UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

**Avaliação da atividade anti-glicação de proteína por
4-nerolidilcatecol isolado de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.**

MARY SANAE NAKAMURA

Dissertação para obtenção do grau
de MESTRE

Orientador:
Profa Tit. Silvia Berlanga de Moraes
Barros.

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013328

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Nakamura, Mary Sanae
N163a Avaliação da atividade anti-glicação de proteína por 4- nerolidilcatecol
isolado de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. / Mary Sanae
Nakamura. -- São Paulo, 2007.
37p. 49

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Barros, Silvia Berlanga de Moares

1. Farmacognosia 2. Cosmetologia 2. Patologia 3. Farmacologia
I. T. II. Barros, Silvia Berlanga de Moares, orientador.

615.321 CDD

Mary Sanae Nakamura

Avaliação da atividade anti-glicação de proteína por 4-nerolidilcatecol
isolado de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 07 nov. de 2007.

Agradecimentos

A profa. Silvia Berlanga Moraes Barros, por oferecer a oportunidade, os ensinamentos e grande paciência nesta jornada;

A Natura pelo incentivo no meu desenvolvimento e suporte para a execução do trabalho;

Aos colegas de laboratório, Cris, Vanessa, Tânia, Carla, Rebeca, Diogo, Laura, Renato e Elaine, pelos ótimos momentos de convívio e pelo auxílio que me deram sempre que necessitei;

Ao colega do Instituto de Química, prof. Paolo Di Mascio, aos colegas da Natura, em especial, Jean-Luc Gesztesi e Sandra Medina, pelo auxílio na condução do trabalho e contribuição técnica.

Resumo

NAKAMURA MS. Avaliação da atividade anti-glicação de proteína por 4-nerolidilcatecol isolado de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2007.

A glicação é uma reação não enzimática que ocorre entre proteínas e açúcares redutores e, é responsável pela formação de adutos e de ligações cruzadas entre proteínas, como por exemplo: a pentosidina, produto final de glicação avançada que se acumula em vários tecidos ao longo do tempo. A glicação é deletéria para o organismo e está associada a modificações estruturais em proteínas e alterações de suas funções específicas, tais como: atividade enzimática, capacidade de ligação e tempo de vida de proteínas, além de ser responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). O mecanismo de formação da pentosidina envolve reações oxidativas e, uma das estratégias para minimizá-la é o aumento da atividade antioxidante nos tecidos. A pariparoba (*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq) demonstrou atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* quando aplicada sobre a pele. Essa atividade foi atribuída ao 4-nerolidilcatecol (4-NC), que se mostrou 10 vezes mais potente que o α -tocoferol. Os extratos de pariparoba também inibiram a lipoperoxidação espontânea da pele em camundongos sem pêlo.

Neste trabalho empregou-se o modelo de glicação de albumina de soro bovino (BSA) frente à D-ribose, com avaliação da fluorescência produzida pela pentosidina formada na reação. Avaliou-se igualmente a atividade do 4-NC em diferentes concentrações sobre a reação de glicação da BSA em presença de D-ribose após 24 horas, empregando-se a aminoguanidina como controle positivo. Nas condições experimentais o 4-NC não foi capaz de inibir a reação de glicação, ao contrário da aminoguanidina. Foi também utilizado modelo para avaliação da propriedade contrátil de fibroblastos em matriz tridimensional de gel de colágeno, glicado e não glicado com D-ribose. O 4-NC na concentração de 100 μ M permitiu a manutenção da propriedade contrátil de fibroblastos em gel colágeno glicado.

Estudos de glicação em maiores períodos de tempo devem ser realizados visando a confirmar a possível atividade anti-glicação deste composto.

Palavras-chave: Glicação. Pentosidina. Albumina de soro bovino. Contração de gel de colágeno. 4-nerolidilcatecol.

Abstract

NAKAMURA MS. Evaluation of the protein anti-glycation activity of 4-nerolydiccatechol isolated from *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2007.

Glycation is a non enzymatic reaction which occurs between proteins and reductor sugars, responsible for the formation of adducts and crosslinkers between proteins, such as, pentosidine, an advanced glycation end-product (AGE) which accumulates in many tissues during aging.

AGEs accumulation is deleterious to the body and is associated with structural modifications in proteins and imbalance in their specific functions, such as: enzymatic activity, binding capacity, protein turnover and also responsible for the production of reactive oxygen species (ROS).

The mechanism of pentosidine formation involves oxidative reactions. One of the strategies to reduce pentosidine formation is by increasing antioxidant activity in tissues.

Pariparoba (*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. has showed antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* when applied on the skin. This activity was attributed to 4-nerolydiccatechol (4-NC), which is 10 times more potent than α -tocopherol.

Extracts of Pariparoba also inhibited the spontaneous lipid peroxidation in the skin of hairless mice.

In this work, the bovine serum albumin (BSA) model for glycation with D-ribose, evaluated by pentosidine fluorescence spectroscopy was employed. The activity of 4-NC was evaluated in different concentrations in this model after 24 hours. Aminoguanidine was used as positive control. In this experimental condition, 4-NC was not capable to inhibit the BSA glycation.

We also evaluated the contractile properties of fibroblasts on tridimensional matrix of collagen gel glycated or not with D-ribose. 4-NC (100 μ M) was able to keep the contractile capacity of fibroblasts in glycated collagen.

Studies of glycation in longer periods of time should be made in order to further evaluate the possible anti-glycation activity of this compound.

Keywords: Glycation. Pentosidine. Bovine serum albumin. Collagen gel contraction. 4-nerolydiccatechol.

Lista de Figuras

Figura 1. Glicação de proteínas	13
Figura 2. Glicooxidação – autooxidação de produtos de Amadori	14
Figura 3. Glicação autooxidativa	15
Figura 4. Estrutura da pentosidina - produto de glicação avançada	16
Figura 5. Curva padrão de concentração de 4-NC.....	31
Figura 6. Cromatograma de 4-NC isolado por CLAE preparativo.	32
Figura 7. Espectro de absorção UV de 4-NC.	32
Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) de 4-NC em CDCl_3	33
Figura 9. Espectro de fluorescência de colágeno glicado com D-ribose.....	35
Figura 10. Espectro de fluorescência de BSA glicado com D-ribose.	36
Figura 11. Efeito anti-glicação de albumina por aminoguanidina.	37
Figura 12. Efeito anti-glicação de colágeno por aminoguanidina.	37
Figura 13. Efeito anti-glicação de albumina por 4-NC.	39
Figura 14. Medida de contração de gel de colágeno por fibroblastos.	41
Figura 15. Medida de contração de gel de colágeno por fibroblastos.	43

Lista de Tabelas

Tabela 1. Área do pico cromatográfico de padrão de 4-NC.	30
Tabela 2. Área do pico cromatográfico de 4-NC em extrato de pariparoba.	31
Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz) de 4-NC em CDCl_3	34
Tabela 4. Análise estatística para medidas do efeito anti-glicação de albumina por 4-NC.....	40
Tabela 5. Análise estatística para medidas de contração de gel de colágeno	41

Lista de Abreviaturas

4-NC	4-nerolidilcatecol
AG	Aminoguanidina
AGE	Produto final da glicação avançada
BSA	Albumina de soro bovino
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
ERO	Espécie reativa de oxigênio
MED	Dose eritematosa mínima
MMP	Metaloproteinase de matriz
PBS	Tampão fosfato salino
RAGE	Receptor de produto final da glicação avançada
RMN	Ressonância magnética nuclear
SFB	Soro fetal bovino
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B

SUMÁRIO

Ficha Catalográfica	2
Agradecimentos	4
Resumo	5
Abstract	7
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	10
Lista de Abreviaturas	11
1 Introdução	13
1.1 Glicação de proteínas	13
1.2 Consequências da glicação de proteínas	16
1.3 Estratégias para o combate dos efeitos deletérios da glicação de proteínas	18
1.4 Atividade antioxidante de extratos de <i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq.	20
2 Objetivos	23
3 Materiais e Métodos	23
3.1 Obtenção do extrato seco de <i>P. umbellata</i> e doseamento de 4-NC	23
3.1.1 Reagentes	23
3.1.2 Equipamentos	23
3.1.3 Protocolo	24
3.2 Isolamento de 4-NC por CLAE preparativo e caracterização por RMN ¹³ C	25
3.2.1 Reagentes	25
3.2.2 Equipamentos	25
3.2.3 Protocolo	25
3.3 Glicação do colágeno por incubação com D-ribose	26
3.3.1 Reagentes	26
3.3.2 Equipamentos	26
3.3.3 Protocolo	26
3.4 Glicação do albumina de soro bovino por incubação com D-ribose	27
3.4.1 Reagentes	27
3.4.2 Equipamentos	27
3.4.3 Protocolo	27
3.5 Efeito anti-glicação de albumina e colágeno por aminoguanidina	27
3.5.1 Reagentes	27
3.5.2 Equipamentos	28
3.5.3 Protocolo	28
3.6 Efeito da glicação sobre a contração de gel de colágeno por fibroblastos humanos da derme	28
3.6.1 Reagentes	28
3.6.2 Equipamentos	29
3.6.3 Protocolo	29
4 Resultados e Discussão	30
4.1 Determinação quantitativa de 4-NC	30
4.1.1 Curva padrão de 4-NC	30
4.1.2 Doseamento de 4-NC no extrato seco de raiz de <i>P. umbellata</i>	31
4.1.3 Isolamento de 4-NC por CLAE preparativo e caracterização por RMN ¹³ C	32
4.2 Glicação do colágeno por incubação com D-ribose	35
4.3 Glicação de albumina de soro bovino por incubação com D-ribose	36
4.4 Efeito anti-glicação de albumina e colágeno por aminoguanidina	37
4.5 Efeito anti-glicação de albumina por 4-nerolidicatecol	39
4.6 Efeito da glicação sobre a contração de gel de colágeno por fibroblastos	40
4.7 Efeito do 4-NC sobre a contração de gel de colágeno por fibroblastos	43
5 Conclusões	45
6 Referências Bibliográficas	46

1 Introdução

1.1 Glicação de proteínas

A glicação é umas das modificações pós-translacionais que ocorrem em proteínas ao longo do tempo. É uma reação não enzimática espontânea, iniciada pela adição nucleofílica de um grupo amino livre de uma proteína a um grupo carbonila de um açúcar redutor, formando uma glicosilamina, denominada base de Schiff. Essa base de Schiff é instável e se rearranja de modo a formar um produto relativamente estável denominado produto de Amadori. Subsequentemente, o produto de Amadori se degrada em produtos intermediários di-carbônicos, que sendo muito reativos, reagem com outros grupos amino de proteínas, dando origem a ligações cruzadas intramoleculares e intermoleculares. Os produtos finais formados são chamados de produtos finais da glicação avançada e abreviados como **AGEs**, do termo em Inglês *Advanced Glycation Endproducts*. - Figura 1.

Figura 1. Glicação de proteínas

(Ahmed, N., 2005)

Os produtos finais da glicação avançada acumulam-se no organismo com o envelhecimento, principalmente em proteínas de longo tempo de vida, como por exemplo, o colágeno.

Um dos mecanismos descritos para a formação de AGEs está associado a autooxidação dos produtos de Amadori, sendo o processo denominado de glicooxidação (Figura 2).

Nesse mecanismo, na presença de metais de transição e oxigênio molecular, os produtos de Amadori são convertidos em compostos dicarbonílicos, via enediol de proteína, gerando radical superóxido. Uma vez formados, os radicais superóxido podem ser convertidos em radicais hidroxilas mais reativos via reação de Fenton (Hunt JV *et al*, 1993).

Figura 2. Glicooxidação – autooxidação de produtos de Amadori

(Ahmed N , 2005)

Outro mecanismo descrito para a geração de AGEs, denominado glicação autooxidativa, corresponde a autooxidação inicial do açúcar, catalisada por metais de transição, para formar um ânion radical enediol. Este radical reduz oxigênio molecular para gerar o radical superóxido e se oxida a um cetoaldeído dicarbonílico que reage com um grupo amino de uma proteína, formando uma cetoimina. (Figura 3).

Figura 3. Glicação autooxidativa

(Ahmed N , 2005)

As cetoiminas são muito mais reativas do que os produtos de Amadori, e participam subsequentemente na formação de AGEs.

Reações de oxidação estão envolvidas na formação de AGEs, sendo portanto, aceleradas na presença de oxigênio e reduzidas em condições anaeróbicas (Baynes, 1991).

Dentre os vários produtos finais da glicação de proteínas, destaca-se a pentosidina (Figura 4), um aduto fluorescente formado entre resíduos de lisina e arginina, que é considerada um dos marcadores de envelhecimento (Sell & Monnier, 1989).

Figura 4. Estrutura da pentosidina - produto de glicação avançada

(Ahmed N , 2005)

Outras reações podem ocorrer com açúcares mais reativos, como metilglioxal, glioxal e 3-deoxiglicossone, os quais podem se complexar com cadeias laterais de aminoácidos formando, entre outros, o dímero de metilglioxilisina (Schmid *et al.*, 2002).

1.2 Consequências da glicação de proteínas

Os produtos finais da glicação avançada modificam as propriedades físicas e químicas das proteínas e dos tecidos nos quais estão presentes (DeGroot, 2004).

Por serem produtos estranhos ao organismo, os AGEs são eliminados por meio da degradação da proteína. Dessa forma, embora todas as proteínas e lipoproteínas sejam susceptíveis a formação de AGEs, o acúmulo ocorre em maior extensão em proteínas que apresentam longo tempo de vida, tais como: cristalino em lentes oculares e colágeno na matriz extracelular de tecidos conjuntivos (cartilagem, osso, tendão e pele), sendo responsáveis pelo aumento da rigidez desses tecidos (Verziil N, 2000).

Pagoon H *et al* (2007), demonstraram diversas alterações biológicas em pele reconstruída com colágeno glicado. Uma das alterações observadas por marcação de vimentina foi na morfologia dos fibroblastos, que apresentaram aspecto mais alongado.

Verificou-se também um aumento de colágeno tipo III e I, assim como, na atividade das metaloproteinases MMP1, MMP2 e MMP9. Essas alterações são freqüentemente observadas em fibroblastos irradiados por UVA e, promovem a redução da espessura da derme (Bernerd F, Asselineau D, 1998).

Ainda, DeGroot *et al*, (2001) demonstraram que a degradação de cartilagem por metaloproteinases da matriz é menor em cartilagem glicada comparada ao tecido não glicado, sendo a cartilagem glicada menos sensível a degradação mediada por MMPs.

Chen *et al* (2003) demonstraram que os AGEs contribuem ao desenvolvimento da apoptose e da expressão de genes apoptóticos. Fato esse consistente com a hipótese de que o envelhecimento e, conseqüentemente o acúmulo de AGEs, aumenta o grau e a susceptibilidade a apoptose em vários tipos de células intactas (Higami and Shimokawa, 2000).

Além disso, AGEs são reconhecidos em muitas células por receptores de superfície denominados RAGEs (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) e por receptores seqüestradores tipo 1 e 2. O RAGE é um membro da família de imunoglobulinas que é expresso em uma variedade de tipos celulares, incluindo células endoteliais, células do músculo liso, células mononucleares e neurônios. (Stitt, 2001).

A interação de AGEs com RAGEs em macrófagos promove o estresse oxidativo e a ativação do fator nuclear κ B (NF κ B) por ativação de p21^{ras} e da via de sinalização MAP kinase. NF κ B modula a transcrição gênica de endotelina-1, fator de tecido, trombosmodulina e a geração de citocinas pro-inflamatórias, tais como, IL-1 α , IL-6 e TNF- α (Neumann A *et al.*, 1999).

Os produtos da degradação dos AGEs são levados à circulação para serem eliminados pelos rins e, a deterioração das funções renais com o envelhecimento, leva a um aumento nos produtos da degradação de AGE na circulação. Os produtos da degradação de AGEs de baixo peso molecular, podem modificar lipoproteínas de

baixa densidade (LDL), colágeno e outras biomoléculas. Produtos catabólicos de AGEs não eliminados do corpo pelos rins, podem irreversivelmente alterar estruturas renais e extra-renais, produzindo segundas e terceiras gerações de AGEs (Vlassara, 1996).

Outros estudos citam o efeito fototóxico de AGEs extraídos de colágeno de pele e do cristalino, sugerindo que atuam como sensibilizadores do estresse oxidativo quando expostos a radiação UV. Acredita-se que o acúmulo extensivo de AGEs durante o envelhecimento cronológico em condições de estresse foto-oxidativo induzido por UVA contribua consideravelmente para o foto-envelhecimento. (Ortwerth BJ *et al*, 1997; Wondrak GT *et al*, 2002; Wondrak GT *et al*, 2002)

1.3 Estratégias para o combate dos efeitos deletérios da glicação de proteínas

O organismo possui diferentes mecanismos para evitar a glicação e se proteger contra os efeitos deletérios dos AGEs. Um exemplo é a enzima α -cetoglutaraldeído desidrogenase, capaz de inativar o intermediário di-carbônico reativo 3-desoxiglicosona e, dessa forma, evitar a formação de AGEs (Hata F *et al*, 1988).

Várias aminas plasmáticas reagem com açúcares e com grupos carbonílicos de produtos de Amadori e proporcionam a redução de AGEs.

Algumas substâncias podem reduzir a glicação por bloqueio de grupos amino em proteínas, p. ex.: a aspirina está associada com a acetilação de resíduos de lisina. (Khalifah *et al.*, 1999) ou grupos carbonílicos em açúcares redutores, produtos de Amadori e seus intermediários, p. ex.: a aminoguanidina – hidrazina nucleofílica que reage com grupos carbonílicos de açúcares redutores (Thornalley PJ, 2003). No entanto, tanto a redução de grupos amino quanto carbonílicos, pode trazer efeitos colaterais indesejáveis.

Os quelantes de metais de transição podem reduzir radicais livres derivados da glicação, no entanto, sua supressão não é totalmente adequada, uma vez que muitos metais de transição possuem importantes funções fisiológicas.

Enzimas, como por exemplo, as amadoriases, podem ser utilizadas para desglicar produtos de Amadori ou inativar os intermediários, como a 3-desoxiglicosona.

Alguns agentes de clivagem de ligações cruzadas de AGEs oferecem o potencial de reverter as complicações relacionadas a diabetes, embora o mecanismo de ação preciso ainda seja desconhecido.

Bloqueadores de RAGEs podem prevenir a interação de AGEs com RAGEs para suprimir alterações inflamatórias e celulares associadas com o desenvolvimento de complicações em diabetes.

Ainda, uma outra estratégia para o combate da glicação e seus efeitos tóxicos é o aumento da atividade antioxidante, uma vez que o mecanismo de formação de AGEs envolve etapas oxidativas. Assim, a busca por produtos naturais com ação combinada anti-glicante e antioxidante e de baixa toxicidade torna-se muito interessante.

Verbeke *et al.* (2000) demonstraram por estudos *in vitro*, a ação anti-glicante de N⁶-furfuriladenina (Kinetin®), uma substância antioxidante e seqüestradora de espécies reativas de oxigênio. Diversas substâncias naturais, tais como, chá de Lubuoma (*Apocynum venetum* L.), chá verde, fração de tomate e flavonóides têm sido descritos como agentes inibidores da glicação *in vitro*. (Cervantes-Laurean D *et al*, 2006, Yokozawa T & Nakagawa T, 2004, Nakagawa T *et al*, 2002, Kiho T *et al*, 2004, Wu C-H & Yen G-C, 2005).

Essas descobertas abrem perspectiva de uso de outras moléculas antioxidantes e/ou neutralizadoras de radicais livres na inibição e/ou controle da glicação.

1.4 Atividade antioxidante de extratos de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq

Ao longo dos últimos anos, a indústria vem direcionando a pesquisa para a descoberta de novos compostos naturais de origem vegetal com atividade antioxidante. A pariparoba (*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq) demonstrou atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* quando aplicada sobre a pele (Ropke CD, 1998, Ropke CD *et al*, 2003, Ropke CD *et al*, 2005).

Pothomorphe umbellata (L.) Miq. é popularmente conhecida como pariparoba, capeba, caapeba, caapeba-do-norte, catajé, malvarisco, capeua, aguaxima, caapeba verdadeira e malvaíscio, com sinônimos *Heckeria umbellata* (L.) Kunth., *Piper umbellata* L. e *Piper hilarianum* Stend.

É originária das Américas (Kijjoa, 1980), tendo distribuição pantropical. Ocorre nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e sul da Bahia e, pode ser propagada em cultivo agrícola, apresentando, grande potencial de aplicação industrial. É uma espécie arbustiva que atinge de 2 a 3 m. Apresenta raízes adventícias fasciculadas e partem de uma cepa globosa, que medem entre 10 e 15 cm de comprimento por 5 a 10 mm de diâmetro, irregulares sub-cilíndricas de coloração pardo-acinzentadas, frequentemente com aspecto tuberculóide inflado e tortuoso. (Panizza S, 1998; Moraes MS, 1983).

O uso das raízes secas da pariparoba no Brasil foi descrito na primeira edição da Farmacopéia Brasileira (Silva, 1926). As raízes de *Pothomorphe umbellata* encontradas no comércio são fragmentadas e irregulares, com diâmetro de 5 a 30 mm. Seca, a raiz é fracamente aromática e possui sabor levemente acre e aromático (Riedel, 1941).

Na medicina popular, a pariparoba é empregada para o tratamento de insuficiência renal, males do fígado, má digestão, bronquite asmática, e externamente, no tratamento de queimaduras e feridas comuns. (Moraes MS, 1983).

Ensaio preliminares para a determinação de grupos de princípios ativos não detectaram a presença de alcalóides, flavonóides e antraderivados. Os extratos da

partes aéreas e de raízes apresentaram conteúdo de saponinas, óleos essenciais, taninos e compostos fenólicos, esteróides e mucilagens (Moraes MS, 1983).

Kijjoa (1980) isolou um sitoesterol e uma substância inédita, o 4-nerolidilcatecol (4-NC), a partir de raízes. Estudos *in vitro* (Barros *et al.*, 1996), demonstraram que o extrato hidro-alcoólico da raiz de pariparoba era mais ativo que o de folhas e caule quanto à capacidade de inibição da lipoperoxidação espontânea de homogeneizado de cérebro de ratos. Esta atividade foi atribuída ao 4-NC, que se mostrou 10 vezes mais potente que o α -tocoferol. Estes extratos também inibiram a lipoperoxidação espontânea da pele em pele de camundongos sem pêlo (Ropke CD, 1998).

Formulações de uso tópico contendo extrato hidroalcoólico de pariparoba foram testados em camundongos sem pêlo após exposição aguda e crônica à radiação UVB. Após 24 horas de exposição (2 MED UVB) e, demonstraram efeito preservador das concentrações endógenas de α -tocoferol, comparado com animais controle (Ropke CD, 2002^a, Ropke CD *et al.*, 2003). A preservação pode ter sido alcançada via seqüestro direto de radicais peroxila formados após a irradiação UV ou, alternativamente, por interação redox entre o 4-NC e α -tocoferol, onde o 4-NC teria reduzido o radical tocoferila e regenerar a vitamina E.

Em estudos crônicos, o extrato de pariparoba foi capaz de prevenir os efeitos da radiação UVB (0,7 MED) quanto ao fotoenvelhecimento e hiperplasia do epitélio (Ropke CD, 2002a, Ropke CD *et al.*, 2005). Este efeito é importante uma vez que a depleção de antioxidantes na pele, tal como α -tocoferol, pode levar ao desequilíbrio na homeostase redox celular, que por sua vez contribui para o envelhecimento prematuro. Além disso, têm sido demonstrado, que as EROs desempenham um papel na ativação de metaloproteinases da matriz extracelular e, que posteriormente são capazes de atacar e destruir muitas proteínas da matriz extracelular. Assim, as propriedades antioxidantes de *P. umbellata* parecem ser responsáveis por prevenir esta degradação e consequentemente, os efeitos deletérios dos agentes de fotoenvelhecimento (Scharfetter-Kochanek *et al.*, 1997, Ma W. *et al.*, 2001).

A irradiação da pele por UV produz aumento de peróxido de hidrogênio e outras espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROS podem ativar proteína quinases ativadas por mitógeno que fosforilam o fator de ativação de transcrição de proteína 1, que por sua vez, resultam na ativação de metaloproteinases de matriz, enzimas que degradam componentes da matriz extracelular (Saito M *et al*, 2002). Em estudo recente, foi demonstrado que o extrato de *P. umbellata* e o princípio ativo isolado 4-NC, inibem a expressão de metaloproteinases de matriz 9 (MMP-9) em camundongos sacrificados 2 horas após irradiação UVB. Postula-se que o 4-NC interaja diretamente com o sítio ativo de MMP-9, inibindo a enzima diretamente, a exemplo de outros catecóis (Ropke CD *et al*, 2006).

Apesar de todas as investigações já efetuadas com extratos de pariparoba, ainda não se sabe se o extrato, ou se o 4-NC, seu principal componente antioxidante, teriam ação como inibidores da reação de glicação. A confirmação dessa atividade abre novas fronteiras de potencial para exploração do extrato.

2 Objetivos

O trabalho teve como objetivos:

- desenvolver um método para avaliação de agentes anti-glicantes;
- avaliar o efeito da glicação sobre a propriedade contrátil de fibroblastos, utilizando um modelo de cultura celular em matriz tridimensional de colágeno.
- avaliar o efeito do 4-nerolidicatecol na prevenção da glicação de proteínas.

3 Materiais e Métodos

3.1 Obtenção do extrato seco de *P. umbellata* e doseamento de 4-NC

3.1.1 Reagentes

Metanol (Synth), Etanol (Synth), KCl (Merck), LiClO₄ (Aldrich), 4-nerolidilcatecol (padrão isolado no Laboratório de Patologia da FCF-USP).

3.1.2 Equipamentos

Moinhos de facas (Marconi, mod. MA680), moinho de bolas (Tecnal, mod. R-TE-350), liofilizador (Thermosavant mod. Modulyod 115), rotoevaporador (Heidolph mod. Laborota 4002).

Cromatógrafo constituído de bomba Waters Modelo 510, injetor 7161 Rheodyne dotado de loop de 20 µL, detector eletroquímico HP1049A constituído de um eletrodo de trabalho de placas de carbono-vidro e um eletrodo de referência de estado sólido. O sinal produzido foi transmitido a um integrador SP4600 Termoseparation Products. Fase móvel utilizada: metanol:água (90:10, v:v), contendo KCl 2 mM e LiClO₄ 20mM com um fluxo 1.0 mL/min. Coluna Supelcosil LC-8, 3 µm, 75X4,6mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Programação do detector eletroquímico: potencial = 0,600 V; polaridade = oxidação; modo = amperometria.

3.1.3 Protocolo

Raízes frescas de *P. umbellata* (3,11 kg) foram lavadas em água corrente e o material foi seco em estufa a 40 graus com circulação e renovação de ar por 5 dias. As raízes secas foram moídas em moinho de facas e em moinho de bolas e passadas em tamis malha 40 e 60.

O extrato hidroalcoólico foi preparado por percolação de 398,82 g de raiz seca moída com 4L de solução de etanol e água na proporção de 1:1 (v/v) até o esgotamento da droga, conforme o processo A da farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959). O extrato hidroalcoólico foi concentrado em rotoevaporador e o resíduo aquoso foi liofilizado, obtendo-se 43,7 g de extrato seco.

Para a obtenção da curva padrão de 4-NC (obtido segundo o item 3.2.3) foi realizada a completa dissolução do princípio ativo em solução de etanol e água 1:1 (v:v). Preparou-se 6 replicatas de soluções de 4-NC nas concentrações de 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 e 0,02 µg/mL. As amostras foram injetadas em CLAE acoplado ao detector eletroquímico.

Para o doseamento de 4-NC no extrato seco, foram preparadas soluções mãe de 1 mg/mL do extrato seco de *P. umbellata* em triplicata em etanol e água na proporção 1:1 (v/v). Inicialmente solubilizou-se o extrato seco em água e posteriormente adicionou-se o etanol. Foram realizadas 4 diluições sucessivas da solução mãe (1 mg/mL) de 10X, 10X, 4X e 1X com etanol absoluto para a obtenção de uma solução de 1,25 µg/mL.

3.2 Isolamento de 4-NC por CLAE preparativo e caracterização por RMN ¹³C

3.2.1 Reagentes

Etanol PA (Synth, lote 93173), Acetonitrila PA (Carlo Erba, lote 21090501C),

3.2.2 Equipamentos

Cromatógrafo Preparativo Waters. Coluna: DeltaPack C18 (15 µm, 100 Å, 300-50 mm ID), fase móvel: Acetonitrila: Água (70:30, v:v) em modo isocrático, fluxo: 100 mL/min e detecção: UV-Visível 282 nm. A injeção da amostra foi realizada de forma manual na coluna (volume do loop de injeção 20 mL), efeito SepaK (adição de gde quantidade de amostra em água para retenção do ativo na entrada da coluna).

Cromatógrafo Analítico Waters. Coluna de fase reversa C18, fase móvel: metanol:água (70:30 v/v) em modo isocrático, fluxo 0.8 mL/min e detecção: arranjo de diodo (comprimento de onda 282 nm).

Equipamento de RMN Bruker, modelo DPX 300 na frequência de carbono de 75,47 MHz com sensor de 5 mm.

3.2.3 Protocolo

Pesou-se 25g de extrato de raízes de *P.umbellata* em Erlenmeyer de 100 mL. Adicionou-se 50 mL de Etanol PA. A mistura foi sonicada por 25 minutos. Após sonicação, a mistura foi centrifugada a 12.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro Millex 45 µm. Adicionou-se 10 mL de etanol p.a. para completar o volume de 25 mL para injeção no CLAE preparativo.

O equipamento de CLAE foi programado para o modo preparativo. Limpou-se o sistema com solvente orgânico (Acetonitrila) previamente ao uso. As frações foram recolhidas em tempo de retenção entre 47 e 53 minutos.

Após análise em CLAE analítico para a confirmação do 4-NC, as frações foram rotoevaporadas para retirada da acetonitrila (40°C, pressão de 135 mbar por 4 horas). Realizou-se a partição com 3 alíquotas de diclorometano, as frações orgânicas foram reunidas e seca com adição de sulfato de sódio e filtrada em papel analítico. O diclorometano foi completamente removido por rotoevaporação.

O padrão isolado foi diluído em etanol para verificação da pureza por CLAE e em CDCl_3 para análise de RMN.

3.3 Glicação do colágeno por incubação com D-ribose

3.3.1 Reagentes

Colágeno tipo I de cauda de rato 4 mg/mL (BD Biosciences), D-ribose (Sigma R-9629) e Ácido acético glacial P.A. (Merck).

3.3.2 Equipamentos

Espectrofluorímetro Spex Fluorolog 1681 (0,22 m) Spectrometer (Spex – Jobin Yvon Horiba). Modo de varredura = excitação (260 – 380 nm), monocromador de emissão = 400 nm, incremento = 1 nm.

3.3.3 Protocolo

A glicação do colágeno foi realizada por método previamente descrito (Roy R, Bonassar L, 2003) com pequenas variações.

Alíquotas de 3,6 mL de solução de colágeno tipo I de cauda de rato 4 mg/mL em ácido acético 0,1% foram incubadas com concentrações crescentes de soluções de D-ribose em ácido acético 0,1%, de forma que as concentrações finais de colágeno fossem de 1,5 mg/mL em 25, 50 e 75 mM de D-ribose. As soluções foram incubadas a 4°C por 5 dias. Uma solução de colágeno sem ribose foi mantida como controle.

3.4 Glicação do albumina de soro bovino por incubação com D-ribose

3.4.1 Reagentes

Albumina de soro bovino (Sigma), D-ribose (Sigma R-9629), Tampão fosfato salino 0,1M.

3.4.2 Equipamentos

Espectrofluorímetro Spex Fluorolog 1681 (0,22 m) Spectrometer (Spex – Jobin Yvon Horiba). Modo de varredura = excitação (260 – 380 nm), monocromador de emissão = 400 nm, incremento = 1 nm.

3.4.3 Protocolo

A glicação da albumina de soro bovino foi realizada por método previamente descrito (Kim HY e Kim K, 2003) com pequenas variações.

Alíquotas de 3,6 mL de solução de BSA 4 mg/mL em PBS 0,1 M foram incubadas com concentrações crescentes de soluções de D-ribose em PBS 0,1 M, de forma que as concentrações finais de BSA fossem de 1,5 mg/mL em 25, 50 e 75 mM de D-ribose. As soluções foram incubadas a 4°C por 5 dias. Uma solução de BSA sem ribose foi mantida como controle.

3.5 Efeito anti-glicação de albumina e colágeno por aminoguanidina

3.5.1 Reagentes

Albumina de soro bovino (Sigma), ácido acético PA (F. Maia Ind. E Com. Ltda), Aminoguanidina hidrocloreto (Sigma), D-ribose (Sigma R-9629), Colágeno de cauda de rato 4 mg/mL (BD Biosciences) em ácido acético 0,02 N, PBS 0,1M.

3.5.2 Equipamentos

Espectrofluorímetro Spex Fluorolog 1681 (0,22 m) Spectrometer (Spex – Jobin Yvon Horiba). Modo de varredura = excitação (260 - 380 nm), monocromador de emissão = 400 nm, incremento=1 nm.

Leitor de placas BioTek, modelo Synergy HT. Modo de detecção: fluorescência, Excitação: 460 ± 40 . Emissão: 360 ± 40 .

3.5.3 Protocolo

A glicação de albumina de soro bovino e de colágeno foi realizada por métodos previamente descritos (Kim HY e Kim K, 2003; Roy R e Bonassar L, 2003) com modificações.

Alíquotas de 1,0 mL de solução de BSA (4 mg/mL) em PBS 0,1 M foram incubadas com 800 μ L de D-ribose (50 mM) em PBS 0,1M e 200 μ L de aminoguanidina (100 mM) ou 4-NC (250 μ M e 500 μ M).

Foram realizados controles com solução de BSA sem D-ribose, e com BSA com 4-NC sem D-ribose.

As concentrações finais das soluções de proteína foram de 1,5 mg/mL em 25 mM de D-ribose, 10 mM de aminoguanidina e 500 μ M e 250 μ M de 4-NC.

As soluções foram incubadas a 37°C por 24 horas.

3.6 Efeito da glicação sobre a contração de gel de colágeno por fibroblastos humanos da derme

3.6.1 Reagentes

Álcool etílico PA (Synth), Ác. Acético 100% PA (Synth), D-ribose (Sigma R-9629), Colágeno de cauda de rato 4 mg/mL (BD Biosciences em ácido acético 0.02 N), Soro Fetal Bovino (Nutricell), NaOH 2M, Meio de cultura DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Gibco 31600-034) 1X com 10% de soro fetal bovino e 10X (Gibco), fibroblastos humanos da derme de 12^a passagem (FH014/02) cedidos por

Excellion Serviços Biomédicos S.A. com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/Hospital Universitário Antônio Pedro – Universidade Federal Fluminense CEP CNM HUAP No. 040-05, Tripsina 1X em tampão fosfato salino (Trypsin/EDTA-4Na 10X, Gibco cat. 15400-054).

3.6.2 Equipamentos

Câmera digital Coolpix 4500 (Nikon), programa de Análise de Imagem (Image Pro Plus – Mediacy).

3.6.3 Protocolo

A contração de colágeno por fibroblastos foi realizada por método previamente descrito (Roy R, Bonassar L, 2003) com modificações.

Foi utilizada 1 garrafa de cultura de 150 cm² de fibroblastos humanos da derme em confluência. Em fluxo laminar descartou-se o meio de cultura, lavou-se as garrafas com 2 mL de PBS 1X, repetindo o processo duas vezes. As células aderidas foram removidas com 1 alíquota de 7 mL de Tripsina 1X, mantendo o contato com a solução por 1 minuto em estufa a 37 graus Celsius. O conteúdo de células foi dividido para 2 tubos Falcon contendo cada um 10 mL de DMEM com 10% de soro fetal bovino para a neutralização da Tripsina. Os tubos Falcon foram centrifugados por 8 minutos a 1500 rpm.

Removeu-se o sobrenadante dos tubos. Adicionou-se 7 mL de DMEM com 10% de SFB e homogeneizou-se até que os *pellets* de células fossem ressuspensos. Realizou-se a contagem em câmara de Neubauer, obtendo-se uma concentração de $31,375 \cdot 10^4$ células/mL.

Para a gelificação do colágeno utilizou-se uma proporção de 8 partes de colágeno (3,2 mL), 1 parte de DMEM 10X (0,36 mL) + NaOH 2M (0,04 mL) e 1 parte de SFB com células (0,4 mL). Alíquotas de 1 mL de cada colágeno gelificado contendo $1 \cdot 10^5$ células foram adicionadas em placas de 24 poços, em triplicata. Após 2 horas adicionou-se 1 mL de meio de cultura sobre os mesmos. Os géis de colágeno foram fotografados em diferentes tempos.

4 Resultados e Discussão

4.1 Determinação quantitativa de 4-NC

4.1.1 Curva padrão de 4-NC

O tempo de retenção do pico cromatográfico referente ao 4-NC foi de 2,2 minutos. Preparou-se 6 replicatas de soluções de 4-NC nas concentrações de 0,31, 0,16, 0,08, 0,04 e 0,02 µg/mL. As áreas do pico cromatográfico para as 6 replicatas de soluções de 4-NC estão expressas na Tabela 1:

	0,31 µg/mL	0,16 µg/mL	0,08 µg/mL	0,04 µg/mL	0,02 µg/mL
Rep. 1	921262	449289	242829	127539	52400
Rep. 2	933231	451186	235417	132736	71650
Rep. 3	730767	359007	171298	120916	70200
Rep. 4	722725	348618	186727	111777	50709
Rep. 5	752677	388913	200766	105927	70974
Rep. 6	778429	378918	204779	107917	59616
Média	806515,2	395988,5	206969,3	117801,2	62591,5
Desv. Padrão	95571,6	44363,9	27642,9	10976,9	9634,6
CV	12%	11%	13%	9%	15%

Tabela 1. Área do pico cromatográfico de padrão de 4-NC.

O coeficiente de variação máximo para as 6 replicatas foi de 15%.

A Figura 5 mostra a curva padrão construída para concentrações de 4-NC. A equação da reta obtida foi $Y = 2521919,2346X + 12095,8542$ e o coeficiente de correlação (R^2) foi 0,9995.

Figura 5. Curva padrão de concentração de 4-NC.

4.1.2 Doseamento de 4-NC no extrato seco de raiz de *P. umbellata*

A Tabela 2 apresenta a área do pico cromatográfico, referente ao tempo de retenção 2,2 minutos obtida para cada solução de extrato de *P. umbellata* preparada, assim como o cálculo da concentração de 4-NC no extrato seco:

Solução de <i>P. umbellata</i> (1,25 µg/mL)	Área do cromatograma em TR = 2,2 min.	Concentração de 4-NC (µg/mL)	% de 4-NC no extrato seco
Replicata 1	603837	0,235	18,7
Replicata 2	623148	0,242	19,4
Replicata 3	539422	0,209	16,7
Média	588802	0,229	18,3
CV			7,6

Tabela 2. Área do pico cromatográfico de 4-NC em extrato de pariparoba.

O extrato seco de raiz de *P. umbellata* obtido apresentou uma concentração média de 4-NC de 18%.

4.1.3 Isolamento de 4-NC por CLAE preparativo e caracterização por

RMN ^{13}C

O 4-NC isolado por CLAE preparativo foi analisado em CLAE analítico, obtendo-se o cromatograma abaixo - Figura 6.

Figura 6. Cromatograma de 4-NC isolado por CLAE preparativo.

O espectro UV referente ao pico em tempo de retenção de 7,198 s, encontra-se na Figura 7.

Figura 7. Espectro de absorção UV de 4-NC.

O espectro de RMN de ^{13}C para 4-NC isolado está expresso na figura 8.

Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) de 4-NC em CDCl_3

Os deslocamentos químicos associados aos carbonos da estrutura de 4-NC estão expressos na Tabela 3.

Carbono	δ (ppm)
C-1	141,3
C-2	143,1
C-3	114,9
C-4	140,9
C-5	119,2
C-6	114,2
C-1'	111,5
C-2'	147,0
C-3'	43,8
C-4'	41,2
C-5'	23,2
C-6'	124,4
C-7'	135,0
C-8'	39,7
C-9'	26,7
C-10'	124,5
C-11'	131,3
C-12'	25,0
C-13'	15,9
C-14'	25,7
C-15'	17,7

Tabela 3. Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz) de 4-NC em CDCl_3

Os dados estão em concordância com os resultados descritos por Kijoa A *et al*, 1980.

4.2 Glicação do colágeno por incubação com D-ribose

A Figura 9 mostra o espectro de fluorescência (modo excitação) dos colágenos submetidos à reação de glicação. As soluções de colágeno foram incubadas com diferentes concentrações de D-ribose por 5 dias a 4 graus Celsius. Uma solução foi incubada sem D-ribose (controle). O par característico de comprimento de onda de excitação e emissão, correlacionado à pentosidina foi $\lambda_{exc/em}$ de 335/400 (KOLLIAS *et al*, 2002).

Figura 9. Espectro de fluorescência de colágeno glicado com D-ribose.

A intensidade de fluorescência em 335 nm foi de $7,72 \cdot 10^{10}$ cps para o colágeno controle e $1,12 \cdot 10^{11}$, $1,44 \cdot 10^{11}$, $1,75 \cdot 10^{11}$ cps respectivamente para o colágeno incubado com D-ribose nas concentrações de 25 mM, 50 mM e 75 mM de D-ribose, mostrando uma relação linear da fluorescência associada ao produto da glicação com a concentração de D-ribose.

4.3 Glicação de albumina de soro bovino por incubação com D-ribose

A Figura 10 mostra o espectro de fluorescência (modo excitação) das soluções de albumina submetidas à reação de glicação. As soluções de albumina foram incubadas com diferentes concentrações de D-ribose. Uma solução foi incubada sem D-ribose (controle). O par característico de comprimento de onda de excitação e emissão, correlacionado à pentosidina foi $\lambda_{exc/em}$ de 335/400 (KOLLIAS *et al*, 2002).

Figura 10. Espectro de fluorescência de BSA glicado com D-ribose.

A intensidade de fluorescência em 335 nm foi de $8,92 \cdot 10^4$ cps para albumina controle e $5,45 \cdot 10^6$, $6,79 \cdot 10^6$ e $7,07 \cdot 10^6$ cps, respectivamente para a albumina incubada com D-ribose nas concentrações de 25 mM, 50 mM e 75 mM de D-ribose. Não foi observado diferença significativa entre as concentrações de 50 e 75 mM,

4.4 Efeito anti-glicação de albumina e colágeno por aminoguanidina

A Figura 11 apresenta a intensidade de fluorescência em comprimento de onda de 335 nm, associada à formação de pentosidina em albumina incubada com D-ribose (25 mM) em diferentes tempos, na ausência e presença de aminoguanidina (10 mM).

Figura 11. Efeito anti-glicação de albumina por aminoguanidina.

A Figura 12 apresenta a intensidade de fluorescência em comprimento de onda de 335 nm, associada à formação de pentosidina em colágeno incubado com D-ribose (25 mM) em diferentes tempos, na ausência e presença de aminoguanidina.

Figura 12. Efeito anti-glicação de colágeno por aminoguanidina.

Observou-se, nessas condições experimentais, que o efeito anti-glicação da aminoguanidina foi observado apenas frente à albumina glicada.

Muitos autores têm relatado o uso de albumina de soro bovino como proteína em experimentos *in vitro* de glicação (Kiho *et al*, 2004, Yokozawa T & Nakagawa T, 2004, Wu C-H & Yen G-C, 2005 e Nakagawa T *et al*, 2002) e, recentemente, Cervantes-Laurean D. *et al* (2006) demonstraram atividade anti-glicação da rutina *in vitro*, utilizando colágeno e glicose em seus experimentos. A concentração de colágeno empregada nesse experimento foi de 1 mg/mL em 50 mM de glicose em PBS e contendo até 150 μ M de rutina. A solução foi incubada a 37 °C por 16 dias. A avaliação da pentosidina pelos autores foi realizada por CLAE com detecção por fluorescência, após hidrólise ácida do colágeno.

Em nosso experimento, o colágeno 1,5 mg/mL foi incubado em solução de D-ribose 25 mM em ácido acético, a 4 °C por 5 dias.

A baixa extensão de glicação ao longo do tempo observada em nosso experimento para o colágeno por ter ocorrido em função da redução da cinética de reação, visto que as condições de temperatura e o tempo de incubação foram menores. Estudo previamente realizado com colágeno incubado com D-ribose a 37 °C, não permitiu a gelificação do colágeno, que seria empregado nos experimentos de contração de gel por fibroblastos, tendo a metodologia sido abandonada por esta razão. Além disso, o método de análise de pentosidina por CLAE com detecção de fluorescência é mais específico do que o método por espectroscopia de fluorescência, sendo a quantificação da formação da pentosidina mais precisa.

Para o 4-NC isolado, a técnica não pode ser aplicada para concentrações superiores a 0,5 mM, devido a pouca solubilidade do mesmo no meio. Assim, a atividade anti-glicação do 4-NC foi avaliada para concentrações inferiores a 0,5 mM.

4.5 Efeito anti-glicação de albumina por 4-nerolidicatecol

A figura 13 apresenta a média de intensidade de fluorescência associada à formação de pentosidina em albumina de soro bovino nos tempos 0 e 24 horas.

Figura 13. Efeito anti-glicação de albumina por 4-NC.

A análise de variância fator único indicou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos após 24 horas (Tabela 4). Os resultados obtidos no tempo inicial (T0) não mostraram diferença significativa.

Observa-se que as médias de intensidade de fluorescência das amostras de BSA incubadas com D-ribose na presença de 4-NC apresentaram maior formação de pentosidina, comparativamente às amostras na presença de Aminoguanidina, sendo esse resultado responsável pela diferença estatisticamente significativa.

Anova: fator único

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	3	39910	13303,3	63452,3
Coluna 2	3	35014	11671,3	76746,3
Coluna 3	3	39108	13036,0	14629,0
Coluna 4	3	36044	12014,7	2527366,3
Coluna 5	3	34514	11504,7	156362,3
Coluna 6	3	40395	13465,0	175300,0
Coluna 7	3	34761	11587,0	144163,0

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	13469911,9	6	2244985,317	4,976187782	0,00633055	2,847725996
Dentro dos grupos	6316038,667	14	451145,619			
Total	19785950,57	20				

Tabela 4. Análise estatística para medidas do efeito anti-glicação de albumina por 4-NC

Assim, observa-se que nessas condições experimentais, o 4-NC não foi capaz de inibir a reação de glicação. Já a aminoguanidina que apresentou 95% de inibição da glicação.

4.6 Efeito da glicação sobre a contração de gel de colágeno por fibroblastos

A Figura 14 apresenta a média dos diâmetros do gel de colágeno incubados com diferentes concentrações de D-ribose após 24 e 72 horas. O diâmetro do gel de colágeno foi calculado por análise de imagem, tomando-se a média de 4 segmentos de reta estabelecidos no gel.

Após 72 horas da incubação das células, o diâmetro do gel controle (sem ribose) foi 55% menor do que o valor inicial (15,8 mm), enquanto para o gel incubado com 25 mM, 50 mM e 75 mM de D-ribose foi 45%, 49% e 47% menores do que o valor inicial, respectivamente.

Figura 14. Medida de contração de gel de colágeno por fibroblastos.

A análise de variância fator único indicou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos após 72 horas (Tabela 4). Os resultados obtidos após 24 horas não mostraram diferença significativa.

Anova: fator único

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
controle	3	21,31878	7,106258	0,00669
25 mM	3	26,35052	8,783508	1,186672
50 mM	3	24,28255	8,094183	0,187806
75 mM	3	25,00953	8,336508	0,097717

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	4,52728	3	1,509093	4,081707	0,049568	4,06618
Dentro dos grupos	2,957769	8	0,369721			
Total	7,485049	11				

Tabela 5. Análise estatística para medidas de contração de gel de colágeno

Os resultados indicam que a glicação de colágeno por incubação com D-ribose modifica o processo de contração do gel por fibroblastos, após 72 horas. Não foi observado diferença significativa entre as concentrações de 25, 50 e 75 mM de D-ribose.

4.7 Efeito do 4-NC sobre a contração de gel de colágeno por fibroblastos

A figura 15 apresenta a média do diâmetro de gel de colágeno incubado ou não com 25 mM de D-ribose, tratados ou não com 4-NC (100 μ M).

Figura 15. Medida de contração de gel de colágeno por fibroblastos.

Observou-se que a contração de colágeno foi menor no colágeno glicado do que no colágeno não submetido à glicação por incubação com D-ribose. Esse resultado confirma os anteriormente relatados, mostrando a influência da reação de glicação sobre as propriedades contráteis (Roy R, Bonassar L, 2003, Howard EW *et al*, 1996).

O 4-NC incubado com colágeno na ausência de D-ribose não interferiu no processo de contração e, quando incubado na presença de D-ribose, verificou-se maior efeito de contração do gel comparado ao colágeno glicado sem 4-NC.

Rittié L *et al* (1999) demonstraram que a glicação de colágeno reduz a expressão de metaloprotease da matriz tipo I (colagenase) por fibroblastos, além de inibir a ativação da metaloprotease de matriz tipo II (Gelatinase A). Os autores demonstraram que a dificuldade dos fibroblastos em remodelar e contrair a matriz extracelular coincide com a redução da produção de MMPs.

Os resultados obtidos neste experimento indicam que o 4-NC exerce influência sobre o processo celular de contração de colágeno glicado e, que podem atuar sobre a homeostase da matriz extracelular.

5 Conclusões

A metodologia proposta para a quantificação de pentosidina por espectroscopia de fluorescência para a avaliação da glicação de colágeno e albumina de soro bovino com D-ribose foi de simples execução e apresentou boa sensibilidade e precisão no modelo de albumina.

A quantificação da pentosidina na presença de 4-NC isolado não pode ser aplicada para concentrações superiores a 0,5 mM, devido a pouca solubilidade no meio. Assim, a atividade antiglicação do 4-NC foi avaliada para concentrações inferiores a 0,5 mM

Os resultados do efeito anti-glicação utilizando o controle positivo aminoguanidina, indicaram efeito positivo quando foi empregada a albumina de soro bovino como proteína modelo. Resultado semelhante não foi observado para o colágeno. Assim, nas condições experimentais estudadas, o modelo de avaliação da atividade anti-glicação mais adequado foi o da albumina.

Avaliou-se a atividade do 4-NC em diferentes concentrações sobre a reação de glicação da BSA em presença de D-ribose após 24 horas, empregando-se a aminoguanidina como controle positivo. Nas condições experimentais o 4-NC não foi capaz de inibir a reação de glicação ao contrário da aminoguanidina que apresentou 95% de inibição da glicação.

O modelo de matriz de colágeno glicado por D-ribose utilizado mostrou-se viável para o estudo do efeito contrátil de gel de colágeno por fibroblastos humanos da derme. Esse modelo permite também o emprego no estudo da influência da matriz extracelular sobre a morfologia celular. O 4-NC na concentração de 100 μ M manteve a propriedade contrátil de fibroblastos em gel colágeno glicado.

Estudos de glicação em maiores períodos de tempo devem ser realizados visando a avaliar uma possível atividade anti-glicação deste composto.

6 Referências Bibliográficas

- AHMED N. Advanced glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res. Clin. Pract.** v.67, p.3-21, 2005.
- BAYNES JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes** v.40, p. 405– 412, 1991.
- BERNERD F, ASSELINEAU D. UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. **Cell Death Differ.** v.5, p.792-802, 1998.
- CERVANTES-LAUREAN D *et al.* Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. **J. Nut. Biochem.** v.17, p.531-540, 2006.
- CHEN BH *et al.* Advanced glycation end products induce apoptosis and expression of apoptotic genes in cultured bovine retinal capillary pericytes. **Zhonghua Yan Ke Za Zhi.** v.39, f.4, p.224-7, 2003.
- DEGROOT J, *et al.* Age-related decrease in susceptibility of human articular cartilage to matrix metalloproteinase-mediated degradation: the role of advanced glycation end products. **Arthritis Rheum.** v.44, p.2562-2571, 2001.
- DEGROOT J. The AGE of the matrix: chemistry, consequence and cure. **Curr Opinion in Pharmacol** v.4, p.301-305, 2004.
- HATA F *et al.* Suppressive effect of α -cetoglutaraldeído desidrogenase on the advanced process of the Maillard reaction. **Diabetes Res. Clin. Pract.** v.5, p.5413, 1988.
- HIGAMI Y, SHIMOKAWA I. Apoptosis in the aging process. **Cell Tissue Res.**, v.301, f.1, p.125-32, 2000.
- HOWARD EW *et al.* Cellular contraction of collagen lattices is inhibited by nonenzymatic glycation. **Exp Cell Res.** v.28, p.132-137, 1996.

HUNT JV *et al.* Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation, **Biochem. J.** v.291, p.529–535, 1993.

LEWIS BS, Harding JJ. The effects of aminoguanidine on the glycation (non-enzymic glycosylation) of lens protein, **Exp. Eye Res**, v.50, p. 463–467, 1992.

KHALIFAH RG *et al.* Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. **Biochem Biophys Res Commun.** v.257, f.2, p.251-8, 1999.

KIHO T *et al.* Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v.68, f.1, p.200-205, 2004.

KIJOA A *et al.* 4-Nerolidylcatechol from *Potomorphe umbellata*. **J. Med. Plant Res.** v.39, p.85-87, 1980.

KIM, HY, Kim, K, Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.51, p.1586–1591, 2003.

KOLLIAS N *et al.* Fluorescence spectroscopy of the skin. **Vibrational Spectroscopy.** v.28, p.17-23, 2002.

LEWIS BS, Harding JJ. The effects of aminoguanidine on the glycation (non-enzymic glycosylation) of lens proteins. **Exp Eye Res.**, v.50, f.5, p.463-7, 1990.

MA W *et al.* Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the termal connective tissue. **Clin. Exp. Dermatol**, v.26, p. 592-9, 2001.

MORAES, MS. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. São Paulo, 1983. 112p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).

NAGASAWA T, *et al.* Dietary G-rutin suppresses glycation in tissue proteins of streptozotocin-induced diabetics rats. **Mol. Cell. Biochem.** v.252, p.141-147, 2003.

NAKAGAWA, T, YOKOZAWA, T, TERASAWA, K, SHU, S AND JUNEJA, LR. Protective Activity of Green Tea against Free Radical- and Glucose-Mediated Protein Damage. **J. Agric. Food Chem.** v.50, p.2418-2422, 2002.

NEUMANN A *et al.* High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation end-products induced NF- κ B activation and cytokine expression. **FEBS Lett.** v.453 p.283-287, 1999.

ORTWERTH BJ *et al.* The relative UV sensitizer activity of purified advanced glycation endproducts. **Photochem. Photobiol.** v65, f.4, p.666-672, 1997.

PAGEON H, ASSELINEAU D. An *in vitro* approach to the chronological aging of skin by glycation on the collagen. The biological effect of glycation on the reconstructed skin model. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.1043, p.529-532, 2005.

PAGEON H, *et al.* Collagen glycation triggers the formation of aged skin *in vitro*. **Eur J Dermatol.** v.17, f.1, p.12-20, 2007.

PANIZZA S. **Plantas que curam: cheiro de mato.** 15^o ed. São Paulo: Ibrasa, 1998. p.159-160.

RIEDEL, O.O. Subsídios para o estudo farmacognóstico da *Heckeria umbellata* (Linné) kunth. **Trib. Farm., Curitiba**, v.9, p.269-283, 1941.

RITTIÉ L, *et al.* Decreased contraction of glycated collagen lattices coincides with impaired matrix metalloprotease production. **Biochem Biophys Res Commun.** v.22, f.2, p.488-492, 1999.

ROPKE CD. Avaliação da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* na pele, São Paulo 83p. (Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo), 1998.

ROPKE CD *et al.* Topical application of *Pothomorphe umbellata* root extract prevents α -tocopherol from depletion after UV-irradiation on hairless mouse skin. **Free Radical Biol. Med.**, v.33, s.1, p. S199-S200, 2002a.

ROPKE CD *et al.* *Pothomorphe umbellata* extract prevents α -tocopherol depletion after UV-irradiation. **Photochem. Photobiol.**, v.78, f.5. p. 436-439, 2003.

ROPKE CD *et al.* Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Clin. Exp. Dermatol**, v.30, p. 272-276, 2005.

- ROPKE CD *et al.* *In Vitro* and *in vivo* inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. **Photochem. Photobiol.**, v.82, p. 439-442, 2006.
- ROY R & BONASSAR L. Processing of collagen gels using non-enzymatic glycation. Summer Bioengineering Conference, p.939-940, 2003.
- SAITO M *et al.* Green tea polyphenols inhibit metalloproteinase activities in the skin, muscle, and blood of rainbow trout. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p. 7169-7174, 2002.
- SCHARFETTER-KOCHANNEK *et al.* UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. **Biol. Chem**, v.378, p. 1247-57, 1997.
- SCHMID *et al.* **Cosmetic and Toiletries Manufacturing Worldwide**. p.118-124, 2002.
- SELL DR, MONNIER VM. Structure Elucidation of a Senescence Cross-link from Human Extracellular Matrix. **J. Biol. Chem.** v.264, f.36, p.21597-21602, 1989.
- SILVA, R.A.D. *Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Nacional, p.649, 1926.
- STITT AW. Advanced glycation: and important pathological event in diabetic and age related ocular disease. **Br. J Ophthalmol** v85, p.746-753, 2001.
- THORNALLEY PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v.419, p.31-40, 2003.
- VERBEKE P *et al.* Kinetin inhibits protein oxidation and glycoxidation *in vitro*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v.276, p.1265-1270, 2000.
- VERZIL N *et al.* Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. **J. Biol. Chem.** v.27, p.39027-39031, 2000.
- VLASSARA H. Protein glycation in the kidney: role in diabetes and aging. **Kidney Int.** v.49, p. 69-77, 1996.
- WONDRAK GT *et al.* Photosensitized growth inhibition of cultured human skin cells: mechanism and suppression of oxidative stress from solar irradiation of glycated proteins. **J Invest. Dermatol**, v.119, f. 2, p.489-498, 2002.

WONDRAK GT *et al.* Proteins of the extracellular matrix are sensitizers of photo-oxidative stress in human skin cells. **J. Invest. Dermatol.** v.121, f.3, p.578-586, 2003.

WU C-H & YEN G-C. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. **J. Agric. Food Chem.** v.53, p.3167-3173, 2005.

YOKOZAWA T & NAKAGAWA T. Inhibitory effects of lubuoma tea and its components against glucose-mediated protein damage. **Food Chem. Tox.** v.4, p. 975-981, 2004.