no Quadro 2. Inicialmente, pode-se perceber que muitos extratos apresentaram alta atividade antioxidante, em todos ou algum ensaio de determinação e também extratos que não apresentaram atividade.

O método ABTS possui mecanismo baseado na redução do radical 3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico. A interação com o antioxidante tem sido extensivamente estudada. Sabe-se que o radical ABTS é reduzido por antioxidantes, através de transferência de elétrons ou por transferência de um átomo de hidrogênio e assim é desativado. Foi também comprovado que os antioxidantes podem reagir com os radicais e formar produtos de adição ou degradação do ABTS (CHRISTODOULEAS et

al., 2014). Este ensaio é particularmente interessante, pois, como a absorção ocorre a 734nm, as interferências de cor são eliminadas (LI et al., 2008). Vários fatores favorecem o uso do ensaio ABTS, uma forma rápida, robusta e precisa de avaliar sistematicamente a capacidade antioxidante total de extratos de plantas, em larga escala (SURVESWARAN et al., 2007). No entanto, tem sido recomendado que pelo menos dois métodos devam ser usados, uma vez que as diferenças entre os diversos métodos de investigação são substanciais (SCHLESIER et al., 2002).

Segundo o método ABTS, os resultados aqui relatados indicaram considerável diferença inter extratos, tendo o mais ativo demonstrado atividade antioxidante de 1997,52 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco e extratos em que não foi detectada nenhuma atividade. Os extratos *Anacardium occidentale* (Folha), *Anthurium affine* (Caule), *Auxemma oncocalyx* (Casca do caule), *Auxemma oncocalyx* (Entrecasca), *Cordia salzmanni* (Caule), *Cupania oblongifolia* (Casca), *Cupania platycarpa*, (Casca), *Mimosa tenuiflora* (Casca), *Mimosa tenuiflora* (Folha), *Myracrodruon urundeuva* (Caule), *Quassia amara* (Folha), *Rheedia brasiliensis* (Folha), *Schinopsis brasiliensis* (Casca do caule), *Simarouba amara* (Caule), *Simarouba amara* (Folha), *Terminalia catappa* (Casca do caule), *Terminalia catappa* (Folha), *Terminalia catappa* (Madeira), 36% do total de extratos, apresentaram atividade muito alta, de acordo com a classificação de Surveswaran et al. (2007), que consideraram atividade antioxidante muito alta quando os extratos apresentaram níveis acima de 1000,01 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco pelo ensaio ABTS. Neste estudo foi considerada atividade antioxidante muito alta valores superiores a 1600 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco, sendo encontrado 10 extratos que se encaixaram nesta classificação, conforme Tabela 1.

Ainda sobre o ensaio ABTS, quando comparado aos achados de Priya, Radhika e Siddhuraju (2012) que afirmaram que extrato de *Solanum trilobatum* apresentava

eficiente atividade antioxidante (268,9 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco), os resultados presentes são bem mais expressivos. Por exemplo, os 10 extratos vegetais que demonstraram maior atividade antioxidante (Tabela 1), testados pelo o método ABTS, foram cerca de 6 vezes mais potentes e 35% do total dos extratos mais efetivos em estabilizar o radical ABTS, quando comparados ao extrato de *Solanum trilobatum*.

Os resultados aqui demonstrados, pelos 10 mais ativos extratos vegetais (destacados comm numeração superescrita na Tabela 1), foram mais potentes ou bastante semelhantes ao ácido ascórbico (971,4 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco), Butilhidroxianisol (1555,6 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco) e rutina (1301,0 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco), reconhecidos antioxidantes (PRIYA; RADHIKA e SIDDHURAJU, 2012). Adicionalmente, Subramanium et al. (2012) indicaram a importante atividade antioxidante dos extratos de folha (2143,79 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco) e casca do caule (1804 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco) de *Hildegardia populifolia*, muito próximos dos resultados aqui relatados.

Todos os estudos citados corroboram a informação de que parcela considerável dos extratos analisados na presente proposta é eficiente em evitar a oxidação pelo método ABTS. Principalment quando se refere às amostras mais potentes, como *Terminalia catappa* (Folha), *Mimosa tenuiflora* (Casca), *Myracrodruon urundeuva* (Caule), *Quassia amara* (Folha), *Schinopsis brasiliensis* (Casca do caule), *Auxemma oncocalyx* (Casca do caule), *Cupania oblongifolia* (Casca), *Cupania platycarpa*, (Casca), *Mimosa tenuiflora* (Folha), *Terminalia catappa* (Madeira). Isto indica, que os extratos são fontes importantes de compostos fitoquímicos com capacidade antioxidante, estimulando, assim, a identificação dos mesmos.

O método de determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH, baseia-se na capacidade do radical DPPH em aceitar um elétron desemparelhado ou

radical hidrogênio, quando na presença de um agente antioxidante, fazendo com que a transferência do hidrogênio para o DPPH, mediada pelo antioxidante, diminua a absorvância (CANKURTARAN et al., 2013). O radical DPPH é estável e facilmente sequestra um elétron ou hidrogênio na presença de um antioxidante, que pode ser reduzido a uma não radicalar, DPPH-H (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

No presente estudo, foi considerada atividade antioxidante alta pelo método DPPH, quando o resultado foi superior a 1000 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco.

Quando comparado aos resultados de Zou et al. (2011), que verificaram que extratos de lentilhas do tipo morton demonstravam atividade antioxidante importante, pelo ensaio DPPH (677,8 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco), os extratos *Terminalia catappa* (Folha), *Mimosa tenuiflora* (Casca), *Myracrodruon urundeuva* (Caule), *Quassia amara* (Folha), *Schinopsis brasiliensis* (Casca do caule), *Auxemma oncoccalyx* (Casca do caule), *Terminalia catappa* (Madeira), *Terminalia catappa* (Casca), *Rheedia brasiliensis* (Folha), *Auxemma oncoccalyx* (Entrecasca), *Cordia salzmanni* (Caule), *Simarouba amara* (Caule), *Cupania oblongifolia* (Casca), *Cupania platycarpa* (Casca), *Mimosa tenuiflora* (Folha), *Sapindus saponaria* (Casca do caule), *Annona muricata* (Folha), *Syzygium malaccense* (Folha), testados no presente estudo, demonstraram maior atividade sequestradora de radicais pelo mesmo método, com valores que variaram de 1339,53 – 893,00 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco, sendo os 10 extratos mais potentes (Tabela 1), do presente trabalho, quase duas vezes mais eficientes.

Da mesma forma, o estudo de Maisuthisakul, Pongsawatmanit e Gordon (2005) observou que o extrato de *Cratoxylum formosum* indicou alta atividade antioxidante pelo método DPPH, 2670 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco, valor este que se aproxima dos valores encontrados no presente trabalho, para os extratos *Quassia amara* (Folha), *Rheedia brasiliensis* (Folha), *Auxemma oncoccalyx* (Entrecasca), pelo mesmo método.

Ademais, 32% dos extratos testados, foram superiores ao composto hidroxitolueno butilado – BHT (730 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco), reconhecido antioxidante sintético, testado no mesmo estudo.

Tabela 1. Determinação da capacidade antioxidante de 50 extratos vegetais. Os resultados são apresentados em $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco.

Extratos	Parte	ABTS	DPPH	FRAP	ORAC
<i>Alpinia speciosa</i>	R	19,07±58,83	88,11±35,67	788,59±811,26	1182,05±305,18
<i>Anacardium occidentale</i>	F	1449,79±9,81	478,82±18,91	³ 48386,91±2732,25	ND
<i>Annona muricata</i>	S	479,64±99,86	127,86±21,28	18,78±136,21	114,34±68,61
<i>Annona muricata</i>	F	286,58±146,00	704,34±31,36	1512,44±499,06	ND
<i>Anthurium affine</i>	CL	1186,95±61,50	ND	ND	601,70±38,00
<i>Auxemma oncoccalyx</i>	Cc	⁶ 1878,43±47,45	³ 1676,60±53,30	14026,72±358,08	1680,89±258,13
<i>Auxemma oncoccalyx</i>	EC	1304,35±16,06	¹⁰ 1136,13±30,51	14376,33±612,19	⁴ 2495,41±30,62
<i>Chlorophora tinctoria</i>	CR	328,37±64,84	9,21±49,84	4227,34±462,53	ND
<i>Cordia salzmanni</i>	CL	1213,61±37,84	981,69±38,26	8078,97±485,98	1894,87±53,29
<i>Cordia salzmannii</i>	F	766,25±15,59	701,96±56,98	8235,53±251,67	1951,47±25,43
<i>Cupania oblongifolia</i>	C	⁷ 1856,61±3,64	824,17±79,40	⁹ 29791,39±1865,75	1983,22±11,43
<i>Cupania platycarpa</i>	C	⁸ 1835,36±6,84	926,11±27,99	17392,03±904,06	⁸ 2251,85±10,75
<i>Ditassa Crassifolia</i>	CL	169,55±50,73	152,38±51,31	4933,18±336,54	1282,75±220,19
<i>Dorstenia bryoniaeflora</i>	R	544,23±36,52	238,93±11,85	1766,81±2217,17	399,09±267,98
<i>Dorstenia bryoniaeflora</i>	F+S	285,29±45,71	23,05±8,46	824,63±262,78	785,97±165,18
<i>Dorstenia bryoniaeflora</i>	C	188,11±83,15	655,86±36,39	915,80±208,59	341,22± 10,87
<i>Erythrina mulungu</i>	F	648,57±60,31	371,88±36,37	6301,15±85,09	466,97±363,98
<i>Erythrina mulungu</i>	C	128,96±40,41	70,32±16,42	1857,46±115,22	567,67±186,91
<i>Erythrina vellutina</i>	F	41,98±46,56	9,068±29,58	4092,05±1092,90	1168,92±317,83
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	CL	220,43±71,37	657,15±34,83	1728,38±207,49	708,54±155,59
<i>Himatanthus obovata</i>	CL	145,99±37,75	614,51± 29,38	2610,35±126,07	851,95±406,14
<i>Himatanthus obovata</i>	F	88,27±53,15	14,51±60,01	251,09±36,58	689,61±153,51
<i>Hyptis fruticosa</i>	F	390,48±52,39	216,51±18,71	3823,35±207,47	457,13±635,83
<i>Jatropha curcas</i>	F	306,17±45,90	20,11±45,04	927,59±397,17	0
<i>Jatropha curcas</i>	CL	192,59±28,56	136,07±40,51	ND	671,91±228,25
<i>Mandevilla hirsuta</i>	CL	562,93±16,82	228,68±36,20	5954,65±258,91	¹ 2629,12±6,73
<i>Mandevilla hirsuta</i>	F	87,84±30,35	220,52±22,59	ND	ND
<i>Mimosa tenuiflora</i>	C	² 1955,73±48,6937	⁴ 1607,64±113,11	⁵ 40297,00±2245,90	¹⁰ 2157,02±36,95
<i>Mimosa tenuiflora</i>	F	⁹ 1731,59±50,38	688,20±5,46	3523,90±1268,83	ND
<i>Morinda citrifolia</i>	S	65,57±4,27	664,48±129,92	1255,00±269,15	560,98±102,50
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	CL	³ 1971,84±30,90	⁵ 1595,54±43,362	² 55594,46±1787,76	⁷ 2337,91±15,70
<i>Parkia platycephala</i>	CL	974,45±33,36	457,03±28,62	7780,42±616,65	⁶ 2360,33±78,70
<i>Pterodon polygalaeflorus</i>	CL	324,35±14,96	276,80±97,09	15792,67±835,85	ND

<i>Quassia amara</i>	F	⁴ 1933,67±24,01	¹ 1743,69±61,64	2805,95±721,09	ND
<i>Quassia amara</i>	R	96,10±62,32	ND	88,75±97,57	⁹ 2206,43±18,37
<i>Rheedia brasiliensis</i>	F	1337,07±50,97	² 1734,45±263,24	¹⁰ 26956,77±607,06	² 2499,41±692,42
<i>Rheedia brasiliensis</i>	CR	573,73±20,49	402,59±217,39	7894,54±731,95	ND
<i>Sapindus saponaria</i>	CC	434,66±69,67	772,92±32,74	5584,02±539,03	1241,42± 369,73
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	Cc	⁵ 1911,56±36,89	⁶ 1566,18±31,40	¹ 55762,17±2142,25	⁵ 2445,09±16,44
<i>Simarouba amara</i>	CL	1187,00±47,52	893,00±31,60	⁷ 35121,49±878,76	1583,45±44,25
<i>Simarouba amara</i>	F	1103,55±21,75	573,68±141,91	8493,75±378,03	1065,86±51,87
<i>Stryphnodendron obovatum</i>	F	3,94±95,11	ND	142,35±76,73	³ 2495,89±34,98
<i>Syzygium malaccense</i>	F	121,40±22,47	746,49±9,42	16304,95±192,57	1164,29±41,82
<i>Terminalia catappa</i>	F	¹ 1997,52±19,62	⁸ 1339,53±93,63	⁶ 37649,77±1522,96	1704,01±104,38
<i>Terminalia catappa</i>	M	¹⁰ 1665,09±36,69	⁷ 1471,48±70,27	⁴ 42699,81±1895,10	1765,34±51,09
<i>Terminalia catappa</i>	C	1588,80±46,17	⁹ 1229,18±49,69	⁸ 34182,35±165,99	1311,26± 65,78
<i>Vernonia brasiliana</i>	F	162,94±47,87	ND	1240,05±173,62	1418,09±20,13
<i>Vitex agnus-castus</i>	F	505,41±35,45	338,56±13,76	7830,70±224,46	1303,96±97,96
<i>Vochysia sp.</i>	F	ND	146,01±29,77	2930,54±461,30	ND

Legenda: F= folha; C= casca; R= raiz; S= semente; CC= Casca do caule; CR= casca da raiz; CL= Caule; M=madeira; F+R= fruto + raiz; F+S= fruto + semente; ND Não Detectado.

Números superescritos representam as 10 melhores amostras em cada ensaio, na coluna.

No presente estudo, as amostras apresentaram resultados parecidos nos testes DPPH e ABTS, quando se observa o mesmo extrato. Entre os 10 extratos que demonstraram as melhores capacidades antioxidantes, pelos métodos DPPH e ABTS, sete extratos são comuns aos dois ensaios, foram eles *Terminalia catappa*, *Mimosa tenuiflora*, *Myracrodruon urundeuva*, *Quassia amara*, *Schinopsis brasiliensis*, *Auxemma oncoccalyx* e *Terminalia catappa*, o que indica correlação entre os métodos.

O método FRAP mede a capacidade de redução do complexo formado entre 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) e cloreto férrico hexa-hidrato ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), através do aumento da absorvância, com base em íons ferrosos formados, demonstrando assim o potencial antioxidante da amostra (OU et al., 2002). A propriedade de redução indica que os compostos antioxidantes são doadores de elétrons e podem reduzir os intermediários oxidados do processo de peroxidação lipídica, de modo que atuam como antioxidantes primários e secundários (YEN e CHEN, 1995). Este ensaio é o único que mede diretamente antioxidante ou redutores em uma amostra, os demais ensaios são

mais indiretos, pois medem a inibição das espécies reativas geradas na mistura reacional, o que irá depender do tipo de espécies reativas usadas. Além disso, o ensaio FRAP utiliza antioxidantes como redutores em uma reação colorimétrica ligada ao redox e o pré-tratamento não é necessário. Portanto, os fatores estequiométricos são constantes e a linearidade é mantida ao longo de um grande intervalo (BLOMHOFF et al., 2006).

Quanto a este ensaio, os resultados relatados no presente trabalho são satisfatórios. Foram considerados correspondentes a atividade muito alta valores maiores que 20000,0 ET/g de extrato seco. A variação encontrada inter extratos foi de 55762,17 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco a nenhuma atividade. Os valores expressos por 72% dos extratos testados para o método FRAP foram superiores aos demonstrados pelo estudo de Kang, Li e Liu (2010), que testavam extratos de *Mitragyna rotundifolia* (Roxb.), cujos valores variaram de 139,69 a 1275,43 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco, indicados como de poder antioxidante moderado.

Gallego et al. (2013) ao estudarem extrato de ervas aromáticas encontraram que extratos de *Thymus vulgaris* e *Lavandula angustifolia* tinham um alto poder antioxidante (3100 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco e 2300 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco) e mais uma vez, quando comparados aos resultados do presente estudo, as amostras *Rheedia brasiliensis* (Folha), *Cupania oblongifolia* (Casca), *Terminalia catappa* (Casca), *Simarouba amara* (Caule), *Terminalia catappa* (Folha), *Mimosa tenuiflora* (Casca), *Terminalia catappa* (Madeira), *Anacardium occidentale* (Folha), *Myracrodruon urundeuva* (Caule), *Schinopsis brasiliensis* (Casca do caule), *Cupania platycarpa* (Casca), *Pterodon polygalaeflorus* (Caule), *Syzygium malaccense* (Folha), *Auxemma oncocalyx* (Entrecasca), *Auxemma oncocalyx* Cc, *Simarouba amara* (Folha), *Rheedia brasiliensis* (Casca da Raiz), *Cordia salzmanni* (Caule), *Cordia salzmannii* (Folha),

Parkia platycephala (Caule), *Vitex agnus-castus* (Folha), *Erythrina mulungu* (Folha), *Mandevilla hirsute* (Caule), *Sapindus saponaria* (Casca do caule), *Ditassa Crassifolia* (Caule), *Erythrina vellutina* (Folha), *Mimosa tenuiflora* (Folha), *Chlorophora tinctoria* (Casca da Raiz) e *Hyptis fruticosa* (Folha) apresentaram valores superiores. Isto fortalece a ideia de que os extratos testados no presente estudo têm alto poder redutor.

De acordo com o estudo de Skowrya et al. (2014), que avaliou vários extratos de *Caesalpinia spinosa*, cerca de 44% dos resultados aqui discutidos são mais potentes, apresentando resultado superior a 5990,00 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco, o valor mais alto referido pelo autor para o método FRAP.

Ensaio baseado na transferência de átomos de hidrogênio, como o teste ORAC, apresenta um esquema de reação competitiva, no qual antioxidante e substrato competem por radicais peroxila gerados termicamente (DUDONNÉ et al., 2009). Este ensaio baseia-se em um mecanismo reacional provocado pelos radicais peroxil que representam as espécies reativas predominantes em sistemas biológicos (MAGADULA et al., 2011). O ORAC requer equipamentos caros e de alto desempenho, mas é até então o único método que leva em consideração a completa ação dos radicais livres, além disso, ele usa a técnica de área sob a curva (AUC) para quantificação, o que permite combinar a porcentagem de inibição e o comprimento do tempo de inibição dos radicais livres pelos antioxidantes, em um único valor (PRIOR e CAO, 1999; HUANG et al., 2002).

Os valores encontrados para o ensaio ORAC variaram de 2629,12 $\mu\text{mol ET/g}$ a nenhuma atividade, uma variação considerável entre os extratos. Entre os que obtiveram valores acima de 2000 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco, considerados de alta atividade antioxidante neste estudo, para o ensaio ORAC (*Myracrodruon urundeuva* – Caule; *Schinopsis brasiliensis* - Casca do caule; *Cupania platycarpa* – Caule; *Rheedia*

brasiliensis – Folha; *Auxemma oncocalyx* - Entrecasca; *Parkia platycephala* – Caule; *Mandevilla hirsuta* – Caule; *Quassia amara* – Raiz; *Stryphnodendron obovatum* – Folha; *Mimosa tenuiflora* - Casca), foram similares aos observados por Gallego et al. (2013), que estudaram extratos aromáticos de *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* e *Lavandula angustifolia*, tendo apresentado atividade antioxidante alta, com valores 3200, 4600 e 4600 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco, respectivamente.

No estudo de Dudonné et al. (2009), os extratos de *Eucalyptus globulus* (2846 ET/g de extrato seco), *Laurus nobilis* (2963 ET/g de extrato seco), *Populus nigra* (2738 ET/g de extrato seco) e *Rosa damascena* (2382 ET/g de extrato seco) apresentaram expressiva atividade antioxidante, segundo o ORAC, resultados estes bastante similares aos encontrados para os extratos *Myracrodruon urundeuva* (Caule), *Schinopsis brasiliensis* (Casca do caule), *Cupania platycarpa* (Caule), *Rheedia brasiliensis* (Folha), *Auxemma oncocalyx* (Casca do caule), *Parkia platycephala* (Caule), *Mandevilla hirsuta* (Caule), *Quassia amar* (Raiz), *Stryphnodendron obovatum* (Folha), *Mimosa tenuiflora* (Casca).

Entre os métodos que dosam a capacidade total da atividade antioxidante é comum encontrar diferenças, visto que os mecanismos de ação e as condições reacionais são diferentes, o que pode interferir na mensuração da atividade (ARNAO, 2000; PRIOR, WU e SCHAICH, 2005).

Dos 49 extratos testados, aqueles que apresentaram os maiores valores foram ranqueados e enumerados com algarismo superescrito, conforme Tabela 1. Das amostras, 10 de cada ensaio foram selecionadas como promissores antioxidantes e recomendados para continuação de estudos que envolvam o sequestro de radicais livres e afins. No Quadro 2, pode ser vista a distribuição dos extratos mais potentes pelo respectivo método. Foi considerado com alto poder antioxidante aqueles extratos que

apresentaram valores acima de 1600,0; 1000,0; 20000,0 e 2000 $\mu\text{mol ET/g}$ de extrato seco, respectivamente para os métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC. Estes foram os pontos de corte para cada método, neste estudo.

Quadro 2. Distribuição da capacidade antioxidante dos extratos que apresentaram alta atividade nos diferentes métodos

Planta	Parte	ABTS*	DPPH*	FRAP*	ORAC*
<i>Anacardium occidentale</i>	Folha			3	
<i>Auxemma oncocalyx</i>	Casca do caule	6	3		
<i>Auxemma oncocalyx</i>	Entrecasca		10		4
<i>Cupania oblongifolia</i>	Casca	7		9	
<i>Cupania platycarpa</i>	Casca	8			8
<i>Mandevilla hirsuta</i>	Caule				1
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Casca	2		5	10
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Folha	9	4		
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Caule	3	5	2	7
<i>Parkia platycephala</i>	Caule				6
<i>Quassia amara</i>	Folha	4	1		
<i>Quassia amara</i>	Raiz				9
<i>Rheedia brasiliensis</i>	Folha		2	10	2
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	Casca do caule	5	6	1	5
<i>Simarouba amara</i>	Caule			7	
<i>Stryphnodendron obovatum</i>	Folha				3
<i>Terminalia catappa</i>	Madeira	10	7	4	
<i>Terminalia catappa</i>	Folha	1	8	6	
<i>Terminalia catappa</i>	Casca		9	8	

*Números indicam o ranking inter método.

Como pode ser notado, dentre os extratos, principalmente os que apresentaram as maiores atividades em cada método, muitos foram eficientes em inibir a oxidação por diferentes métodos. Dentre os extratos que apresentaram importante atividade antioxidante, 3 extratos foram comuns a todos os métodos, são eles: *Myracrodruon*

urundeuva (Caule), *Mimosa tenuiflora* (Casca), *Schinopsis brasiliensis* (Casca do caule). No que diz respeito à atividade sequestradora de radical pelos métodos DPPH e ABTS, 7 extratos demonstraram atividade por ambos os ensaios foram eles *Myracrodruon urundeuva* (Caule), *Mimosa tenuiflora* (Casca), *Schinopsis brasiliensis* (Casca do caule), *Terminalia catappa* (Madeira), *Terminalia catappa* (Folha), *Quassia amara* (Folha), *Auxemma oncocalyx* (Casca do caule). Além desses, *Terminalia catappa* (folha) e *Terminalia catappa* (madeira), demonstraram atividades pelos métodos ABTS, FRAP e ORAC, e a *Rheedia brasiliensis* (Folha) comum a FRAP e ORAC. Tais resultados levantaram a necessidade de testes de correlação entre os métodos

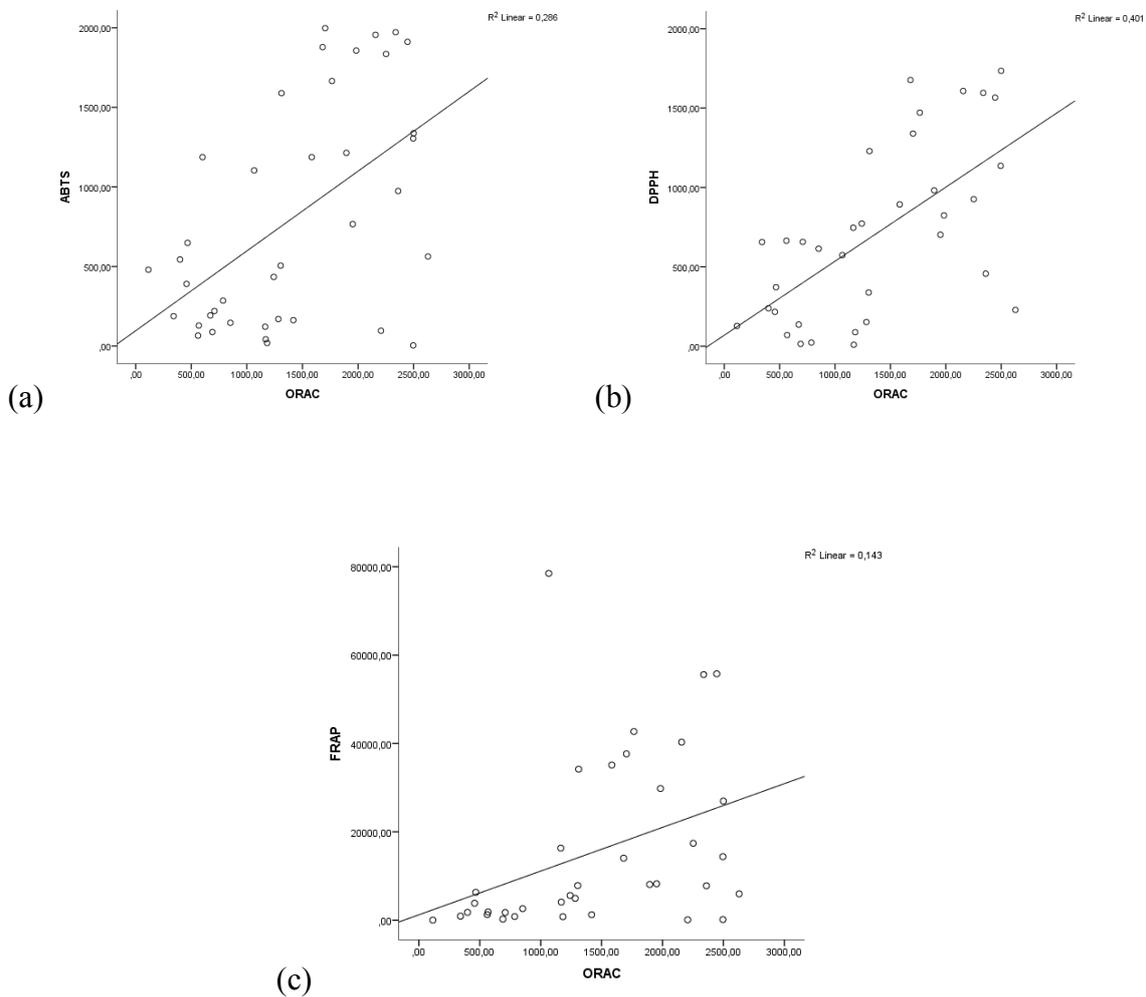
Após análise de correlação, observou-se no presente estudo correlação positiva e significativa para os métodos DPPH, FRAP, ABTS e ORAC para os diferentes extratos testados (Tabela 2). De forma similar a este estudo, Awika et al. (2003) observaram alta correlação entre ABTS, DPPH e ORAC para amostras de sorgo e seus produtos, em consonância com o presente estudo. Cabe ressaltar, que houve fraca correlação entre os métodos FRAP e ORAC no presente estudo, como demonstrada na Figura 5 e Tabela 2. Em divergência o estudo de Ou et al. (2002), que demonstrou não haver correlação entre as técnicas FRAP e ORAC em mais de 927 amostras vegetais secas e armazenadas em freezer, enquanto que esses métodos revelaram alta correlação para a fruta nirtilo no estudo de Connor, Luby e Tong (2002).

Tabela 2. Coeficiente de correlação (r) entre os ensaios.

	ORAC	DPPH	ABTS
DPPH	0,633*		
ABTS	0,535*	0,814*	
FRAP	0,378**	0,546*	0,674*

* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$

Figura 5. Correlação entre os ensaios ABTS e ORAC, coeficiente de correlação 0,535 (a); Correlação entre os ensaios DPPH e ORAC, coeficiente de correlação R 0,633 (b); Correlação entre os ensaios FRAP e ORAC, coeficiente de correlação $r = 0,378$.



Os diferentes coeficientes de correlação foram comparados entre si para verificar se alguma correlação, de algum par de métodos, possuía uma magnitude significativamente menor que a de outro par (Tabela 3). Apenas 4 pares de correlação diferiram significativamente uns dos outros. Isso pode ser explicado por dois fenômenos. Primeiro, a magnitude da correlação entre ABTS e DPPH ($r = 0,814$) foi consideravelmente alta, fazendo com que esses dois métodos sejam altamente concordantes no contexto destes extratos. A correlação entre FRAP e ORAC ($r = 0,378$) foi consideravelmente baixa.

A presente investigação comprova a ideia de que algumas plantas são fontes promissoras de antioxidantes naturais, principalmente no que diz respeito à flora brasileira que, dada a sua diversidade, ainda é pouco estudada. A correlação significativa entre os ensaios antioxidantes indica que as medidas da capacidade antioxidante total dos extratos vegetais são consistentes, visto que os ensaios avaliam diferentes características do poder antioxidante de cada extrato. No entanto, generalizações entre os métodos FRAP e ORAC devem ser tomadas com cuidado.

Tabela 3. Comparação de pares de métodos antioxidantes pelo teste z

Primeiro par (r)	Segundo par (r)	Valor de z	Valor de p
ABTS e DPPH (0,814)	ABTS e FRAP (0,674)	1,88	NS
ABTS e DPPH (0,814)	ABTS e ORAC (0,535)	2,83	<0,01
ABTS e DPPH (0,814)	DPPH e FRAP (0,546)	3,30	<0,01
ABTS e DPPH (0,814)	DPPH e ORAC (0,633)	1,83	NS
ABTS e DPPH (0,814)	FRAP e ORAC (0,378)	3,2	<0,01
ABTS e FRAP (0,674)	ABTS e ORAC (0,535)	1,01	NS
ABTS e FRAP (0,674)	ABTS e ORAC (0,535)	1,79	NS
ABTS e FRAP (0,674)	DPPH e ORAC (0,633)	0,3	NS
ABTS e FRAP (0,674)	FRAP e ORAC (0,378)	2,24	<0,05
ABTS e ORAC (0,535)	DPPH e FRAP (0,546)	0,61	NS
ABTS e ORAC (0,535)	DPPH e ORAC (0,633)	1,15	NS
ABTS e ORAC (0,535)	FRAP e ORAC (0,378)	1,3	NS
DPPH e FRAP (0,546)	DPPH e ORAC (0,633)	0,6	NS
DPPH e FRAP (0,546)	FRAP e ORAC (0,378)	1,28	NS
DPPH e ORAC (0,633)	FRAP e ORAC (0,378)	1,86	NS

4. CONCLUSÃO

Os extratos vegetais, provenientes de plantas nativas da flora brasileira, testados

neste estudo, foram considerados potenciais fontes de compostos fitoquímicos que exercem atividade antioxidante *in vitro*. No entanto, como estes compostos, que são os prováveis responsáveis pela atividade não foram identificados, faz-se necessário que estudos adicionais sejam desenvolvidos para caracterizar estes componentes. Ou mesmo, identificar se há um efeito sinérgico envolvido, nos diversos extratos estudados.

É ainda importante ressaltar que a atividade demonstrada principalmente pelos extratos *Terminalia catappa* (Casca), *Auxemma oncocalyx* (Entrecasca), *Cupania oblongifolia* (Casca), *Cupania platycarpa* (Casca), *Simarouba amara* (Caule), *Mandevilla hirsuta* (Caule), *Stryphnodendron obovatum* (Folha), *Parkia platycephala* (Caule), *Mimosa tenuiflora* (Folha), *Anacardium occidentale* (Folha), *Quassia amara* (Raiz), considerada alta por um ou mais métodos testados, os capacita para a consecução de estudos, não só *in vivo*, como também para outras atividades biológicas.

No que diz respeito aos métodos, os testes de correlação indicaram correlação positiva e significativa entre os ensaios ABTS, DPPH, FRAP e ORAC donde se conclui que, para as amostras vegetais testadas, há forte relação entre os métodos. Sendo então, necessário avaliar com cautela a necessidade de realização de todos os testes em um mesmo contexto, conforme recomenda a literatura.

5. REFERÊNCIAS

1. ARNAO, Marino B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, n. 11, p. 419-421, 2000.
2. ARUOMA, Okezie I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation*

- Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 523, p. 9-20, 2003.
3. AWIKA, Joseph M. et al. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 23, p. 6657-6662, 2003.
 4. BLOMHOFF, Rune et al. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition*, v. 96, n. S2, p. S52-S60, 2006.
 5. CANKURTARAN, Mustafa et al. Altered levels of homocysteine and serum natural antioxidants links oxidative damage to Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 33, n. 4, p. 1051-1058, 2013.
 6. CAROCHO, Márcio; FERREIRA, Isabel CFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, v. 51, p. 15-25, 2013.
 7. CONNOR, Ann Marie; LUBY, James J.; TONG, Cindy BS. Variability in antioxidant activity in blueberry and correlations among different antioxidant activity assays. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 127, n. 2, p. 238-244, 2002.
 8. CHENG, Zhihong; MOORE, Jeffrey; YU, Liangli. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 20, p. 7429-7436, 2006.
 9. CHRISTODOULEAS, Dionysios C. et al. Modified DPPH and ABTS Assays to Assess the Antioxidant Profile of Untreated Oils. *Food Analytical Methods*, p. 1-9, 2014.

10. Corrêa, M. P.; *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1974, vol. 5.
11. CULLEN, William et al. Effect of Maharishi-4 on H₂O₂-induced oxidative stress in isolated rat hearts. *J Ethnopharmacol*, 56, n. 3, p. 215–222, 2010.
12. DE NIGRIS, Filomena et al. Beneficial effects of antioxidants and L-arginine on oxidation-sensitive gene expression and endothelial NO synthase activity at sites of disturbed shear stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 3, p. 1420-1425, 2003..
13. DEVASAGAYAM, T. P. A. et al. Antioxidant action of curcumin. *Micronutrients and health: molecular biological mechanisms*, p. 42-59, 2001.
14. DUDONNÉ, Stephanie et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 5, p. 1768-1774, 2009.
15. GALLEGO, M. Gabriela et al. Antioxidant properties of three aromatic herbs (rosemary, thyme and lavender) in oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 90, n. 10, p. 1559-1568, 2013.
16. GAO, Jian-Jun; IGALASHI, Kiharu; NUKINA, Manabu. Radical scavenging activity of phenylpropanoid glycosides in *Caryopteris incana*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 63, n. 6, p. 983-988, 1999
17. GIUDICE, Aldo et al. Metabolic Syndrome, Insulin Resistance, Circadian Disruption, Antioxidants and Pancreatic Carcinoma: an Overview. *Journal of gastrointestinal and liver diseases: JGLD*, v. 23, n. 1, p. 73-77, 2014.

18. GOVINDARAJAN, R.; VIJAYAKUMAR, M.; PUSHPANGADAN, P. Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana'herbs of Ayurveda. *Journal of ethnopharmacology*, v. 99, n. 2, p. 165-178, 2005.
19. HUANG, Dejian et al. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 16, p. 4437-4444, 2002.
20. ITO, Nobuyuki et al. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 70, n. 2, p. 343-352, 1983.
21. KAMAT, J.P et al. (2000): Radio-protective properties of *Asparagus racemosus in vitro* in rat liver mitochondria. *J Ethnopharmacol* 71: 425–435.
22. KANG, Wen-Yi; LI, Cai-Fang; LIU, Yu-Xin. Antioxidant phenolic compounds and flavonoids of *Mitragyna rotundifolia* (Roxb.) Kuntze *in vitro*. *Medicinal chemistry research*, v. 19, n. 9, p. 1222-1232, 2010.
23. LI, Hua-Bin et al. Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science and Technology*, v. 41, n. 3, p. 385-390, 2008.
24. MAGADULA, J. JANGU et al. *In vitro* antioxidant and anti-HIV-1 protease (PR) activities of two Clusiaceae plants endemic to Tanzania. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, v. 5, n. 3, 2011.
25. MAISUTHISAKUL, Pitchaon; PONGSAWATMANIT, Rungnaphar; GORDON, Michael H. Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw (< i> *Cratoxylum formosum*</i> Dyer). *Food Chemistry*, v. 100, n. 4, p. 1620-1629, 2007.

26. MATHEW, Sindhu; ABRAHAM, T. Emilia. *In vitro* antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food and chemical toxicology*, v. 44, n. 2, p. 198-206, 2006.
27. NEGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. *Journal of food science*, v. 68, n. 4, p. 1473-1477, 2003.
28. NIKI, Etsuo. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.
29. OSAWA, Toshihiko; NAMIKI, Mitsuo. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 45, n. 3, p. 735-739, 1981.
30. OU, Boxin et al. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002
31. OU, Boxin; HAMPSCH-WOODILL, Maureen; PRIOR, Ronald L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.
32. OZGEN, Mustafa et al. Modified 2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 4, p. 1151-1157, 2006.

33. PARK, Eun Jung; PEZZUTO, John M. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 21, n. 3-4, p. 231-255, 2002.
34. PRIOR, Ronald L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.
35. PRIOR, Ronald L.; CAO, Guohua. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods^{< sup> 1}. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 27, n. 11, p. 1173-1181, 1999.</sup>
36. PRIOR, Ronald L.; WU, Xianli; SCHAICH, Karen. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005
37. PRIYA, Gopalakrishnan Sasi; RADHIKA, Raghu; SIDDHURAJU, Perumal. Antioxidant and antimicrobial activity of traditional Indian leaf vegetables: *Mukia maderaspatana* and *Solanum trilobatum*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, v. 4, n. 2, p. 513-521, 2012.
38. RUFINO, Maria do Socorro et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Comunicado técnico 128, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, jul 2007.
39. RUFINO, Maria do Socorro et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo Método de Redução do Ferro

- (FRAP). Comunicado técnico 125, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, dez 2006.
40. SACCHETTI, Gianni et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food chemistry*, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.
41. SÁNCHEZ-MORENO, Concepción. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems *Food Sci. Technol. Int.* v. 8, n. 3, p. 121– 137, 2002.
42. SCHLESIER, K. et al. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free radical research*, v. 36, n. 2, p. 177-187, 2002.
43. SKOWYRA, Monika et al. Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) pods *in vitro* and in model food emulsions. *Journal of the science of food and agriculture*, v. 94, n. 5, p. 911-918, 2014.
44. a.SOCHOR, Jiri et al. Content of phenolic compounds and antioxidant capacity in fruits of apricot genotypes. *Molecules*, v. 15, n. 9, p. 6285-6305, 2010.
45. b.SOCHOR, Jiri et al. Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages. *Molecules*, v. 15, n. 12, p. 8618-8640, 2010.
46. SOURI, E. et al. Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 16, n. 2, p. 83-87, 2008.
47. SUBRAMANIAM, Paulsamy et al. *In vitro* antioxidant activity and polyphenol estimation of methanolic extract of endangered medicinal tree species,

- Hildegardia populifolia (Roxb.) Schott & Endl. International Journal of Phytomedicine, v. 4, n. 3, p. 362-368, 2012.
48. SURVESWARAN, Siddharthan et al. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chemistry, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007
49. THAIPONG, Kriengsak et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of food composition and analysis, v. 19, n. 6, p. 669-675, 2006.
50. WILLIAMS, G. M.; IATROPOULOS, M. J.; WHYSNER, J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. Food and Chemical Toxicology, v. 37, n. 9, p. 1027-1038, 1999.
51. YEN, Gow-Chin; CHEN, Hui-Yin. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 43, n. 1, p. 27-32, 1995.
52. ZOU, Yanping et al. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. Journal of agricultural and food chemistry, v. 59, n. 6, p. 2268-2276, 2011.

4.2 ARTIGO:

***ATIVIDADE ANTIGLICANTE IN VITRO DE EXTRATOS DE PLANTAS NATIVAS DA
FLORA BRASILEIRA***

**ATIVIDADE ANTIGLICANTE *IN VITRO* DE EXTRATOS DE PLANTAS NATIVAS
DA FLORA BRASILEIRA**

Autores:

Ingrid Sofia Vieira de Melo^{a,b}*, Aldenir Feitosa dos Santos^c, Antônio Euzébio Goulart
Sant'Ana^a

^a Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas. Endereço: Cidade universitária, BR 101 (km 14), Tabuleiro dos Martins, CEP 57072-970. Maceió, AL – Brasil.

^b Departamento de agroindústria, Instituto Federal de Alagoas. Endereço: Conjunto Residencial Astolfo Lopes, s/n - Cidade Alta, CEP 57820-000. Murici - AL – Brasil.

^c Departamento de Química, Universidade Estadual de Alagoas. Endereço: Av. Governador Luís Cavalcante, Alto do Cruzeiro, CEP 57312-270. Arapiraca, AL – Brasil.

* Autor correspondente:

E-mail: ingridsofia_melo@hotmail.com

Telefone: +55 82 8805-1337

+55 82 3214-1388

Palavras chave: antiglicação, espectrofluorescência, Produtos de Glicação Avançada

Os autores declaram não haver conflitos de interesses

RESUMO

Os produtos de glicação avançada (AGE) são um grupo heterogêneo de compostos, cuja atividade está relacionada à capacidade destes de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Estudos com animais sugerem que a restrição de AGE na dieta pode exercer diversos efeitos protetores e o uso de determinadas plantas medicinais parece oferecer benefícios adicionais para pacientes diabéticos, por combinarem propriedades antiglicantes e antioxidantes. O presente trabalho teve como objetivo determinar a atividade antiglicante de extratos de plantas nativas da flora brasileira, com reconhecida atividade antioxidante e a possibilidade de correlação entre os testes antiglicante e antioxidantes. Estes extratos, foram previamente analisados pelos métodos ABTS (Determinação da atividade antioxidante total pela Captura do Radical livre 3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico), DPPH (Determinação da atividade antioxidante pela capacidade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil), FRAP (Determinação da Poder Antioxidante Total pela Redução do Íon Férrico) e ORAC (Método capacidade de Absorção do Radical Oxigênio). A atividade antiglicante foi verificada utilizando-se a mistura reacional de BSA:Glicose:Frutose, mais o extrato ou composto químico padrão, aminoguanidina. Foram detectados AGE fluorescentes por método espectrofluorimétrico. Dentre os extratos testados, 15 foram eficientes em inibir a glicação (valores de IC_{50} variaram de 17,67 – 134,75 $\mu\text{g/mL}$); no entanto, três não demonstraram a mesma atividade. Entre os extratos ativos, 5 não apresentaram diferença significativa em relação a aminoguanidina ($IC_{50} = 20,60 \mu\text{g/mL}$), foram elas *Cupania oblongifolia* Mart. (Casca), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Folha), *Auxemma oncocalyx* Taub. (Casca do caule), *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Folha), *Mimosa tenuiflora* Wild. (Folha), denotando a característica

de antiglicação por parte destas amostras vegetais, semelhante ao padrão. Análises de correlação foram conduzidas e demonstraram haver correlação negativa e significativa entre o IC_{50} da atividade antiglicante e os métodos ABTS e DPPH, levando a crer que esses ensaios são melhores preditores da atividade antiglicante, nas amostras pesquisadas. Análises de isolamento e caracterização de compostos com atividade antiglicante estão em curso. Os extratos vegetais analisados pela presente proposta são bastante promissores e podem indicar um novo caminho para o desenvolvimento de bioprodutos que possam ser úteis no tratamento de doenças que envolvem a geração de AGE.

ABSTRACT

The advanced glycation end products (AGE) are a heterogeneous group of compounds whose activity is related to their ability to modify the chemical and functional properties of diverse biological structures. Animal studies suggest that AGE restriction in the diet can have many protective effects and the use of certain medicinal plants seem to offer additional benefits for diabetic patients, by combining antyglycant and antioxidant properties. This study aimed to analyze extracts, with recognized antioxidant activity, for antyglycant activity in vitro, and to assess if these activities correlates with each other. These extracts were previously analyzed by ABTS methods (Determination of Antioxidant Activity Total for free Radical Capture 3-ethyl-6-sulfonic acid benzothiazoline), DPPH (Determination of antioxidant activity by scavenging capacity of the radical 2,2-diphenyl-1-picrilidrazil), FRAP (Determination of Antioxidant for ferric reducing antioxidant power) and ORAC (method oxygen radical absorbance capacity). The antyglycant activity was performed using the reaction mixture BSA:

glucose: fructose with the addition of the extract or the standard chemical compound, aminoguanidine. AGE were detected by spectrofluorimetric method. Among the extracts tested, 15 were effective in inhibiting glycation (IC_{50} values ranged from 17,67 – 134,75 $\mu\text{g/mL}$), although three did not show activity. Among the active extracts, 5 showed no significant difference from aminoguanidine ($IC_{50} = 20,60 \mu\text{g/mL}$), were they *Cupania oblongifolia* Mart. (Bark), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Leaf), *Auxemma onocalyx* Taub. (Stem bark), *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Leaf), *Mimosa tenuiflora* Wild. (Leaf), denoting the characteristic of anti-glycation by these plant samples, same as the standard. Correlation analyzes were conducted and demonstrated a negative correlation between the IC_{50} antyglycant activity and ABTS and DPPH methods, leading to the belief that these tests are better predictors of antyglycant activity in the studied samples. The plant extracts here analyzed are very promising and may indicate a new path for the development of bioproducts that may be useful in treating diseases that involves AGE generation.

1. Introdução

A glicação é o resultado da ligação de um grupo amina de proteína com um grupo carboxila de um açúcar redutor, como frutose ou glicose, sem ação de uma enzima. Esta é muitas vezes referida como “Reação de Maillard” ou “Glicação não enzimática”. Os Produtos Finais de Glicação Avançada – AGE são produzidos endogenamente e fora do corpo, nos alimentos, que por sua vez são consumidos (BODIGA; EDA e BODIGA, 2014). Os AGE dos alimentos são absorvidos no intestino, caem na circulação sanguínea e podem se depositar nos tecidos, serem metabolizados ou excretados na urina (SEMBA; NICKLETT e FERRUCCI, 2010).

O acúmulo de AGE promove consequências fisiológicas importantes em pacientes com diabetes, doenças cardiovasculares e renais (KILHOVD et al., 2007), entre outras. Esses componentes podem induzir estresse oxidativo e ligações cruzadas entre moléculas, que causam dano celular e tecidual, por prejudicar a função e liberação das proteínas envolvidas (ULRICH e CERAMI, 2000). Através dos receptores de AGE – RAGE, que são encontrados principalmente nas superfícies celulares (BASTA, 2008), AGE como a N ϵ -(carboxymethyl)lysine (CML) pode iniciar caminhos de sinalização associados às respostas pró-inflamatórias e NF- κ B (ULRICH e CERAMI, 2000; BIERHAUS, et al., 2005), favorecendo o surgimento e a progressão das diversas complicações do diabetes, por exemplo (URIBARRI, et al., 2010).

Estudos em animais sugerem que a restrição de AGE na dieta pode exercer diversos efeitos protetores, como preservação da estrutura morfológica das ilhotas de Langerhans e melhora da sensibilidade à insulina, aumento da concentração sérica das lipoproteínas de alta densidade (HDL colesterol), melhora da cicatrização de feridas no diabetes e prevenção da aterosclerose, da restenose após angioplastia e do desenvolvimento do diabetes tipo 1 (HOFMANN et al., 2002; LIN et al., 2002; PEPPA et al. 2003). Estudos demonstraram os benefícios do uso de plantas medicinais, que combinam propriedades antiglicantes e antioxidantes, em pacientes diabéticos (AHMAD e AHMED, 2006).

A glicação de proteínas geralmente é acompanhada por reações de oxidação. Embora o envolvimento de reações de oxidação na glicação seja reconhecido, os caminhos ainda são pouco esclarecidos. A autooxidação de produtos de Amadori pode formar compostos dicarbonílicos de proteínas via uma proteína enediol para a geração de radicais livres. Uma vez formados, esses compostos podem contribuir para a formação de AGE (AHMED, 2005). Reações de glicoxidação podem gerar AGE, como

a carboximetilisina ou pentosidina (MONNIER, 2003). Portanto, acredita-se que AGE induzem o estresse oxidativo e vice-versa; desta forma, radicais livres podem ser gerados por proteínas glicadas e por consequência, também podem acelerar a geração de proteínas glicadas (BAYNES e THORPE, 1999). Assim, acredita-se que extratos que exercem atividade antioxidante podem também exibir atividade antiglicante.

Portanto, a presente proposta teve como objetivo determinar a atividade antiglicante de extratos de plantas nativas da flora brasileira, com reconhecida atividade antioxidante e a possibilidade de correlação entre os testes antiglicante e antioxidantes.

2. Material e métodos

Para a mensuração da atividade antiglicante foram preparadas soluções contendo albumina sérica bovina (BSA 2mg/mL), glicose (200 mM) e frutose (200 mM), diluídos em tampão fosfato de sódio monobásico monoidratado (100 mM) (pH 7,4). Procedeu-se à confecção dos meios de incubação contendo BSA (1 mg/mL), glicose (100 mM), frutose (100 mM) com o composto teste, extrato de planta, ou composto químico padrão, a aminoguanidina, (veículo; 80% EtOH; 20% H₂O) em 100 mM de tampão fosfato de sódio. Foram analisadas 7 diferentes concentrações (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µg/mL) dos extratos, para a determinação de IC₅₀. Uma vez que o BSA é autofluorescente, foi feito um controle negativo contendo glicose (100 mM), frutose (100 mM), BSA (1 mg/mL) e veículo (100 mM tampão fosfato) e controle positivo, contendo aminoguanidina, cujas concentrações variaram de 0,39 a 50 µg/mL (0,30; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 µg/mL) preparados a partir de solução estoque de 1 mg/mL, composto com estabelecida atividade antiglicante (WU e YEN, 2005).

As amostras foram incubadas a 37 °C, sob o abrigo de luz e agitadas por um período de 7 dias e, posteriormente, a formação de AGE foi quantificada por meio de espectrofluorimetria ($\lambda_{\text{ex}} = 355$ e $\lambda_{\text{em}} = 440$). As fluorescências resultantes dos ensaios experimentais nas diferentes concentrações, que continham BSA, açúcar, extrato ou padrão puro e dos controles negativos foram comparadas com seus cognatos brancos para excluir a fluorescência da linha de base. As fluorescências (F) corrigidas para o controle negativo (Fcontrole negativo) e para os tratamentos experimentais (Fexperimental corrigido) foram utilizadas para determinar a porcentagem de inibição da formação de AGE, através da seguinte fórmula (BEAULIEU et al., 2010):

$$\% \text{ de inibição} = (F_{\text{controle negativo}} - F_{\text{experimental corrigido}} / F_{\text{controle negativo}})$$

Dezoito extratos, previamente testados para atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC, foram testados para atividade antiglicante. O resultado foi demonstrado pela média \pm DP de IC₅₀, definido como a quantidade do composto ($\mu\text{g/mL}$) necessário para reduzir 50% da formação de AGE, em comparação com o controle negativo. O efeito dos extratos vegetais sobre a formação de AGE foi analisado usando Análise de Variância (ANOVA). Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson e construídos gráficos de dispersão em pontos para verificar as relações entre os diferentes pares de métodos de ensaios antioxidantes e atividade antiglicante. $P < 0,05$ foi considerado como significância estatística.

3. Resultados e discussão

O resultado da análise de dose dependência dos extratos vegetais e do composto padrão, aminoguanidina, pode ser visto na Tabela 1. Os valores são demonstrados em média \pm DP do IC₅₀. Uma vez que os resultados são dados através da dose necessária

para inibir 50% da glicação, maior será o potencial antiglicante do extrato, quanto menor for o IC_{50} . Portanto, não apresentar diferença significativa em relação à aminoguanidina, permite dizer que esses extratos demonstraram atividade semelhante ao padrão.

Pode-se perceber, que a glicação foi eficientemente inibida por 15 dos 18 extratos testados, cujos valores de IC_{50} variaram de 17,67 – 134,65 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, três amostras vegetais não demonstraram exercer atividade alguma, foram elas, *Simarouba amara* Aubl., *Anthurium affine* Schott., *Ditassa crassifolia* Decne, conforme Tabela 1.

Os extratos *Cupania oblongifolia* Mart. (Casca), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Folha), *Auxemma onocalyx* Taub. (Casca do caule), *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Folha), *Mimosa tenuiflora* Wild. (Folha), os quais não apresentaram diferença significativa em comparação ao composto padrão aminoguanidina, um reconhecido agente antiglicante sintético, foram eficientes em inibir a glicação em estágios iniciais (Figura 2). Não há relatos na literatura científica de que estes extratos tenham atividade inibitória da glicação *in vitro* ou *in vivo*, o que aumentou a motivação para a presente proposta.

O trabalho de Harris et al. (2011), que estudou o efeito de plantas medicinais sobre a formação de AGE *in vitro*, promovendo a reação a partir de BSA:Glicose:Frutose, demonstrou que alguns extratos foram eficientes em inibir a glicação avançada, em concentrações que variaram de 0,4 – 38,6 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos de *Rhododendron groenlandicum* ($IC_{50} = 7,0 \mu\text{g/mL}$), *Vaccinium vitis-idae* L. Oeder ($IC_{50} = 10,8 \mu\text{g/mL}$), *Populus balsamifera* L. ($IC_{50} = 21,9 \mu\text{g/mL}$), *Abies balsamea* L. ($IC_{50} = 34,2 \mu\text{g/mL}$), *Sarracenia purpurea* L. ($IC_{50} = 38,6 \mu\text{g/mL}$) apresentaram resultados

semelhantes aos encontrados no presente estudo. Especialmente aqueles extratos que não demonstraram diferença significativa em relação à aminoguanidina (Figura 2).

Tabela 1. Comparação dos extratos de plantas testadas para atividade antiglicante e do composto padrão aminoguanidina

Extrato/padrão	Parte da planta	Família	IC ₅₀ µg/mL	Desvio-Padrão
Aminoguanidina	-		20,60	0,05
<i>Auxemma oncocalyx</i> Taub.	Casca do caule	Boraginaceae	17,67	0,67
<i>Cupania oblongifolia</i> Mart.	Casca	Sapindaceae	29,80	0,66
<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	Casca	Anacardeaceae	33,55	10,11
<i>Mimosa tenuiflora</i> Wild.	Folha	Leguminosae	38,81	0,93
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	Folha	Anacardeaceae	40,92	5,17
<i>Terminalia catappa</i> L.	Casca	Combretaceae	49,61	0,14
<i>Quassia amara</i> L.	Folha	Simaroubaceae	57,86	4,71
<i>Terminalia catappa</i> L.	Madeira	Combretaceae	58,69	0,12
<i>Rheedia brasiliensis</i> Mart.	Folha	Guttiferae	76,25	1,60
<i>Cordia salzmannii</i> DC.	Folha	Cordeaceae	78,62	37,17
<i>Cordia salzmannii</i> DC.	Caule	Cordeaceae	94,21	1,68
<i>Terminalia catappa</i> L.	Folha	Combretaceae	115,05	6,00
<i>Parkia platycephala</i> Benth.	Caule	Leguminosae	130,85	2,47
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Folha	Anacardeaceae	131,11	5,81
<i>Auxemma oncocalyx</i> Taub.	Entrecasca	Boraginaceae	134,75	5,85
<i>Simarouba amara</i> Aubl.	Caule	Simaroubaceae	NA	-
<i>Anthurium affine</i> Schott.	Caule	Araceae	NA	-
<i>Ditassa crassifolia</i> Decne.	Caule	Asclepiadaceae	NA	-

NA Amostra não atingiu 50% de inibição nas concentrações testadas

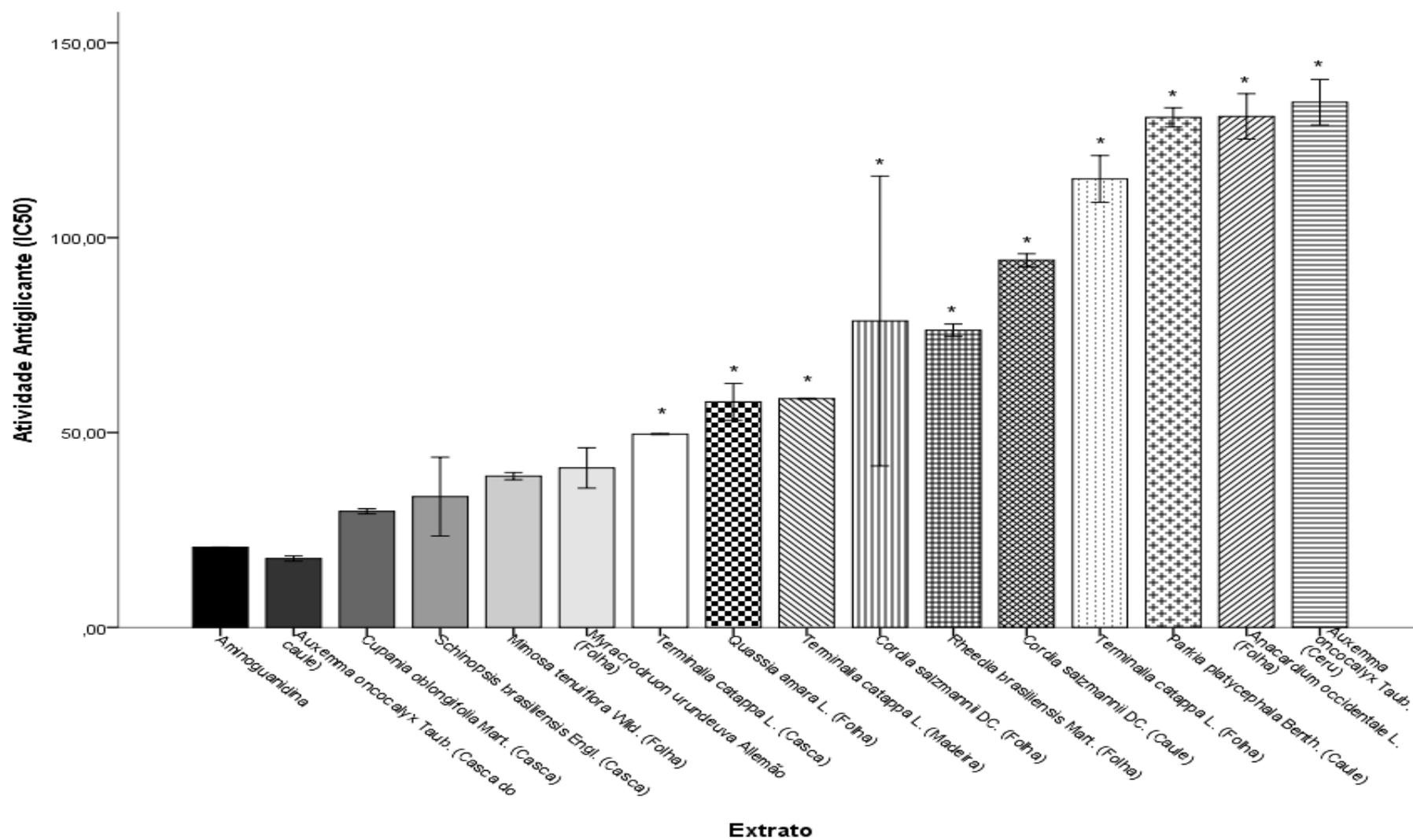
O estudo de Gutiérrez et al. (2010), que apresentou resultados baseados no modelo BSA-frutose, considerou importante atividade inibitória contra AGE os extratos cujos IC₅₀ variaram de 23,1 – 94,32 µg/mL. Os extratos que demonstraram maior eficácia, *Piper auritum* (IC₅₀ = 20,07 µg/mL), *Origanum majorana* (IC₅₀ = 38,16

$\mu\text{g/mL}$), *Crotolaria longirostrata* ($\text{IC}_{50} = 77,24 \mu\text{g/mL}$) e *Bixa orellana* ($\text{IC}_{50} = 94,32 \mu\text{g/mL}$), e o composto químico padrão aminoguanidina ($\text{IC}_{50} = 28,2 \mu\text{g/mL}$) foram semelhantes aos resultados encontrados pelo presente estudo, especialmente os extratos *Auxemma oncocalyx* ($\text{IC}_{50} = 17,67 \mu\text{g/mL}$), *Cupania oblongifolia* ($\text{IC}_{50} = 29,84 \mu\text{g/mL}$), *Schinopsis brasiliensis* ($\text{IC}_{50} = 33,55 \mu\text{g/mL}$), *Mimosa tenuiflora* ($\text{IC}_{50} = 38,81 \mu\text{g/mL}$) e *Myracrodruon urundeuva* ($\text{IC}_{50} = 40,92 \mu\text{g/mL}$) foram eficientes em inibir a glicação, assim como a aminoguanidina ($\text{IC}_{50} = 20,60 \mu\text{g/mL}$).

Adicionalmente, ao estudar plantas nativas das ilhas Mascarenhas e utilizadas na medicina popular como antidiabéticas, Mahomoodally et al. (2012) observaram que os extratos crus de *Antidesma madagascariense* Lam. ($\text{IC}_{50} \cong 28 \mu\text{g/mL}$), *Faujasiopsis flexuosa* Lam. ($\text{IC}_{50} \cong 55 \mu\text{g/mL}$) e *Ocimum tenuiflorum* L. ($\text{IC}_{50} \cong 31 \mu\text{g/mL}$) exibiram atividade antiglicante, quando comparado a aminoguanidina ($\text{IC}_{50} \cong 21 \mu\text{g/mL}$), havendo variação de acordo com a fração do extrato testado. Os achados são semelhantes aos dos extratos testados no presente, o que reforça a importante atividade antiglicante encontrada no exposto.

Em contrapartida o estudo de Kusirisin et al. (2009), que utilizou método bastante semelhante ao presente, em que o modelo adotado para indução da glicação foi a mistura BSA, glicose e frutose, apresentou resultados melhores que os do presente trabalho. Ao estudar extratos de plantas, utilizadas na medicina popular Tailandesa, os autores observaram que entre os extratos testados, os valores de IC_{50} variaram de 0,01 – 8,89 $\mu\text{g/mL}$. Estes valores são mais de duas vezes menores que o encontrado no extrato *Auxemma oncocalyx* Taub. (Casca), o mais ativo entre os 15 extratos ativos documentados aqui.

Figura 1. Atividade antiglicante dos extratos ativos para atividade antiglicante



Resultados expressos em IC₅₀ ± DP (µg/mL); p < 0,05

Existem evidências de que agentes capazes de exercer atividade antioxidante sejam também capazes de inibir a formação de AGE (NAKAGAWA et al., 2002). Os extratos testados no presente estudo para atividade inibitória da formação de AGE fluorescentes *in vitro*, e que foram previamente testados para atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC, possibilitaram as análises de correlação entre as diferentes atividades antioxidante e a atividade antiglicante, que podem ser vistos na Tabela 2.

Após análise de correlação, observou-se correlação negativa e significativa entre os métodos ABTS e o IC₅₀ da atividade antiglicante ($r = -0,525$; $p = 0,045$), assim como entre DPPH e IC₅₀ da atividade antiglicante ($r = -0,570$; $P = 0,026$). Nesse caso, podemos afirmar que para os extratos testados, os ensaios de atividade antioxidante que foram melhores preditores da atividade antiglicante foram os métodos DPPH e ABTS. Vale ressaltar que como os valores para quantificação da inibição da formação de AGE são dados pelo IC₅₀, é interessante que quanto maior a atividade antioxidante, o valor de IC₅₀ seja menor, para que isto signifique a relação entre as atividades antioxidantes e a antiglicante.

Tabela 2. Coeficiente de correlação (r) entre os ensaios que medem a capacidade antioxidante dos extratos e a atividade antiglicante

		ABTS	DPPH	FRAP	ORAC
Atividade antiglicante (IC ₅₀ µg/mL)	Correlação de Pearson	-0,525	-0,570	-0,228	0,260
	Grau de significância	0,045*	0,026*	0,415	0,391
	Número de amostras	15	15	15	13

* $p < 0,05$

Estes dados estão em consonância com os relatados por Dainpomak, Senakun e Siriamornpun (2014), encontraram correlação positiva e altamente significativa entre os métodos ABTS e a inibição da glicação (resultado dado em % de inibição), assim como entre o método DPPH e a inibição da glicação (resultado dado em % de inibição), ao estudarem variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) tailandês. De modo similar, o estudo de Premakumara, et al. (2013),

encontrou correlação positiva e significativa entre o ensaio ABTS e a atividade antiglicante (resultado dado em % de inibição) ao testar variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) do Sri Lanka. Adicionalmente, o trabalho de Park et al. (2012) mostrou correlação positiva e significativa entre o ensaio DPPH e a atividade inibitória de AGE para o extrato de *Corni fructus*, popularmente conhecido como antidiabético, em concordância com os resultados aqui relatados. Foi verificada correlação negativa, porém não significativa entre o ensaio FRAP e a inibição da glicação. Curiosamente, foi observada correlação positiva e não significativa entre ORAC e a inibição da glicação.

4. Conclusão

Diante do exposto, pode-se perceber que dentre os 18 extratos de plantas nativas da flora brasileira, testados para atividade antiglicante e previamente testados para atividade antioxidante (métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC), 15 foram eficientes em inibir a glicação, *in vitro*, candidatando-os a promissores agentes de atenuação de doenças associadas ao acúmulo de AGE. Resultados de isolamento e identificação de compostos ativos estão ainda em curso, e acredita-se possibilitarão melhores respostas.

Quanto à correlação entre os métodos, só houve correlação entre o ABTS e atividade antiglicante, e, DPPH e atividade antiglicante, demonstrando serem esses os melhores preditores da atividade antiglicante, para os extratos analisados.

Estudos adicionais *in vivo* são necessários, para que possam ser verificadas e comprovadas, tanto às atividades antioxidante e antiglicante, quanto a correlação entre elas.

5. Referências

1. AHMAD, Muhammed Saeed; AHMED, Nessar. Antiglycation properties of aged garlic extract: possible role in prevention of diabetic complications. *The Journal of nutrition*, v. 136, n. 3, p. 796S-799S, 2006.
2. AHMED, Nessar. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice*, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.
3. BASTA, Giuseppina. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*, v. 196, n. 1, p. 9-21, 2008.
4. BEAULIEU, Louis-Philippe et al. Inhibitory effect of the cree traditional medicine wiishichimanaan (Vaccinium vitis-idaea) on advanced glycation endproduct formation: identification of active principles. *Phytotherapy Research*, v. 24, n. 5, p. 741-747, 2010.
5. BIERHAUS, Angelika et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine*, v. 83, n. 11, p. 876-886, 2005.
6. BODIGA, Vijaya Lakshmi; EDA, Sasidhar Reddy; BODIGA, Sreedhar. Advanced glycation end products: role in pathology of diabetic cardiomyopathy. *Heart failure reviews*, v. 19, n. 1, p. 49-63, 2014.
7. DAIPONMAK, Wipavadee; SENAKUN, Chadapon; SIRIAMORNPNUN, Sirithon. Antiglycation capacity and antioxidant activities of different pigmented Thai rice. *International Journal of Food Science & Technology*, 2014.
8. GUTIÉRREZ, Rosa Martha Pérez et al. Anti-glycation effect of spices and chilies uses in traditional Mexican cuisine. *J Nat Prod*, v. 3, p. 95-102, 2010.
9. HARRIS, Cory S. et al. Inhibition of advanced glycation end product formation by medicinal plant extracts correlates with phenolic metabolites and antioxidant activity. *age*, v. 2, p. 4, 2011.

10. HARRIS, Cory S. et al. Investigating Wild Berries as a Dietary Approach to Reducing the Formation of Advanced Glycation Endproducts: Chemical Correlates of In Vitro Antiglycation Activity. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 69, n. 1, p. 71-77, 2014.
11. HOFMANN, Susanna M. et al. Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes*, v. 51, n. 7, p. 2082-2089, 2002.
12. KILHOVD, B. K. et al. Increased serum levels of advanced glycation endproducts predict total, cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes: a population-based 18 year follow-up study. *Diabetologia*, v. 50, n. 7, p. 1409-1417, 2007.
13. KUSIRISIN, W. et al. Antioxidative activity, polyphenolic content and anti-glycation effect of some Thai medicinal plants traditionally used in diabetic patients. *Medicinal Chemistry*, v. 5, n. 2, p. 139-147, 2009.
14. LIN, Reigh-Yi et al. Lowering of dietary advanced glycation endproducts (AGE) reduces neointimal formation after arterial injury in genetically hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis*, v. 163, n. 2, p. 303-311, 2002.
15. MAHOMOODALLY, Fawzi M. et al. Antioxidant, antiglycation and cytotoxicity evaluation of selected medicinal plants of the Mascarene Islands. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 12, n. 1, p. 165, 2012.
16. MONNIER, Vincent M. Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 419, n. 1, p. 1-15, 2003.
17. BAYNES, John W.; THORPE, Suzanne R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, v. 48, n. 1, p. 1-9, 1999.
18. NAKAGAWA, Takako et al. Protective activity of green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 50, n. 8, p. 2418-2422, 2002.

19. PARK, Chan Hum et al. Protective effects of Corni Fructus against advanced glycation endproducts and radical scavenging. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012.
20. PEPPA, Melpomeni et al. Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice. *Diabetes*, v. 52, n. 11, p. 2805-2813, 2003.
21. PERERA, P. R. D.; EKANAYAKE, S.; RANAWEERA, K. K. D. S. In vitro study on antiglycation activity, antioxidant activity and phenolic content of *Osbeckia octandra* L. leaf decoction. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 2, n. 4, p. 158-161, 2013.
22. PREMAKUMARA, G. A. S. et al. Antioxidant, anti-amylase and anti-glycation potential of brans of some Sri Lankan traditional and improved rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Journal of Cereal Science*, v. 58, n. 3, p. 451-456, 2013.
23. SEMBA, Richard D.; NICKLETT, Emily J.; FERRUCCI, Luigi. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype?. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, v. 65, n. 9, p. 963-975, 2010.
24. ULRICH, Peter; CERAMI, Anthony. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent progress in hormone research*, v. 56, p. 1-21, 2000.
25. URIBARRI, Jaime et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 110, n. 6, p. 911-916. e12, 2010.
26. WU, Chi-Hao; YEN, Gow-Chin. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 53, n. 8, p. 3167-3173, 2005.

4.3 ARTIGO:

ONCOCALIXONA A EXERCE EFEITO DE ANTIGLICAÇÃO IN VITRO

ONCOCALYXONE A FUNCTIONS AS AN ANTI-GLYCATION AGENT

IN VITRO

Authors:

Ingrid Sofia Vieira de Melo^{a,b}, Aldenir Feitosa dos Santos^c, Telma Leda Gomes de Lemos^d,
Marília Oliveira Fonseca Goulart^a, Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana^{a*}

^a Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas. Endereço: Cidade universitária, BR 101 (km 14), Tabuleiro dos Martins, CEP 57072-970. Maceió, AL – Brasil.

^b Departamento de agroindústria, Instituto Federal de Alagoas. Endereço: Conjunto Residencial Astolfo Lopes, s/n - Cidade Alta, CEP 57820-000. Murici - AL – Brasil.

^c Departamento de Química, Universidade Estadual de Alagoas. Endereço: Av. Governador Luís Cavalcante, Alto do Cruzeiro, CEP 57312-270. Arapiraca, AL – Brasil.

^d Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará. Endereço: Av. Mister Hull, Campus do Pici, CEP 60451-970. Fortaleza, CE – Brasil.

* Corresponding author:

E-mail: aegs@qui.ufal.br

Telephone: +55 82 3214-1388

+55 82 8850-6526

Keywords: Antiglycation, Oncocalyxone A, Advanced glycation endproducts

The authors declare no conflicts of interests

Abstract

Advanced glycation endproducts (AGE) are the result of post-translational changes to proteins, which ultimately compromise their structure and/or function. The identification of methods to prevent the formation of these compounds holds great promise in the development of alternative therapies for diseases such as diabetes. Plants used in traditional medicine are often rich sources of anti-glycation agents. Therefore, in this study, we investigated the anti-glycation activity of one such compound, Oncocalyxone A (Onco A). Using spectrofluorimetric techniques, we determined that Onco A inhibits AGE formation in a concentration-dependent manner. Its IC_{50} value (105.71 μ M) was almost two times lower than the standard anti-glycation compound aminoguanidine (191.13 μ M). The excellent anti-glycation activity of Onco A makes it an exciting candidate for the treatment of diseases associated with excessive accumulation of AGE. However, additional studies are necessary to identify its mechanism of action, as well as the *in vivo* response in suitable model organisms.

1. Introduction

Glycation is a non-enzymatic protein modification that occurs when proteins react with sugar molecules and/or metabolized intermediates, such as glyoxal or methylglyoxal. These reactions occur both *in vitro* and *in vivo*. The first step of the process, the Maillard reaction, leads to the irreversible formation of advanced glycation end products (AGE), which ultimately interact with proteins resulting in damage and degradation. The accumulation of AGE plays an important role in age-related disorders and heart failure due to diabetic complications (Bodiga, Eda & Bodiga, 2014).

AGE arise as the result of post-translational protein modifications (Brownlee, Cerami, & Vlassara, 1988), and these changes may promote protein-protein interactions through the formation of intra- and intermolecular bonds, ultimately resulting in dysfunctional protein

structure and/or function. In the blood, significant accumulation of AGE alters protein dynamics, and this has been attributed to premature aging and the increasing incidence of chronic diseases (Yamaguchi, Ariga, Yoshimura, & Nakazawa, 2000). Indeed, there is a large body of work indicating that nonenzymatic glycation is involved in other disorders as well, such as arthritis, atherosclerosis, chronic renal failure, Alzheimer's disease, nephropathy, neuropathy, and cataracts (Saraswat, Reddy, Muthenna, & Reddy, 2009). Therefore, controlling the formation of these harmful intermediaries via anti-glycation agents has far-reaching implications in the treatment of various diseases.

There have been several proposed mechanisms of action of these anti-glycation agents, including: (1) the elimination of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), mainly hydroxyl radicals and superoxide radical anions, to decrease oxidative stress and reduce the generation of carbonyl or dicarbonyl groups; (2) the elimination of Amadori products and Schiff bases by preventing the formation of carbonyl and dicarbonyl compounds; (3) the chelation of free metals as the formation of AGE are related to the presence of transition metal ions; (4) the inhibition of the formation of an Amadori product in the final stage of glycation; (5) by breaking protein crosslinks promoted by AGE; (6) the occlusion of cellular AGE receptors (RAGE), which can reduce oxidative stress and inflammation in biological systems, and ultimately, prevent the late stAGE of glycation. Among the mechanisms described above, the first four are documented for naturally occurring anti-glycation products, while the final two are more commonly attributed to therapeutic agents such as aspirin, aminoguanidine, and diethylenetriaminepentaacetic acid. Antioxidant compounds are of particular interest as candidates as anti-glycation agents, given that they inhibit the formation of naturally occurring AGE, providing a strong therapeutic prospect toward delaying and preventing diabetic complications. Still, the mechanisms that account for the inhibitory pathways described above are poorly understood (Wu, Huang, Lin, & Yen, 2011).

ROS and RNS play important roles in the non-enzymatic glycation of proteins (Vasconcelos et al, 2007). In recent years, several natural products have been characterized as having anti-glycation activity, and often this correlates with antioxidant properties (Ramkissoon, Mahomoodally, Ahmed, & Subratty, 2013). There are reports that many food products containing antioxidant compounds are able to eliminate ROS and RNS generated during glycation, as well as prevent the auto-oxidation of reducing sugars and Amadori products, and both are favorable ways for the inhibition of AGE (Elosta, Ghous, & Ahmed, 2012).

The characterization of biological compounds identified in plant extracts is still in its infancy, due in large part to the significant biodiversity that exists, especially among Brazil's flora. The isolation and possible development of an anti-glycation biocompound from these plants would be a highly relevant biotechnological discovery with significant importance for individuals worldwide (Beaulieu et al., 2010).

The *Auxemma oncocalyx* Taub (Boraginaceae) is plant native to Brazil's Northeast region, and it is quite common in the state of Ceará. Popularly known as "pau branco," it is used locally as an astringent and for the treatment of wounds (Ferreira Nunes Leal, Person, Lemos, & Viana, 2003). Chemical studies of *A. oncocalyx* Taub resulted in the isolation and characterization of various quinones. The first compound isolated from the ethanolic extract was oncocalyxone A [rel-8 α -hydroxy-5-hydroxymethyl-2-methoxy-8 α , β -methyl-7, 8, 8a, 9-tetrahydro-1 4-anthracenedione] (Onco A; Figure 1), which is characterized as a red solid, and most abundant quinone in this fraction (Pessoa et al., 1993; Pessoa et al., 1995).

Onco A exhibited various activities *in vivo*, including cytotoxic, analgesic and antioxidant functions, and inhibitory effects on inflammation, edema, platelet aggregation and tumorigenicity (Ferreira et al. 2003; Ferreira Nunes, Fontenele, Pessoa, Lemos, & Viana, 2004; Ferreira et al, 2008; Pessoa et al, 2004). Additionally Onco A is known to inhibit cell growth by damaging DNA (Person et al. 2004, Costa et al., 2012). Strikingly, Sivagnanam, Kalaivanan, and

Rajamanickam (2013) reported that Onco A isolated from leaves of *Prenanthes sarmentosus* exerted anti-diabetic effects in rats with alloxan-induced diabetes. The animals had significantly lower blood glucose levels in the treated rats than the controls and an overall increase in body weight.

With the above in mind, the objective of this study was to characterize the inhibition of AGE formation and potential anti-glycation activity of Onco A *in vitro*.

2. Methods

To measure anti-glycation activity, solutions of bovine serum albumin (BSA 2 mg / mL), glucose (200 mM) and fructose (200 mM) were first prepared in sodium phosphate monobasic monohydrate buffer (100 mM pH 7.4). Incubation media consisted of BSA (1 mg / mL), glucose (100 mM), fructose (100 mM) and either Onco A or aminoguanidine (solvent; 80% EtOH, 20% H₂O) in 100 mM sodium phosphate buffer. Six different concentrations of Onco A (10.35; 41.39; 82.78; 165.56; 331.13; 662.25 μ M) were analyzed to determine IC₅₀. Once the BSA was auto fluorescent, a negative control consisting of glucose (100 mM), fructose (100 mM), BSA (1 mg / mL) and vehicle (100 mM phosphate buffer), and a positive control (Wu & Yen, 2005) containing aminoguanidine (3.52–452.38 μ M), were prepared. The samples were incubated in the dark at 37 °C with constant stirring for 7 days and the formation of AGE was quantified by spectrofluorimetry ($\lambda_{\text{ex}} = 355$ and $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm).

Fluorescence readings and controls were normalized to corresponding blanks to exclude baseline fluorescence. The fluorescence (F) corrected for the negative control ($F_{\text{negative control}}$) and experimental treatments ($F_{\text{experimental corrected}}$) were used to determine the percentage of inhibition of the formation of AGE using the following formula (Beaulieu et al., 2010):

$$\text{Inhibition Percentage} = (F_{\text{negative control}} - F_{\text{experimental corrected}} / F_{\text{negative control}}).$$

The IC_{50} values, defined as the amount of compound (μM) necessary to reduce 50% of AGE formation as compared to the negative control, were determined using regression analysis.

3. Results and Discussion

Figure 2 shows dose response analysis for Onco A. Glycation was efficiently inhibited by Onco A in a concentration-dependent manner. The anti-glycation activity of the compound ($IC_{50} = 105.71 \mu\text{M}$) was almost twice that of the current standard, aminoguanidine ($IC_{50} = 191.13 \mu\text{M}$), reinforcing the excellent activity demonstrated by this quinone.

The anti-glycation activity observed in the present study is in agreement with the findings of Khan, Mughal, Khan, Naz, Perveen, and Choudhary (2010). While testing derivatives of *N*-aroyl-isatin, the group reported that of their 15 compounds tested, 6 displayed anti-glycation activity with IC_{50} values ranging from 18.01 to 171.3 μM . These values are notably lower than aminoguanidine (268.7 μM). Additionally, Khan et al. (2009) analyzed 27 bis-Schiff bases derived from isatins and found three with excellent anti-glycation activity. These compounds had IC_{50} values in the range of 243.95–291.14 μM , which exceeded the standard used in their study, rutin (294.46 μM). In fact, these values were over two times higher than those obtained for Onco A, reinforcing again the significance of the anti-glycation activity reported here.

Additionally, Onco A was found to be twice as effective as ethyl heamatommate, the most active compound ($IC_{50} = 220.55 \mu\text{M}$) isolated from *Parmotrema cooperi* by Choudhary et al. (2011), and three times as effective as the standard compound, rutin ($IC_{50} = 294.5 \mu\text{M}$), used in their study. The authors reported that the presence of carbonyl and hydroxyl groups might be responsible for the anti-glycation activity of this series of compounds. Magadula, Mbwambo, Gatto Derbré, Guilet, and Richomme (2014) found that morelloflavona, an isolated biflavonoid from *Garcinia volkensii*, was a very effective inhibitor of AGE formation with an IC_{50} a little lower than that of Onco A (78 μM).

Muhammad, Saeed, Adhikari, Khan, and Khan (2013) discovered that a derivative of cinnamic acid, the 2,4-dihydroxy-5-methoxy-cinaminic acid, isolated from the plant *Viola betonicifolia* moderately inhibited the formation of AGE, with IC₅₀ value of 355 μM. Note this is three times greater than the IC₅₀ of Onco A (105.71 μM). Park, Kim, & Kwon (2010) have reported that three compounds isolated from *Lespedeza maximowiczii* are actually more active than Onco A, with IC₅₀ values ranging from 5.4–20.6 μM.

Regarding the molecular mechanism of Onco A, it is possible that its anti-glycation effects are via ROS inhibition, as this compound has been identified in previous antioxidant studies from Ferreira et al. (2003). The authors demonstrated that the quinone fraction of *A. oncocalyx*, consisting mainly of Onco A, has hepatoprotective effects in the CCl₄-induced hepatotoxicity rat model, where both free radicals and lipid peroxidation are involved. They clarified that these hepatoprotective effects were mediated by the fraction's antioxidant function, which was verified by surveying the plasma activity of alanine-amino transferase (ALT) and aspartate-amino transferase (AST). However, this may not be the sole anti-glycation mechanism presented by Onco A.

Importantly, Ferreira et al. (2008) identified the anti-platelet aggregation activity of Onco A, which is associated with increased levels of cGMP-independent nitric oxide (NO) and blockade of the glycoprotein GP Iba. Accumulation of AGE in tissues, and the corresponding dysfunction in platelet aggregation, may promote diabetic complications such as retinopathy, neuropathy, and renal dysfunction (Ono, Aoki, Ohnishi, Yasuda, Kawano, & Tsukada, 1998). Yamagishi, Fujimori, Yonekura, Yamamoto and Yamamoto (1998) examined the effects of AGE on the production of prostacyclin (PGI₂), an antithrombogenic prostanoid, and the inhibitor of endothelial plasminogen activator 1 (PAI-1). They found that increased accumulation of AGE promotes platelet aggregation and PAI-1 expression, while also inhibiting prostacyclin expression, in endothelial cells. This suggests that AGE have the ability to trigger platelet

aggregation and fibrin stabilization, resulting in a predisposition to thrombogenesis, and ultimately, the development of diabetic vascular complications (Yamagishi et al., 1998). It appears likely that the inhibitory effects of Onco A on platelet aggregation are related to its anti-glycation activity, as there is an intimate association with excessive formation of AGE and the stimulation of platelet aggregates.

Thus, it is possible that the three major functions attributed to Onco A, antioxidant, anti-diabetic, anti-platelet aggregation are associated to the anti-glycation properties of the compound.

4. Conclusion

Onco A demonstrated potent inhibitory effects on glucose/fructose induced protein glycation, and this superior activity suggests it may potentially serve as a viable treatment targeted at preventing diabetic complications, as well as slowing the onset and progression of other AGE-related diseases. However, these findings should be taken with some caution, given the moderate cytotoxicity of the compound.

Still, it seems reasonable to propose that the dramatic effects Onco A has on reactive oxygen and platelet aggregation are associated with the anti-glycation activity demonstrated in this study, although the signaling mechanisms remain poorly understood. For these reasons, future studies in model organisms are both appropriate and necessary to further understanding of the benefits of Onco A.

5. References

1. Beaulieu, L. P., Harris, C. S., Saleem, A., Cuerrier, A., Haddad, P. S., Martineau, L. C., ... & Arnason, J. T. (2010). Inhibitory effect of the Cree traditional medicine wiishichimanaan

- (*Vaccinium vitis-idaea*) on advanced glycation endproduct formation: identification of active principles. *Phytotherapy Research*, 24(5), 741-747.
2. Bodiga, V. L., Eda, S. R., & Bodiga, S. (2014). Advanced glycation end products: role in pathology of diabetic cardiomyopathy. *Heart failure reviews*, 19(1), 49-63.
 3. Brownlee, M., Cerami, A., & Vlassara, H. (1988). Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *The New England journal of medicine*, 318(20), 1315-1321.
 4. Choudhary, M. I., Ali, M., Wahab, A. T., Khan, A., Rasheed, S., Shyaula, S. L., & Rahman, A. U. (2011). New antiglycation and enzyme inhibitors from *Parmotrema cooperi*. *Science China Chemistry*, 54(12), 1926-1931.
 5. Costa, C. D. O., Costa, E. D. O., Ferreira, F. D. R., Viana, L. D. S., Silva, L. V. D., Silva, F. D. A., ... & Goulart, M. O. (2012). Oncocalyxone A: electrochemical, spectroscopic investigation and studies of its interaction with DNA, nucleobases and N-acetylcysteine. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(6), 1174-1185.
 6. Elosta, A., Ghous, T., & Ahmed, N. (2012). Natural products as anti-glycation agents: possible therapeutic potential for diabetic complications. *Current diabetes reviews*, 8(2), 92-108.
 7. Ferreira, M. A. D., Do Nascimento, N. R. F., De Sousa, C. M., Pessoa, O. D. L., De Lemos, T. L. G., Ventura, J. S., ... & Chudzinski-Tavassi, A. M. (2008). Oncocalyxone A inhibits human platelet aggregation by increasing cGMP and by binding to GP Iba glycoprotein. *British journal of pharmacology*, 154(6), 1216-1224.
 8. Ferreira, M. A. D., Nunes, O. D. R. H., Leal, L. K. A. M., Pessoa, O. D. L., Lemos, T. L. G. D., & Viana, G. S. D. B. (2003). Antioxidant effects in the quinone fraction from *Auxemma oncocalyx* TAUB. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(5), 595-599.

9. Ferreira, M. A. D., Nunes, O. D., Fontenele, J. B., Pessoa, O. D., Lemos, T. L., & Viana, G. S. (2004). Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. *Phytomedicine*, *11*(4), 315-322.
10. Hou, T. H., Chung, J. P., Chen, S. S., & Chang, T. L. (2013). Antioxidation and antiglycation of 95% ethanolic extracts prepared from the leaves of black nightshade (*Solanum nigrum*). *Food Science and Biotechnology*, *22*(3), 839-844.
11. Joshi, B. D., Srivastava, A., Honorato, S. B., Tandon, P., Pessoa, O. D. L., Fachine, P. B. A., & Ayala, A. P. (2013). Study of molecular structure, vibrational, electronic and NMR spectra of oncocalyxone A using DFT and quantum chemical calculations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *113*, 367-377.
12. Khan, K. M., Khan, M., Ali, M., Taha, M., Rasheed, S., Perveen, S., & Choudhary, M. I. (2009). Synthesis of bis-Schiff bases of isatins and their antiglycation activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *17*(22), 7795-7801.
13. Khan, K. M., Mughal, U. R., Khan, A., Naz, F., Perveen, S., & Choudhary, M. I. (2010). N-Aroylated isatins: Antiglycation activity. *Letters in Drug Design & Discovery*, *7*(3), 188-193
14. Magadula, J. J., Mbwambo, Z. H., Gatto, J., Derbré, S., Guilet, D., & Richomme, P. (2014). Polyphenolic Compounds with Anti-Ages Activity from Three Clusiaceae Plants. *European Journal of Medicinal Plants*, *4*(11), 1336-1344.
15. Muhammad, N., Saeed, M., Adhikari, A., Khan, K. M., & Khan, H. (2013). Isolation of a new bioactive cinnamic acid derivative from the whole plant of *Viola betonicifolia*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, *28*(5), 997-1001.
16. Ono, Y., Aoki, S., Ohnishi, K., Yasuda, T., Kawano, K., & Tsukada, Y. (1998). Increased serum levels of advanced glycation end-products and diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice*, *41*(2), 131-137.

17. Park, H. Y., Kim, G. B., & Kwon, Y. S. (2010). Two new dihydrofuranoisoflavanones from the leaves of *Lespedeza maximowiczii* and their inhibitory effect on the formation of advanced glycation end products. *Archives of pharmacal research*, 33(8), 1159-1163.
18. Pessoa, C., Lemos, T. L., Pessoa, O. D., Moraes, M. O., Vasconcellos, D., Costa-Lotuf, L. V., & Leyva, A. (2004). Cytotoxicity of derivatives of oncocalyxone A from *Auxemma oncocalyx* Taub. *Arkivoc*, 6, 89-94.
19. Pessoa, O. D., De Lemos, T. L., De Carvalho, M. G., & Braz-Filho, R. (1995). Cordiachromes from *Auxemma oncocalyx*. *Phytochemistry*, 40(6), 1777-1786.
20. Pessoa, O. D., Lemos, T. L., Silveira, E. R., & Raimundo, B. F. (1993). Novel cordiachromes isolated from *Auxemma oncocalyx*. *Natural Product Letters*, 2(2), 145-150.
21. Ramkissoon, J. S., Mahomoodally, M. F., Ahmed, N., & Subratty, A. H. (2013). Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 6(7), 561-569.
22. Saraswat, M., Reddy, P. Y., Muthenna, P., & Reddy, G. B. (2009). Prevention of non-enzymic glycation of proteins by dietary agents: prospects for alleviating diabetic complications. *British journal of nutrition*, 101(11), 1714-1721.
23. Sivagnanam, I., Kalaivanan, P., & Rajamanickam, M. (2013). Anti-diabetic activity of oncocalyxone a isolated from *prenanthes sarmentosus*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 630-633.
24. Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. D. F., Manfredini, V., Benfato, M. D. S., & Kubota, L. T. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Química Nova*, 30(5), 1323-1338.

25. Wu, C. H., & Yen, G. C. (2005). Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(8), 3167-3173.
26. Wu, C. H., Huang, S. M., Lin, J. A., & Yen, G. C. (2011). Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food & function*, 2(5), 224-234.
27. Yamagishi, S., Fujimori, H., Yonekura, H., Yamamoto, Y., & Yamamoto, H. (1998). Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia*, 41(12), 1435-1441.
28. Yamaguchi, F., Ariga, T., Yoshimura, Y., & Nakazawa, H. (2000). Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 180-185.

Figure 1. Chemical structure of Oncocalyxone A

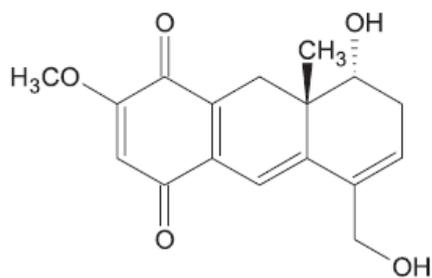


Figura 2. Dose-dependent inhibition of the fluorescent AGE formation by the Onco A, via spectrofluorimetric method. r^2 0.98

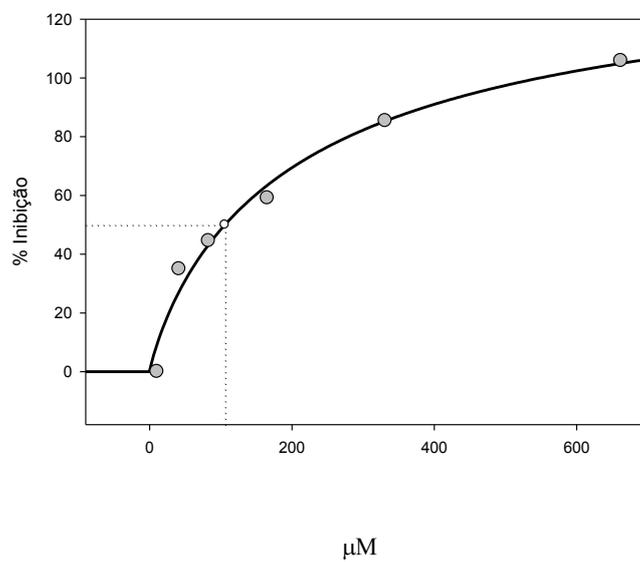


Table 1: Anti-glycation activity of pure compounds

References	Compounds	μM	Used method*
	Aminoguanidine	191.13	BSA/Glucose/ Fructose
	Oncocalyxone A	105.71	
<i>Khan et al., 2010</i>	Aminoguanidine	268.7	BSA/Glucose
	1-Benzoyl-1H-indol-2,3 dione	18.01	
	1-(3-Methylbenzoyl)-1H-indol-2,3 dione	170.2	
	1-(4-Nitrobenzoyl)-1H-indol-2,3 dione	80.18	
	1-(4-Nitrobenzoyl)-1H-indol-2,3 dione	117.91	
	1-(3-Chlorobenzoyl)-1H-indol-2,3 dione	72.5	
	1-(4-Chlorobenzoyl)-1H-indol-2,3 dione	171.3	
	1-(2-Fluorobenzoyl)-1H-indol-2,3 dione		
<i>Khan et al., 2009</i>	Rutin	294.46	BSA/MGO**
	3,4-Dihydroxybenzaldehyde-N-(2-oxo-1,2-dihydro-3H-indol-3-ylidene) hidrazone	291.14	
	4-Nitrobenzaldehyde-N-(2-oxo-1,2-dihydro-3H-indol-3-ylidene) hidrazone	257.61	
	4-Nitrobenzaldehyde-N-(2-oxo-1,2-dihydro-3H-indol-3-ylidene) hidrazone	243.95	
	2-Nitrobenzaldehyde-N-(2-oxo-1,2-dihydro-3H-indol-3-ylidene) hidrazone		
<i>Choudhary et al. (2011)</i>	Rutin	294.5	BSA/MGO**
	<i>Ethyl Heamatomate</i>	220.55	
<i>Magadula et al., 2014</i>	<i>Morelloflavona</i>	78.0	BSA/D-ribose
<i>Park et al., 2010</i>	Aminoguanidine	479	BSA / Glucose
	2',4',5-trihydroxy-[5''-(1,2-dihydroxy-1-methylethyl)-Diidrofuran (2'',3'':7,8)]-(3S)-isoflavanone	20.6	
		18.4	

	2',4',5-trihydroxy-[5''-(1,2-dihydroxy-1-methylethyl)- dihydrofuran(2'',3'':7,8)]-(3 <i>R</i>)-isoflavanone	5.4	
	Catechin		
<i>Muhammad et al., 2013</i>	Rutin	294	BSA/Glucose/MGO
	<i>2,4-dihydroxy-5-methoxy-cinnamic acid</i>	355	

* Base components used to promote glycation. ** MGO Methylglyoxal

A relação entre ensaios de atividades antioxidantes e antiglicante parece ser um importante caminho, embora inicial, para a obtenção de bioprodutos ou fármacos que possam atenuar as complicações geradas por doenças associadas ao acúmulo de AGE.

Todos os extratos testados para atividade antiglicante foram previamente analisados também para atividades antioxidantes, por diferentes métodos. Visando estudar a possível correlação existente entre as atividades antiglicante e antioxidantes, observou-se que dos 49 extratos testados 19 foram, por um ou mais ensaios, eficiente em inibir a oxidação. Esta triagem possibilitou correlacionar as atividades antiglicante e antioxidante, que demonstrou serem os métodos ABTS e DPPH melhores preditores da atividade antiglicante, ou seja para estimar a atividade antioxidante parecem ser esses ensaios antioxidantes os que indicarão com mais precisão se as amostras irão promover a inibição da glicação, no referido meio de incubação.

A atividade antiglicante de extratos de plantas nativas da flora brasileira foi verificada em 15 das 18 amostras testadas, sendo que cinco extratos apresentaram resultados iguais ao da aminoguanidina. Esta informação confirma a importância destes extratos (*Cupania oblongifolia* Mart. (Casca); *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Folha); *Auxemma oncocalyx* Taub. (Casca do caule); *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Folha); *Mimosa tenuiflora* Wild. (Folha)) como promissores agentes atenuantes da glicação.

Adicionalmente, ao verificar que a *Auxemma oncocalyx* (entrecasca) foi um extrato eficiente em inibir a glicação tanto quanto a aminoguanidina, o estudo de uma quinona isolada deste mesmo extrato foi também testado para atividade antiglicante. Esta quinona, Oncocalixona A, demonstrou potente efeito inibidor da glicação sugerindo ser este um agente potencial para atenuação de doenças associadas ao acúmulo de AGE.

Acredita-se que amostra de *Cupania oblongifolia* Mart. (Casca), uma vez que foi eficiente em inibir a glicação, oferece perspectivas promissoras para o desenvolvimento de um

bioproduto, por isso análises de isolamento e caracterização de compostos ativos para atividade antiglicante seguem sendo estudadas.

Assim, a continuação dessa pesquisa é necessário para que se possa comprovar todas estas respostas, por sua vez *in vivo*.

O estudo dos mecanismos que envolvem os AGE tem atraído interesse de importantes centros de pesquisa em todo o mundo, uma vez que é possível contribuir para a melhora no diagnóstico e tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas. Nesse contexto, o Brasil apresenta-se como potencial desenvolvedor de pesquisas que contribuiriam com os avanços científicos na área, especialmente no que diz respeito aos agentes inibidores deste tipo de glicação.

A investigação de agentes com capacidade de inibir a formação de AGE é uma importante estratégia para o desenvolvimento de bioprodutos e/ou drogas, capazes de atenuar os efeitos de doenças associadas ao acúmulo desses produtos. A inibição dessa reação, especialmente exercida por produtos naturais, é um caminho que pode ajudar milhares de pessoas que sofrem com diversas desordens metabólicas.

Um método eficaz e pouco custoso foi utilizado para verificar a atividade inibitória exercida por plantas sobre a formação de AGE, habitualmente usadas na medicina popular, o que nos permitiu traçar um panorama, bastante promissor, desta área da pesquisa. Até então, esta é a primeira investigação das propriedades de anti-glicação dos extratos estudados e estes resultados podem ajudar a desenvolver pesquisas que busquem reconhecer os efeitos destas amostras vegetais sobre a saúde humana.

Os principais achados do presente estudo, extratos com importante atividade antiglicante, sinalizam um trajeto promissor para o desenvolvimento de agentes com potencial para inibir a glicação, principalmente aqueles que combinam atividade antiglicante e antioxidante. Assim, esse estudo deve ser considerado como mais um indicador de extratos de plantas nativas da flora brasileira, que combinam as atividades citadas, *in vitro*. No entanto, ainda são necessárias novas investigações científicas com o uso dos mesmos em diferentes contextos, como por exemplo, em animais e em ensaios clínicos.

Trabalhos futuros do nosso grupo incluirão a avaliação *in vivo* dos efeitos benéficos de alguns dos extratos testados e de componentes fitoquímicos dos mesmos e com reconhecida atividade antiglicante. Em um modelo animal, a diabetes será induzida, procedendo-se testes com a planta e seus compostos isolados, para que o uso destes como agentes inibidores da glicação, agora *in vivo*, possa ser comprovado e assim, incentivar estudos com humanos. Estudos desta natureza serão importantes para ajudar na atenuação de doenças em que há o excesso de formação de AGE, como por exemplo, no diabetes tipo 2.

Adicionalmente é intenção do grupo, desenvolver um bioproduto a base dos compostos isolados do extrato de planta mais promissor e passível de consecução dos estudos, neste caso a *Cupania oblongifolia*.

REFERÊNCIAS

1. AHMAD, Muhammad Saeed; PISCHETSRIEDER, Monika; AHMED, Nessar. Aged garlic extract and *S-allyl* cysteine prevent formation of advanced glycation endproducts. *European journal of pharmacology*, v. 561, n. 1, p. 32-38, 2007.
2. AHMAD, Muhammed Saeed; AHMED, Nessar. Antiglycation properties of aged garlic extract: possible role in prevention of diabetic complications. *The Journal of nutrition*, v. 136, n. 3, p. 796S-799S, 2006.
3. AHMED, M. U.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 261, n. 11, p. 4889-4894, 1986.
4. AHMED, Mahtab U. et al. Ne-(Carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J*, v. 324, p. 565-570, 1997.
5. AHMED, Nessar. Advanced glycation endproducts: role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice*, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.
6. AL-ABED, Yousef; BUCALA, Richard. Structure of a synthetic glucose derived advanced glycation end product that is immunologically cross-reactive with its naturally occurring counterparts. *Bioconjugate chemistry*, v. 11, n. 1, p. 39-45, 2000.
7. ARDESTANI, Amin; YAZDANPARAST, Razieh. *Cyperus rotundus* suppresses AGE formation and protein oxidation in a model of fructose-mediated protein glycooxidation. *International journal of biological macromolecules*, v. 41, n. 5, p. 572-578, 2007.
8. AYALA, Antonio; CUTLER, Richard G. Comparison of 5-hydroxy-2-amino valeric acid with carbonyl group content as a marker of oxidized protein in

- human and mouse liver tissues. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 21, n. 4, p. 551-558, 1996.
9. BABAIEI-JADIDI, Roya et al. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes*, v. 52, n. 8, p. 2110-2120, 2003.
 10. BABU, Pon Velayutham Anandh; SABITHA, Kuruvimalai Ekambaram; SHYAMALADEVI, Chennam Srinivasulu. Effect of green tea extract on advanced glycation and cross-linking of tail tendon collagen in streptozotocin induced diabetic rats. *Food and chemical toxicology*, v. 46, n. 1, p. 280-285, 2008.
 11. BACH, Leon A. et al. Effects of Advanced Glycation End Products on Ezrin-Dependent Functions in LLC-PK1 Proximal Tubule Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1043, n. 1, p. 609-616, 2005.
 12. BASTA, Giuseppina. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*, v. 196, n. 1, p. 9-21, 2008.
 13. BAYNES, John W.; THORPE, Suzanne R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, v. 48, n. 1, p. 1-9, 1999.
 14. BEAULIEU, Louis-Philippe et al. Inhibitory effect of the cree traditional medicine wiishichimanaan (Vaccinium vitis-idaea) on advanced glycation endproduct formation: identification of active principles. *Phytotherapy Research*, v. 24, n. 5, p. 741-747, 2010.
 15. BIERHAUS, Angelika et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine*, v. 83, n. 11, p. 876-886, 2005.

16. BONNEFONT-ROUSSELOT, Dominique. Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, v. 5, n. 5, p. 561-568, 2002.
17. BOUSOVÁ, I. et al. Evaluation of *in vitro* effects of natural substances of plant origin using a model of protein glycooxidation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 37, n. 5, p. 957-962, 2005.
18. BROWNLEE, Michael. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, v. 414, n. 6865, p. 813-820, 2001.
19. CERAMI, Carla et al. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 25, p. 13915-13920, 1997.
20. CHAIYASUT, Chaiyavat; CHANSAKAOW, Sunee. Inhibitory effects of some thai plant extracts on AAPH-induced protein oxidation and protein glycation, *Naresuan University Journal*, v. 15, n. 1, p. 35-41, 2013.
21. CHELLAN, Paulraj; NAGARAJ, Ramanakoppa H. Protein crosslinking by the Maillard reaction: dicarbonyl-derived imidazolium crosslinks in aging and diabetes. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 368, n. 1, p. 98-104, 1999.
22. DURAISAMY, Yasotha et al. Aminosalicyclic acid reduces the antiproliferative effect of hyperglycaemia, advanced glycation endproducts and glycated basic fibroblast growth factor in cultured bovine aortic endothelial cells: comparison with aminoguanidine. In: *Vascular Biochemistry*. Springer US, 2003. p. 143-153.
23. DYER, D. G. et al. The Maillard reaction *in vivo*. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, v. 30, n. 1, p. 29-45, 1991.

24. ELOSTA, Abdulhakim; GHOUS, Tahseen; AHMED, Nessar. Natural products as anti-glycation agents: possible therapeutic potential for diabetic complications. *Current diabetes reviews*, v. 8, n. 2, p. 92-108, 2012.
25. FU, Min-Xin et al. Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose: kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes*, v. 43, n. 5, p. 676-683, 1994.
26. GOLDBERG, Teresia et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 104, n. 8, p. 1287-1291, 2004.
27. HAITOGLU, C. S. et al. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glucosylated laminin/type IV collagen. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 18, p. 12404-12407, 1992.
28. HAMADA, Yoji et al. Effects of glycemic control on plasma 3-deoxyglucosone levels in NIDDM patients. *Diabetes Care*, v. 20, n. 9, p. 1466-1469, 1997.
29. HAMMES, H.-P. et al. Aminoguanidine inhibits the development of accelerated diabetic retinopathy in the spontaneous hypertensive rat. *Diabetologia*, v. 37, n. 1, p. 32-35, 1994.
30. HAMMES, Hans.-Peter. et al. Secondary intervention with aminoguanidine retards the progression of diabetic retinopathy in the rat model. *Diabetologia*, v. 38, n. 6, p. 656-660, 1995.
31. HAMMES, Hans-Peter et al. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 88, n. 24, p. 11555-11558, 1991.

32. HAYASE, Fumitaka et al. Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during maillard reaction *in vivo*. Journal of Biological Chemistry, v. 264, n. 7, p. 3758-3764, 1989.
33. HOBART, Laura J. et al. Anti-crosslinking properties of carnosine: significance of histidine. Life sciences, v. 75, n. 11, p. 1379-1389, 2004.
34. HOFMANN, Susanna M. et al. Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. Diabetes, v. 51, n. 7, p. 2082-2089, 2002.
35. HORIE, Katsunori et al. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Journal of Clinical Investigation, v. 100, n. 12, p. 2995, 1997.
36. HSIEH, Chiu-Lan et al. Inhibitory effect of some selected nutraceutic herbs on LDL glycation induced by glucose and glyoxal. Journal of ethnopharmacology, v. 102, n. 3, p. 357-363, 2005.
37. HUIJBERTS, Maya S.P et al. Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. Journal of Clinical investigation, v. 92, n. 3, p. 1407, 1993.
38. HUNT, James V.; BOTTOMS, Mark A.; MITCHINSON, Malcolm J. Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. Some fundamental differences in proposed mechanisms of glucose oxidation and oxidant production. Biochem. J, v. 291, p. 529-535, 1993.

39. JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiological research*, v. 53, n. 2, p. 131-142, 2004.
40. JEDSADAYANMATA, Arom. *In vitro* antiglycation activity of arbutin. *Naresuan University Journal*, v. 13, n. 2, p. 35-41, 2013.
41. KIHU, Tadashi et al. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 68, n. 1, p. 200-205, 2004.
42. KIM, Hye Young; KIM, Kyong. Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts *in vitro*. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 51, n. 6, p. 1586-1591, 2003.
43. LANDER, Harry M. et al. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21 ras-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 28, p. 17810-17814, 1997.
44. LI, Yong Ming et al. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 20, p. 11047-11052, 1996.
45. LIN, Reigh-Yi et al. Lowering of dietary advanced glycation endproducts (AGE) reduces neointimal formation after arterial injury in genetically hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis*, v. 163, n. 2, p. 303-311, 2002.
46. LUNCEFORD, Nicole; GUGLIUCCI, Alejandro. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia*, v. 76, n. 5, p. 419-427, 2005.

47. MA, Wanchao et al. RAGE ligand upregulation of VEGF secretion in ARPE-19 cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, v. 48, n. 3, p. 1355-1361, 2007.
48. MCCARTY, Mark F. The low-AGE content of low-fat vegan diets could benefit diabetics—though concurrent taurine supplementation may be needed to minimize endogenous AGE production. *Medical hypotheses*, v. 64, n. 2, p. 394-398, 2005.
49. MEERWALDT, Robbert et al. The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovasc Diabetol*, v. 7, n. 1, p. 29, 2008.
50. MONNIER, Vincent M. Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 419, n. 1, p. 1-15, 2003.
51. MONNIER, Vincent M.; KOHN, Robert R.; CERAMI, Anthony. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 81, n. 2, p. 583-587, 1984.
52. MUSTATA, Georgian T. et al. Paradoxical effects of green tea (*Camellia sinensis*) and antioxidant vitamins in diabetic rats improved retinopathy and renal mitochondrial defects but deterioration of collagen matrix glycooxidation and cross-linking. *Diabetes*, v. 54, n. 2, p. 517-526, 2005.
53. NAKAGAWA, Takako et al. Protective activity of green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 50, n. 8, p. 2418-2422, 2002.
54. NAKAMURA, Ko; NAKAZAWA, Yoshitaka; IENAGA, Kazuharu. Acid-stable fluorescent advanced glycation end products: vesperlysines A, B, and C are formed as crosslinked products in the Maillard reaction between lysine or

- proteins with glucose. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 232, n. 1, p. 227-230, 1997.
55. NAKAMURA, Sakurako et al. Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetes*, v. 46, n. 5, p. 895-899, 1997.
56. NICHOLL, Iain D. et al. Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. *Molecular medicine*, v. 4, n. 9, p. 594, 1998.
57. NIWA, T. et al. Serum levels of 3-deoxyglucosone and tissue contents of advanced glycation end products are increased in streptozotocin-induced diabetic rats with nephropathy. *Nephron*, v. 74, n. 3, p. 580-585, 1996.
58. NIWA, Toshimitsu et al. Elevated serum levels of 3-deoxyglucosone, a potent protein-cross-linking intermediate of the Maillard reaction, in uremic patients. *Nephron*, v. 69, n. 4, p. 438-443, 1995.
59. NIWA, Toshimitsu et al. Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. *Journal of Clinical Investigation*, v. 99, n. 6, p. 1272, 1997.
60. OBAYASHI, Hiroshi et al. Formation of Crossline as a Fluorescent Advanced Glycation End Product *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 226, n. 1, p. 37-41, 1996.
61. OHGAMI, Nobutaka et al. CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *Journal of Diabetes and its Complications*, v. 16, n. 1, p. 56-59, 2002.

62. PAUL, R. Gordon et al. Isolation and characterization of advanced glycation end products derived from the *in vitro* reaction of ribose and collagen. *Biochem. J.*, v. 330, p. 1241-1248, 1998.
63. PENG, Xiaofang et al. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chemistry*, v. 106, n. 2, p. 475-481, 2008.
64. PEPPA, Melpomeni et al. Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice. *Diabetes*, v. 52, n. 11, p. 2805-2813, 2003.
65. RAMASAMY, Ravichandran et al. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*, v. 15, n. 7, p. 16R-28R, 2005.
66. REDDY, V. Prakash; BEYAZ, Ayse. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 13, p. 646-654, 2006
67. ROUT, S.; BANERJEE, R. Free radical scavenging, anti-glycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from *Punica granatum*. *Bioresource technology*, v. 98, n. 16, p. 3159-3163, 2007.
68. RUDNICKI, Martina et al. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry*, v. 100, n. 2, p. 719-724, 2007.
69. SAJITHLAL, G. B.; CHITHRA, Pandarinathan; CHANDRAKASAN, Gowri. Effect of curcumin on the advanced glycation and cross-linking of collagen in diabetic rats. *Biochemical pharmacology*, v. 56, n. 12, p. 1607-1614, 1998.

70. SAKAMOTO, Kenya; BROWNLEE, Michael. Biochemistry and Molecular Biology of Diabetic Complications. In: Type 1 Diabetes. Humana Press, 2003. p. 375-392.
71. SCHMIDT, Ann Marie et al. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. The Journal of clinical investigation, v. 108, n. 7, p. 949-955, 2001.
72. SHINOHARA, Moritsugu et al. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. Journal of Clinical Investigation, v. 101, n. 5, p. 1142, 1998.
73. SHIPANOVA, Irina N.; GLOMB, Marcus A.; NAGARAJ, Ramanakoppa H. Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. Archives of biochemistry and biophysics, v. 344, n. 1, p. 29-36, 1997.
74. SOULIS-LIPAROTA, Tina et al. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. Diabetes, v. 40, n. 10, p. 1328-1334, 1991.
75. STERN, David M. et al. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. Ageing research reviews, v. 1, n. 1, p. 1-15, 2002.
76. STITT, Alan W. et al. Advanced glycation end products (AGE) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. The American journal of pathology, v. 150, n. 2, p. 523, 1997.

77. STITT, Alan W.; BUCALA, Richard; VLASSARA, Helen. Atherogenesis and Advanced Glycation: Promotion, Progression, and Prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 811, n. 1, p. 115-129, 1997.
78. SUZUKI, Keiichiro et al. Overexpression of aldehyde reductase protects PC12 cells from the cytotoxicity of methylglyoxal or 3-deoxyglucosone. *Journal of biochemistry*, v. 123, n. 2, p. 353-357, 1998.
79. SWAMY, M. S.; ABRAHAM, E. C. Inhibition of lens crystallin glycation and high molecular weight aggregate formation by aspirin *in vitro* and *in vivo*. *Investigative ophthalmology & visual science*, v. 30, n. 6, p. 1120-1126, 1989.
80. TANAKA, Shizuko et al. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *Journal of molecular biology*, v. 203, n. 2, p. 495-505, 1988.
81. TARSIO, Joseph F. et al. Nonenzymatic glycation of fibronectin and alterations in the molecular association of cell matrix and basement membrane components in diabetes mellitus. *Diabetes*, v. 34, n. 5, p. 477-484, 1985.
82. THORNALLEY, Paul J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochemical Journal*, v. 269, n. 1, p. 1, 1990.
83. THORNALLEY, Paul J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 419, n. 1, p. 31-40, 2003.
84. TSILIBARY, Effie C. et al. The effect of nonenzymatic glucosylation on the binding of the main noncollagenous NC1 domain to type IV collagen. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 9, p. 4302-4308, 1988.

85. ULRICH, Peter; CERAMI, Anthony. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent progress in hormone research*, v. 56, p. 1-21, 2001.
86. ULRICH, Peter; ZHANG, X. Pharmacological reversal of advanced glycation end-product-mediated protein crosslinking. *Diabetologia*, v. 40, p. S157-S159, 1997.
87. URIBARRI, Jaime et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 110, n. 6, p. 911-916. e12, 2010.
88. VASAN, Sara; FOILES, Peter; FOUNDS, Hank. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product–protein crosslinks. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 419, n. 1, p. 89-96, 2003.
89. VITEK, Michael P. et al. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, n. 11, p. 4766-4770, 1994.
90. VLASSARA, Helen; PALACE, M. R. Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of internal medicine*, v. 251, n. 2, p. 87-101, 2002.
91. WAUTIER, Marie-Paule et al. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, v. 280, n. 5, p. E685-E694, 2001.
92. WELLS-KNECHT, Kevin J. et al. Identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*, v. 34, n. 11, p. 3702-3709, 1995.
93. WOLFF, Simon P.; DEAN, R. T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. *Biochem. j*, v. 245, p. 243-250, 1987.

94. WU, Chi-Hao et al. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food & function*, v. 2, n. 5, p. 224-234, 2011.
95. YAMADA, Hiroyuki et al. Increase in 3-deoxyglucosone levels in diabetic rat plasma. Specific *in vivo* determination of intermediate in advanced Maillard reaction. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 32, p. 20275-20280, 1994.
96. YAMAGISHI, Sho-ichi et al. Positive association of circulating levels of advanced glycation end products (AGE) with pigment epithelium-derived factor (PEDF) in a general population. *Pharmacological Research*, v. 61, n. 2, p. 103-107, 2010.
97. YAMAGUCHI, Fumio et al. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 2, p. 180-185, 2000.
98. YAN, Shi Du et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 13, p. 9889-9897, 1994.
99. YOKOZAWA, Takako; NAKAGAWA, Takako. Inhibitory effects of Luobuma tea and its components against glucose-mediated protein damage. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, n. 6, p. 975-981, 2004.