UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE

OBTENÇÃO DE UMA NOVA CARBOXIMIDAMIDA COM PROPRIEDADES ANTIDIABÉTICAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS

RODRIGO OTÁVIO SILVA DE SOUZA

MANAUS-AM

2019

RODRIGO OTAVIO SILVA DE SOUZA

OBTENÇÃO DE UMA NOVA CARBOXIMIDAMIDA COM PROPRIEDADES ANTIDIABÉTICAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS

Tese doutorado apresentada ao Curso de Doutorado de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS-AM

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729o

Souza, Rodrigo Otávio Silva de
Obtenção de uma nova carboximidamida com propriedades antidiabéticas e anti-inflamatórias / Rodrigo Otávio Silva de Souza. 2019
110 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Emerson Silva Lima
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Antidiabético . 2. Anti-inflamatório. 3. Fosfodiesterase . 4. Carboximidamida. I. Lima, Emerson Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

RODRIGO OTÁVIO SILVA DE SOUZA

"OBTENÇÃO DE UMA NOVA CARBOXIMIDAMIDA COM PROPRIEDADES ANTIDIABÉTICAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS".

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador (a): **Prof. Dr. Emerson Silva Lima**

Co-orientador(a):

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Emerson Silva Lima (UFAM)
Presidente da banca

Profa. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho (UFAM)
Membro

Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen (UEA)
Membro

Prof. Dr. Helyde Albuquerque Marinho (INPA)
Membro

Profa. Dra. Fernanda Guilhon Simplício (UFAM)
Membro

MANAUS –AMAZONAS
Junho/2019

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela força para chegar até aqui;

À minha família pela força, pelo incentivo e pela oração;

À minha noiva Déborah e ao meu filho Nicholas, pelo amor, carinho e pela paciência, por suas vidas;

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Emerson Silva Lima, por ter me proporcionado a oportunidade de aprendizado, pelo empenho, pela orientação e por acreditar no meu potencial;

Agradeço à minha primeira orientadora, Dra. Helyde de Albuquerque Marinho, por abrir as portas da pesquisa acadêmica a mim, e por sua amizade: sem o seu sim, esse momento não seria possível;

Aos colegas e amigos do Biophar, em especial Rayannne Souza, Márcia de Jesus, Elenn Aranha, Leonard Acho: sem eles, o trabalho não seria possível;

Agradeço à Dra. Ana Cristina Pinto do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Amazonas pela interpretação dos dados de RMN e Infravermelho;

Agradeço ao Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade Federal do Amazonas pelo auxílio na caracterização química;

Agradeço ao Dr. Renyer Costa e Dr. Kelson Motta do Laboratório de Química Computacional, da Universidade Federal do Amazonas, pelo auxílio nos estudo *in silico*;

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas por proporcionar as instalações prediais e laboratórios para o desenvolvimento deste projeto;

Agradeço ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudo.

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre
os ombros de gigantes”.

Issac Newton

RESUMO

O diabetes mellitus é alteração metabólica que envolve o metabolismo dos carboidratos, resultante da diminuição da resposta dos tecidos periféricos à insulina e aumento da glicemia, o que leva ao surgimento de complicações como nefropatia, neuropatia e retinopatia. Além disso, está associado à modificação da resposta imune, tendo como consequência, o aumento da produção de mediadores inflamatórios, desencadeando a inflamação crônica. Os produtos naturais são fontes de novos fármacos antidiabéticos e anti-inflamatórios, assim sendo fundamentais para o desenvolvimento de protótipos que poderão servir como base para o desenvolvimento de medicamentos no futuro. O objetivo deste trabalho foi sintetizar um novo derivado a partir da reação entre a naringenina e a aminoguanidina e elucidar suas propriedades antidiabéticas e anti-inflamatórias. A reação de condensação entre aminoguanidina e naringenina gerou um derivado caracterizado como uma hidrazina carboximidamina (DCHA), com um rendimento pós-reacional de 81%. O DCHA foi caracterizado quimicamente por meio de Espectrometria de massas, RMN e IV. O DCHA não apresentou toxicidade em fibroblastos murinos até a concentração de 50 ug/ml. O DCHA apresentou atividade antioxidante superior a naringenina e apresentou inibição satisfatória da glicação, demonstrando elevado potencial antiglicação *in vitro.* Nos ensaios *in silico,* o DHCA apresentou afinidade pela iNOS, COX e PDE4, sugerindo assim que a molécula poderia apresentar atividades anti-inflamatória e hipoglicemiante. Nos ensaios de atividade antidiabética, o DCHA diminuiu os níveis de glicêmicos de camundongos diabéticos após 21 dias de tratamento via oral (30mg/kg), exercendo, portanto, um efeito hipoglicemiante. Nos ensaios de atividade anti-inflamatória, o DCHA apresentou significativa resposta anti-inflamatória, por suprimir a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal em camundongos expostos ao LPS e tratados na dose de 1mg/kg, por inibir a ativação de macrófagos *in vitro* e por reduzir o edema em modelo de artrite induzida por zimozan em camundongos quando tratados por via oral (5 mg/kg). Os resultados obtidos demonstram que foi possível obter uma nova entidade química a partir da reação da naringerina com a aminoguanidina com atividade antioxidante, hipoglicemiante e anti-inflamatória, a qual pode ser futuramente explorada no desenvolvimento de um protótipo para tratamento de doenças crônicas como o diabetes ou outros processos inflamatórios.

Palavras-chave: Antidiabético, Anti-inflamatário, fosfodiesterase, carboximidamida

ABSTRACT

Diabetes mellitus is metabolic alteration which involves the metabolism of carbohydrates, resulting in decrease of peripheral tissues response to insulin and increased glycemia, which leads to complications such as nephropathy, neuropathy and retinopathy. In addition, it is associated with modification of the immune response, leading in increased production of inflammatory mediators, triggering chronic inflammation. Natural products are sources of new antidiabetic and anti-inflammatory drugs, thus being fundamental for the development of prototypes that may serve as a basis for drugs development in the future. The aim of this work was synthesize a new derivative from reaction between naringenin and aminoguanidine and to elucidate its anti-diabetic and anti-inflammatory properties. The condensation reaction between aminoguanidine and naringenin produced a derivative characterized as a hydrazine carboximidamide (DCHA) in a post-reaction yield of 81%. DCHA was chemically characterized by mass spectrometry, NMR and IV. The DCHA didn't exhibited toxicity in murine fibroblasts up to 50 ug / ml. The DCHA demonstrated antioxidant activity upper to naringenin and satisfactory glycation inhibition *in vitro*. In silico assays. DCHA showed affinity to iNOS, COX and PDE4, thus suggesting that molecule could exhibit anti-inflammatory and hypoglycemic activities. In the antidiabetic activity tests, DCHA decreased the glycemic levels of diabetic mice after 21 days of oral treatment (30mg / kg), thus wielding a hypoglycemic effect. In the anti-inflammatory activity assays, DCHA showed a significant anti-inflammatory response by suppressing the leukocytes migration into the peritoneal cavity in LPS-mice exposed and treated at a dose of 1mg / kg, inhibiting the activation of macrophages *in vitro* and decreasing edema in a model of zimozan-induced arthritis in mice when treated orally (5 mg / kg). The results obtained demonstrate that it was possible to obtain a new chemical entity from reaction between naringenin and aminoguanidine with antioxidative, hypoglycemic and anti - inflammatory activity which can be further explored in the development of a prototype for treatment of chronic diseases such as diabetes or other processes inflammatory drugs.

Keywords: Antidiabetic, Anti-inflammatory, phosphodiesterase, carboximidamide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do delineamento das etapas experimentais..... 42

Figura 2: Reação de condensação entre naringenina e aminoguanidina em meio ácido alcoólico, sob refluxo a 70º C por 6 h, originando o derivado DCHA. 53

Figura 3- Espectro de massas do derivado DCHA no modo positivo [M+H]+, registrado no espectrômetro tipo Íon-trap, modelo LCQ Fleet (Thermo scientific) com fonte de eletronspray (ESI) 54

Figura 4 - Espectro MS/MS do íon m/z 329 registrado no espectrômetro tipo Íon-trap, modelo LCQ Fleet (Thermo scientific) com fonte de eletronspray (ESI). 54

Figura 5 - Espectro RMN de ^{1}H do derivado DCHA obtido no equipamento modelo Bruker Ascend (500 MHz). A amostra solubilizada em DMSO deuterado (CD3)2SO. Padrão interno utilizado: tetrametilsilano (TMS). 56

Figura 6 - Espectro no infravermelho da DCHA por FTIR, utilizando espectrômetro Shimadzu, modelo IR Prestige-21. 58

Figura 7 - Viabilidade celular em fibroblastos MRC-5. O DCHA, a AMG e a NAR foram testadas em células THP-1 por 48 horas e MRC-5 por 24 horas. Dados expressos como média ± desvio padrão analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $p< 0,05$. 59

Figura 8 – Capacidade de inibição da síntese de óxido nítrico da DCHA (A), Naringenina (B), Aminoguinidina (C) e Indometacina (D) em macrófagos ativados por LPS. Dados expressos com média ± desvio padrão, analisados por Anova seguido por múltiplas comparações de Newman-Keul com grupo normal. ($p < 0,05$). 60

Figura 9 - Atividade sequestrante do DCHA frente aos radicais ABTS (A) e DPPH (B). Dados expressos como média ± desvio padrão analisados por one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. **** $p< 0,0001$ – todas as concentrações foram estatisticamente significativas. 62

Figura 10 - Capacidade inibitória da glicação pela via glioxal (A) e frutose (B) da DCHA, AMG e NAR Dados expressos como média ± desvio padrão analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. * $p< 0,05$. 63

Figura 11 - Interações da DCHA com resíduos de aminoácido da iNOS. 64

Figura 12 - Interações do DCHA com resíduos de aminoácido da cicloxigenase -1 65

Figura 13– Docking do inibidor padrão (4R)-4-(3-butoxi-4-methoxibenzil)imidazolidin-2-ona com a fosfodiesterase IVa. . (A) Pose de conformação mais favorável no sítio ativo. (B) Ligação com os resíduos de aminoácidos da fosfodiesterase IVa. 67

Figura 14 – Docking do composto semissintético DCHA com a fosfodiesterase IVa. (A) Pose de conformação mais favorável no sítio ativo. (B) Ligação com os resíduos de aminoácidos da fosfodiesterase IVa 68

Figura 15– Efeito anti-inflamatório e contagem de leucócitos totais após 6h da indução de peritonite por LPS em camundongos. Dados expressos com média ± desvio padrão, analisados por Anova seguido por múltiplas comparações de Newman-Keul com grupo normal. ($p < 0,05$). 69

Figura 16– Porcentagem de edema de pata após indução por zimosan em camundongos. Dados expressos com média ± desvio padrão, analisados por Anova seguido por múltiplas comparações de Newman-Keul com grupo normal. ($p < 0,05$) 70

Figura 17 – Avaliação de atividade hipoglicemiante (A) e antiglicante (B) em camundongos com diabetes tipo 2 induzida por estreptozotocina. Dados expressos com média ± desvio padrão, analisados por Anova seguido por múltiplas comparações de Newman-Keul com grupo normal. ($p < 0,05$) 71

Figura 18 – Modo de regulação da reposta inflamatória via inibição da PDE4. Adaptado de Li e colaboradores, 2018. 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de RMN de H e δ13Cdo derivado DCHA..... 57

Tabela 2 - Avaliação de atividade hipoglicemiante e antiglicante em camundongos com diabetes tipo 2 induzida por estreptozotocina. Dados expressos com média ± desvio padrão, analisados por Anova seguido por múltiplas comparações de Newman-Keul com grupo normal. ($p < 0,05$)..... 74

LISTA DE SIGLAS

AGE's – Produtos avançados de glicação

A10 - Grupo de Teste Tratado com 50mg/Kg da Aminoguanidina.

ABTS - 2,2´-azino-bis(ácido-etilbenzoalina-6-sulfônico

ATF-1 - Fator de transcrição dependente de cAMP

ASP – Asparagina

AcOEt – Acetato de etila

AAT – Atividade antioxidante total

AMG – Aminoguanidina

AMPK - Proteína quinase ativada por AMP

AMPc – Adenosina Monofosfatada cíclica

ATF – Fator de transcrição ativado -1

Bcl-6 - proteína de linfoma celular B -6

C - Carbono

CBP - Proteína ligada à CREB

$(CD_3)_2SO$ - DMSO deuterado

COX -1 – Ciclooxigenase -1

COX -2 – Ciclooxigenase -2

CREB - Proteína ligada a elemento responsivo a AMPc

CD40 – Cluster de diferenciação 40

CD 40L - Cluster de diferenciação 40L

DMSO – Dimetilsulfóxido

DM – Diabetes Mellitus

DPPH - 2-difenil-1-picril-hidrazila

DCM - Diclorometano

EtOH – Etanol

Epac1/2 - Fator de troca diretamente ativado por cAMP

ERK-1 - Quinase reguladora de sinal extracelular-1

GT60 - Grupo de Teste Tratado com 60 mg/Kg do DCHA.

GT30 - Grupo de Teste Tratado com 30 mg/Kg do DCHA.

GLU – Glutamina

GLUT4 – Transportador de glicose tipo 4

HCl – Ácido clorídrico

H_2CO_2 - Bicarbonato

NAR - Naringenina

$NaHCO_2$ – Bicarbonato de Sódio

TNF-α – Fator de necrose tumoral – alfa

NF-kB – Fator de nuclear kappa B

(VCAM-1) – Molécula de adesão celular vascular-1

(ICAM-1) – Molécula de adesão intracelular -1

iNOS – Óxido nítrico induzida

IkkB - Inibidor do fator nuclear beta quinase

JAK/STAT – Janus kinase/transdutores de sinais e ativadores de transcrição

JNK - JUN N-terminal quinase

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LPS – Lipossacarídeo

LEU - Leucina

MMP-3 – Metaloproteinase -3

MMP-3 – Metaloproteinase -9

MyD88 - Diferenciação de resposta mieloide primária 88

Na – Sódio

Na_2SO_4 – Sultafo de Sódio

O – Oxigênio

K – Potássio

PKA – Proteína quinase A

PKC – Proteína quinase C

PDE – Fosfodiesterase

PDE4 – Fosfodiesterase tipo 4

PDB – Protein Data Bank

PHE – Fenilalanina

PKA – Proteína quinase A

IKK – β – Inibidor da ativação do fator nuclear

N30- Grupo de Teste Tratado com 30 mg/Kg da Naringenina.

HbA1C – Hemoglobina glicada

IL-6 – Interleucina 6

TNF – α – Fator de necrose tumoral – alfa

IL-8 – Interleucina 8

IL-1b – Interleucina 1b

ILE - Isoleucina

NO – Óxido nítrico

N30- Grupo de Teste Tratado com 30 mg/Kg da Naringenina.

RAGE – Receptores de produtos avançados da glicação

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RAPG – Receptor Acoplado à proteína G

RRP – Receptor de reconhecimento padrão

Rap -1 - Ras relacionado à proteína-1

SER – Serina

S - Enxofre

TYR – Tirosina

TMS - Tetrametilsilano

TRP - Triptofano

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

VAL - Valina

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO 17
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.3 Diabetes tipo 2 25
2.3.1 Fisiopatologia da diabetes tipo 2 e a inflamação crônica 26
2.3.2 Produtos avançados da glicação (colocar uma figura do mecanismo de glicação) 28
2.4 Naringenina e suas atividades biológicas 31
2.5 Aminoguanidina e suas atividades biológicas 33
2.6 Novas abordagens para a descoberta e desenvolvimento de fármacos de fármacos anti-inflamatórios. 35
2.7 Fosfodisterase: Um novo alvo de fármacos anti-inflamatórios 38
3.0 OBJETIVOS 41
4.0 MATERIAIS E MÉTODOS 42
4.1 Delineamento experimental 42
4.2. Síntese do DCHA 43
4.3. Elucidação estrutural 43
4.4. Citotoxidade 44
4.5 Ensaios antioxidantes 45
4.5.1 Atividade sequestrante do radical DPPH 45
4.5.2. Atividade sequestrante do radical ABTS 46
4.6. Ensaio de glicação *in vitro* 46
4.7. Inibição da ativação de macrófagos por LPS 47
4.8. Ancoragem molecular 48
4.9. Testes *in vivo* 49
4.9.1 Aspectos éticos 49
4.9.2 Peritonite induzida por LPS 49
4.9.3 Teste da Artrite Aguda induzida por zimosan 50
4.9.5 Avaliação da atividade Antiglicação e Antidiabética *in vivo* 50
4.9.7 Teste de Atividade Antidiabética em animais com diabetes tipo 2 induzida . 51
4.10. Análise Estatística 52
5.0. RESULTADOS 53
5.1. Síntese do derivado DCHA 53

5.3 Atividade biológicas *in vitro* 59
5.3.1 Citotoxidade 59
5.3.2 Ensaio de ativação de macrófago por LPS 60
5.3.3 Atividade Antioxidante 61
5.3.4Atividade antiglicação 62
5.4 Ancoragem molecular 64
5.5 Atividade biológicas *in vivo* 69
5.5.1 Indução de peritonite por LPS 69
5.5.2 Ensaio de artrite por zimosan 70
5.5.3 Atividade antidiabética e antiglicação in vivo 71
6.0 DISCUSSÃO 75
7.0 CONCLUSÃO 91
8.0. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA 92

1.0 INTRODUÇÃO

Em 2018, 12 milhões de pessoas foram diagnosticadas no Brasil, significando uma prevalência 8,1%, sendo que a estimativa para os próximos seja de 42 milhões de diabéticos no país. Além disso, um estudo realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) apontou um aumento de 61,8% na taxa de incidência da doença na população no mesmo ano, e dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) indicaram uma prevalência de diabetes de aproximadamente 20% entre idosos acima de 65 anos - um contingente superior a 3,5 milhões de pessoas -, sendo a prevalência global do diabetes em pessoas entre 60 e 79 anos de 18,6%, representando 35% dos casos em adultos. (ROSSANEIS et a., 2016; FLOR & CAMPOS;FIOCRUZ, 2018; BORBA *et al*., 2019).

Segundo a OMS, o termo diabetes mellitus refere-se a um transtorno metabólico decorrente da diminuição, ausência de insulina ou insensibilidade dos tecidos periféricos à insulina, caracterizada por uma hiperglicemia crônica associada às dislipidemias e disfunções endoteliais. A hiperglicemia crônica causa danos celulares e teciduais observados nos diabéticos, além da formação dos produtos de glicação avançada, também chamados AGEs (do inglês, Advanced Glycated End-Products): uma das mais importantes alterações decorrentes da glicemia elevada persistente (FERREIRA *et al.,*2010; AMORIM *et al*., 2013).

Estas alterações metabólicas envolvem modificações no metabolismo dos carboidratos, resultante da diminuição da sensibilidade tecidual à insulina, levando à hiperglicemia, e às alterações no metabolismo dos lipídios (FERREIRA *et al.,* 2010; PORTO BARBOSA *et al.*, 2016). Além disso, ocorrem mudanças no padrão da resposta imune, tendo como consequência, a instalação de um processo inflamatório que

culminará em um círculo de exacerbação das alterações bioquímicas e aumento da produção de mediadores inflamatórios. Assim desencadeando uma inflamação crônica (PAKALA *et al.,* 1997; NATHAN, 2015; ESSER *et al.*, 2014). A compreensão da correlação entre esses processos celulares e moleculares torna-se fundamental para o entendimento do desenvolvimento de doenças crônicas (DE SOUZA & FONSECA, 2009; MIZUNO *et al.*, 2008).

O entendimento e a compreensão destes processos fisiopatológicos de doenças crônicas ajudam-nos na busca de novas entidades químicas que apresentem múltiplas propriedades farmacológicas, com capacidade para atuar em vários estágios das síndromes metabólicas e doenças inflamatórias crônicas e, por conseguinte, prevenir ou ao menos atenuar as suas comorbidades (MOLLER, 2001; MARTIN *et al.,* 2015). Segundo Pereira (2007), a obtenção de novas entidades, seja por síntese total ou por via modificação moleculares com múltiplas propriedades biológicas, sobretudo que sejam eficazes, seguros, bem como adequados para o uso clínico -, mostra-se um dos maiores desafios para indústria farmacêutica, principalmente nos que diz respeito à diabetes e suas comorbidades.

Portanto, a junção de conhecimento dos mecanismos patológicos, e seus atores, com as abordagens moleculares e computacionais eleva a probabilidade de obtenção de um composto ativo com elevado potencial farmacológico (LÖSCHER *et al*., 2002). Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram sintetizar um novo derivado através da condensação entre a naringenina e aminoguanidina, elucidar sua estrutura química, além de explorar suas características químicas e determinar suas atividades antidiabética e anti-inflamatória.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INFLAMAÇÃO E DIABETES

Nos últimos anos, mais evidências corroboram com a hipótese de que a inflamação está relacionada estreitamente com as doenças não transmissíveis crônicas como diabetes, aterosclerose e hipertensão, sendo a resistência insulínica, formação de placa de ateroma e lesões nos microvasos determinante para o desencadeamento dos processos inflamatórios presente na fisiopatologia destas doenças (ZEYDA E STULNIG, 2009). O processo inflamatório, envolvido em diversas patologias, é uma resposta do organismo frente a uma infecção ou à injúria tecidual. A sua finalidade é remover o estímulo lesivo e iniciar a recuperação tecidual (KIM, 2011).

Durante a inflamação vários sistemas bioquímicos, como o sistema complemento e de coagulação, são ativados auxiliando no estabelecimento, evolução e resolução do processo inflamatório (KAYAL *et al.*, 2010). Adicionalmente, várias substâncias solúveis são liberadas no sítio inflamatório, desencadeando dois mecanismos de defesa: uma resposta inespecífica; responsável pelas características da região inflamada (vermelhidão, edema, calor, dor e perda de função), e uma resposta imunológica, na qual há produção de anticorpos específicos contra um determinado agente agressor (WYNN, 2007). Entretanto, nem sempre a resposta inflamatória inicial é suficiente e o processo pode evoluir para um estado de inflamação crônica (COUTINHO *et al*., 2009; FERREIRA*et al.,* 2012; NAVIAUX, 2014). Os mediadores químicos são produzidos durante esse processo como histamina, metabólitos do ácido

araquidônico, fator de ativação plaquetária, bradicinina, óxido nítrico e citocinas (FILHO, A. C. *et al.*, 2005; GOMES, F. *et al.*, 2010).

Os ácidos graxos, presente na membrana celular, convertem-se em ácido araquidônico a partir da ativação da fosfolipase A_2. Por sua vez, dá origem a duas vias: a via das prostagladinas, originadas da metabolização do eicosanoide pela cicloxigenases e via dos leucotrienos catalisada pela lipoxigenase. As principais prostagladinas presente PGE_2, PGD_2, PGF_2, PGI_2 (prostaciclina) e TXA_2 que atuam na vasodilatação, na potenciação dos efeitos quimiotáticos, aumentam permeabilidade dos tecidos a células inflamatórias e a outros mediadores inflamatórios, tornando a pele hipersensível à dor (BRAS, 2008; MOURA *et al.*, 2012). Por sua vez, o leucotrieno B_4, o principal leucotrieno exerce uma potente atividade quimiotática para os leucócitos, favorecendo a migração destas células para o local inflamado. No sítio inflamatório, elas ativam os linfócitos, promovendo a desgranulação e a produção de superóxidos, causando os danos teciduais característicos da inflamação. (COUTINHO *et al.,*2009;)

Durante as reações imunes recorrentes da inflamação, citocinas são liberadas, de forma a regular a ação das células inflamatória. As citocinas pró-inflamatórias de maior relevância são: a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-a), a interleucina-8 (IL-8), a interleucina-1b (IL-1b) e as CD40 e CD40L (VOLP *et al.*, 2008; FERNÁNDEZ-BERGÉS *et al.*, 2014). Estas citocinas favorecem a aderência leucocitária ao endotélio; elevam a síntese de prostaciclina, desencadeando uma cascata de quimiocinas, que induz a quimiotaxia dos leucócitos e a liberação de óxido nítrico (HUBER e MORESCO, 2011; GOBATO *et al.*, 2014;)

O óxido nítrico (NO) é um gás produzido pelas células endoteliais do tecido lesionado que medeia ativação dos macrófagos e a agregação plaquetária, mas também

atua como modulador do recrutamento de células leucocitárias. A enzima óxido nítrico sintetase é responsável pela síntese, sendo induzida por citocinas e lipopolissacarídeos no endotélio e na musculatura lisa vascular, e não é regulada por cálcio. A produção de grandes quantidades de NO exerce um efeito citostático pela inibição de enzimas contendo ferro e pela fragmentação de DNA em parasitas e células tumorais, assim como aumenta a permeabilidade dos tecidos (CERQUEIRA E YOSHIDA, 2002; CAROLINA *et al.*, 2010).

A permanência do agente lesivo leva à cronificação do processo inflamatório, sendo observada em concomitância à destruição e reparo tecidual. Na inflamação crônica o tecido apresenta caracteristicamente um infiltrado constituído por células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sinais de angiogênese e fibrose (KOTAS & MEDZHITOV, 2015). Após a síntese dos mediadores inflamatórios, há dilatação dos vasos, decréscimo da velocidade do fluxo sanguíneo, aumento da quantidade de leucocitose e as células endoteliais ativadas expressam moléculas de superfície capazes de se ligar aos leucócitos (MESQUITA JR *et al*., 2008)

De modo geral, as células endoteliais são adaptadas a expressar altos níveis de moléculas de adesão como ICAM-1 e molécula de adesão da célula vascular - 1 (VCAM-1). (BALBINO *et al.,* 2005) A expressão dessas moléculas é resultado do processo de ativação do endotélio que ocorre em condições de lesão tecidual, na presença de subprodutos de microrganismos (lipopolissacárideos - LPS) ou mediante contato com fatores provenientes da resposta inflamatória como componentes das cascatas do complemento, coagulação, citocinas (IL-1, TNF-a) e mediadores como a histamina e o leucotrieno B_4 (BATLOUNI, 2009; HAUTZ *et al.*, 2012).

2.2 Enzimas e mediadores da inflamação como alvos farmacológicos

A ação farmacológica de anti-inflamatórios não esteroides e esteroides baseia-se na inibição de enzimas e redução de liberação de mediadores inflamatórios, respectivamente. Os alvos mais clássicos destes fármacos são as cicloxigenases: enzimas responsáveis pela formação da cascata inflamatória do ácido araquidônico. A Maioria destes fármacos não apresenta uma seletividade específica a umas das ciclooxigenases; assim, inibindo ambas, com exceção dos anti-inflamatório seletivos à cicloxigenase tipo 2 (BARNES, 2013; JANAKIRAM & RAO *et al.,* 2014). Porém, a inibição das cicloxigenases traz complicações gastrintestinais e cardíacas, favorecendo o surgimento de úlceras e elevando risco de infarto. Isso se deve às prostagladinas revestirem mucosa estomacal, protegendo-a do efeito corrosivo do suco gástrico, bem como auxiliam no controle da homeostasia do sistema cardiovascular (NYMAN *et al.,*1992; CHENG, 2002).

A cicloxigenase tipo 1 (COX-1) é uma enzima constitutiva expressa em condições fisiológicas normais, e é alvo primário de anti-inflamatórios clássicos como ibuprofeno, ácido acetilsacilíco, cetoprofeno e diclofenaco, sendo utilizada como alvo padrão em pesquisa de *screening* para descoberta de novos fármacos com atividade nociceptiva e anti-inflamatória. Os fitocompostos que apresentam uma propriedade anti-inflamatória, em sua maioria, atuam de forma não seletiva a estas isoenzimas (SMITH *et al.*, 1998; BEHLING *et al.,* 2004). Contudo, procura-se por fármacos que tenham seletividade pela ciclooxigenase 2 (COX-2), por esta enzima ser expressa durante o processo inflamatório, e que, também, possam exercer uma ação gastroprotetora (VOLP *et al.*, 2008). Abdellatif e colaboradores (2016) sintetizaram duas séries de

tiazolidinonas, desenhadas para terem seletividade a COX-2. Os efeitos das tiazolidinonas apresentaram respostas anti-inflamatórias superiores anti-inflamatórios padrão com menor um efeito ulcerogênico e gastrotóxico.

Recentemente, foram encontrados alguns alcalóides β-carbolínicos inibidores seletivos da COX-2 e óxido nítrico sintetase induzida. Em macrófagos ativados por LPS e em células cancerígenas, os alcalóides β-carbolínicos e berberina diminuíram a expressão dos mediadores inflamatórios e inibem JAK/STAT3 via COX-2 havendo o decréscimo da ação deles na inflamação e inibição da metástase (LIU, X. *et al.*, 2015; NGOC *et al.*, 2016).

Parhiz e colaboradores (2015) relatam que mecanismo de ação da hesperidina não se limita à varredura dos radicais livres. Este flavonoide atua diretamente na via inflamatória supracitada, regulando níveis de mediadores anti-inflamatórios. Quanto *in vivo* e *in vitro,* houve a redução do processo inflamatório e da proliferação celular por consequência da supressão de secreção de citocinas e interleucinas. Apesar da lentidão da pesquisa de fitoterápicos na obtenção de fitocompostos que tenha uma atividade farmacológica, sem a necessidade de um sinergismo, as plantas ainda são a melhor fonte de novos fármacos (JURENKA, 2009; FURST & ZUNDORF, 2014).

O óxido nítrico está ligado com fisiopatologia da aterosclerose por contribuir na formação de radicais livres, principalmente de radicais peroxil, que por sua vez são responsáveis pela formação da placa de ateroma pela oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Em doenças degenerativas, podem-se encontrar níveis elevados de óxido nítrico; Em contrapartida, este gás possui propriedade de contribuir para eliminação de agentes patógenos e auxilia no processo de restauração do tecido lesado pelo processo inflamatório. (LI *et al.,* 2014).

A inibição do óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) pode ser uma abordagem terapêutica interessante para redução de complicações cardiovasculares e a das anormalidades na produção deste gás durante evolução fisiopatológica de doenças cardíacas (ROCHETTE *et al.*, 2013). Cao e colaboradores observaram que uma série de neoligninas inibiram seletivamente a atividade da iNOS, além de suprimir a sua transcrição no núcleo, possibilitando o seu uso como anti-inflamatórios, bem como no tratamento de doenças cardíacas (CAO *et al.*, 2015). Um composto produzido por uma alga marinha *Nannochloropsis granulata* suprimiu expressão da enzima em macrófago *in vitro* (BANSKOTA *et al.,* 2013).

2.3 Diabetes tipo 2

A diabetes tipo 2 (DM 2) caracteriza-se com uma doença metabólica multifatorial que afeta a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Constitui-se, atualmente, em grave problema de saúde pública devido à sua alta incidência, bem como por suas complicações atreladas a este transtorno metabólico como doenças renais e cardiovasculares (PÉRES *et al.,* 2006). Esta síndrome está associada à obesidade e ao acúmulo de gordura na região abdominal, por sua vez estreitamente ligada à resistência à insulina (MCLELLAN *et al.*, 2007)

A resistência à ação da insulina nos tecidos, concomitantes à elevada glicemia plasmática em jejum -, são alterações frequentes em indivíduos obesos, sendo os primeiros sinais do desenvolvimento DM 2. Nos indivíduos obesos, nos estágios iniciais da doença, as células ß pancreáticas aumentam a produção e a secreção de insulina, a fim de compensar a hiperglicemia resultante da resistência à insulina (CIPRIANI-THORNE E QUINTANILLA, 2010).

A hiperinsulinemia possui um papel importante no desenvolvimento da hipertensão arterial em indivíduos obesos e diabéticos. A elevação concentração de glicose plasmática altera a homeostase sanguínea, havendo maior reabsorção de sódio e água. Além disso, há a diminuição da atividade enzima da Na e K ATPase, o aumento do acúmulo de gorduras e o estímulo de mediadores inflamatórios (WEYER *et al.*, 1999; OZOUGWU *et al.*, 2013)

2.3.1 Fisiopatologia da diabetes tipo 2 e a inflamação crônica

O Diabetes Mellitus (DM) classifica-se em dois tipos: o DM tipo 1, caracterizado pela destruição das células β- pancreáticas e ausência de síntese e liberação de insulina endógena, e o DM tipo 2, onde há uma quadro de resistência insulínica, geralmente está associado com a obesidade. Ambos os tipos são marcados por um quadro de hiperglicemia e por um desequilíbrio metabólico em níveis celulares e sistêmico (PÉRES *et al.,* 2006; OZOUGWU *et al.*, 2013;)

Na evolução fisiopatológica da doença, principalmente na DM 2, observa-se o desequilíbrio na homeostase metabólica, acompanhado por estresse celular; desencadeando alteração na expressão de citocinas (pró e anti-inflamatórias), desequilíbrio do estado redox, originando um estresse oxidativo e alterações nos parâmetros eritrocitários. (GOMES, 2006; LUDWIG *et al.*, 2014).

A progressão da diabetes está relacionada com a elevação dos níveis plasmáticos dos lipídios, principalmente em indivíduos obesos. O grande volume de tecido adiposo contribui para resistência periférica, assim dificultando a captação de glicose das células. A inflamação crônica associada à gordura visceral, por esta ter um papel na ativação na resposta imunológica nas síndromes metabólicas, pela secreção de adipocinas inflamatórias (SHOELSON *et al.,* 2007; DE LUCA E OLEFSKY, 2008;).

A resistência à ação da insulina é uma anormalidade primária da diabetes tipo 2 que se caracteriza pela diminuição da habilidade deste hormônio em estimular a utilização da glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo (GELONEZE & TAMBASCIA, 2006). A oferta elevada de ácidos graxos livres, devido à suspensão da

lipólise, altera transporte de glicose no músculo esquelético, atuando como potente inibidor da captação da glicose (FERREIRA *et al*., 2010)

Os ácidos graxos livres podem também interferir no transporte da insulina através do endotélio capilar. A resistência à ação da insulina no fígado implica no aumento da produção hepática de glicose. Numa fase inicial, a elevação nos níveis de glicemia é compensada pelo aumento da secreção de insulina; no entanto, à medida que o processo persiste por períodos prolongados, eleva-se o efeito glicotóxico. Entende-se como efeito glicotóxico, o aumento da resistência à ação da insulina e a diminuição da função da célula beta (GELONEZE e TAMBASCIA, 2006; VASQUES *et al.*, 2008; PATARRÃO, 2014;)

A inflamação crônica, apesar de ser um fator independente ao desenvolvimento da síndrome metabólica, está relacionada com resistência insulínica e a obesidade. Em indivíduos obesos e diabéticos podemos encontrar níveis elevados de mediadores inflamatórios, havendo uma relação positiva entre os marcadores pró-inflamatórios e a resistência à insulina, independente do grau de obesidade (HU *et al.*, 2004; BÉTÉNÉ *et al.*, 2014).

Os tecidos adiposo, muscular, hepático e pancreático são considerados sítios de inflamação para infiltrados celulares, em especial os macrófagos (KING, 2008). Estas células são cruciais para produção de citocinas, incluindo TNFα, IL-6 e IL-1β e estão envolvidas na resistência periférica pela interferência da sinalização insulínica nos tecido periféricos por meio da ativação da c-JUN N-terminal quinase (JNK) e fator nuclear kappa B (NF-κB). Estes por sua vez fosforilam alguns substratos do receptor de insulina (IRS) e/ou o próprio receptor de insulina, inativando-os (HERDER *et al.,* 2013; ESSER *et al.*, 2014)

Em um contexto mais metabólico, o tecido adiposo é o responsável pela secreção de citocinas Il-6 e TNFα. A utilização de Il-6 e TNFα como biomarcadores subclínicos das alterações causadas pela obesidade, vem sendo estudada pela comparação, correlação e associação das mesmas com fatores de risco e/ou biomarcadores inflamatórios previamente estabelecidos. Neste sentido, pode ser observada uma correlação direta entre os níveis elevados de Il-6 e TNFα e o alto índice de gordura víscera com a diminuição da sensibilidade à insulina. (KAYAL *et al.*, 2010; MIRZA *et al.*, 2012).

A alta concentração de ácidos graxos circulantes produz aumento no conteúdo celular de lipídios intermediários que, juntamente com a ação de citocinas inflamatórias circulantes, causam ativação de proteínas quinases como a quinase inibidora (IKK-β) do NF-κB (e sua posterior degradação), a proteína quinase C (PKC) e a c-Jun N-terminal quinase (JNK), gerando comprometimento da cascata de sinalização insulínica e liberação/ativação do fator de transcrição nuclear NF-κB, responsável pela indução da expressão de citocinas inflamatórias, perpetuando o ciclo indefinidamente (PRADHAN *et al.*, 2001; RIDKER *et al.*, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2015).

2.3.2 Produtos avançados da glicação (colocar uma figura do mecanismo de glicação)

A hiperglicemia crônica pode levar à glicação de proteína, principalmente da hemoglobina, originando os produtos avançados da glicação (AGE's) (BARBOSA; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, 2008). Os efeitos patológicos dos produtos glicação estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e

funcionais das mais diversas estruturas biológicas (HERDER; CARSTENSEN; OUWENS, 2013). Através da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas e de interações com receptores celulares, os AGEs promovem o estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios, respectivamente. (OTT *et al.*, 2014)

A formação dos AGE's estimula a infiltração celular, com predominância de neutrófilos e macrófagos que, após o estímulo inflamatório, produzem mieloperoxidase que induzem a formação de AGE's por meio de proteínas oxidadas (HUANG *et al.*, 2013). O processo de formação dos AGE's ocorre lentamente em condições fisiológicas, a partir de reação enzimática que envolve metabólitos oxidados de açucares redutores gerados intracelularmente; os principais metabólicos são glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona (PORTO BARBOSA *et al.*, 2016).

A alta concentração de glicose intracelular é considerada atualmente o evento iniciador primário da formação de AGEs intra e extracelulares. Sob condições de hiperglicemia ou estresse oxidativo, sua concentração aumenta acentuadamente. Portanto, paciente diabéticos apresentam concentrações séricas de AGEs significativamente mais altas que os indivíduos não-diabéticos. (AHMED, 2005; BARRERA, 2012). A mensuração da hemoglobina glicosilada (HbA1C), variante de hemoglobina que carrega um produto da Amadori em sua cadeia β, reflete a ocorrência de hiperglicemias nos últimos três meses.

O mecanismo de ação dos AGE's baseia-se em três etapas: (1) modificação de estruturas intracelulares, incluindo aquelas envolvidas na transcrição gênica; (2) interação de com proteínas de matriz extracelular modificando a sinalização celular entre as moléculas da matriz e a célula; (3) modificação de proteína e lipídios que uma

vez modificados, ligando-se a receptores específicos (RAGE'S), desencadeando a produção de citocinas inflamatórias que elevam o risco de doenças vasculares (RAMASAMY *et al.*, 2005; SINGH, V. P. *et al.*, 2014; PORTO BARBOSA *et al.*, 2016).

Os AGE's intracelulares alteram a homeostase vascular, da mesma maneira a atividade dos fibroblastos e plaquetas (LAGRANHA *et al.*, 2007). Um estudo in vivo demonstrou a associação entre o acúmulo de AGEs nos tecidos dos vasos e a severidade da calcificação arterial em pacientes com insuficiência renal (KESHARI *et al.*, 2015). As proteínas que constituem a matriz extracelular são susceptíveis à formação e acúmulo dos AGE's. A glicação destes tipos de proteínas reduz a sua solubilidade e digestibilidade enzimática, além de causar anormalidades estruturais e funcionais permanentes, estabelecendo uma resistência vascular (GOLDIN *et al.*, 2006; DESOUZA &FONSECA, 2009).

A ligações cruzadas entre AGEs e o colágeno tipo I ou elastina conduz ao aumento na área da matriz extracelular, resultando aumento da rigidez da vasculatura (LUEVANO-CONTRERAS &CHAPMAN-NOVAKOFSKI, 2010). A glicação da laminina compromete a reunião de seus polímeros, diminuindo, sua interação com o colágeno tipo IV e com o proteoglicano de heparina sulfato, assim prejudicando a cicatrização dos tecidos, por exemplo (BAKRIS *et al.*, 2004).

AGEs e seus receptores (RAGE) desempenham um papel importante na patogênese do dano vascular e distúrbios cardiovasculares, especialmente em pacientes com diabetes. Esta interação ativa a transcrição de NF-kB. Subsequentemente, há elevação da expressão de molécula de adesão celular (VCAM-1), fator de crescimento

vascular endotelial (VEGF) e citocinas inflamatórias como IL-6, TNF-alfa, intensificando a resposta inflamatória e o estresse oxidativo (XIE, J. *et al.*, 2013)

Os RAGE's são diretamente responsáveis pelo comprometimento da resposta angiogênica no diabetes. O bloqueio funcional desse receptor é capaz de restaurar a resposta angiogênica suprimida. A inativação do gene para o RAGE em um modelo *in vivo* de nefropatia diabética resultou na supressão significativa das modificações renais características, evidenciando que o grau da injúria renal era proporcional à quantidade de receptores RAGE expresso (KIERDORF e FRITZ, 2013;OTT *et al.*, 2014).

2.4 Naringenina e suas atividades biológicas

Segundo a organização mundial da saúde, 80% da população mundial fazem uso de plantas medicinais no tratamento de doenças, sendo que em países em desenvolvimento, onde essa prática faz-se muito mais presente (LOPES *et al.*, 2012; KUMAR E PANDEY, 2013;). Nos últimos anos, vários estudos sobre o mecanismo de ação de compostos de origem vegetal foram realizados, e por meio desta iniciativa, tornou-se possível o entendimento de como agem no organismo, possibilitando o uso de fitocompostos como base para o desenvolvimento de novos fármacos (MIRANDA *et al.*, 2012; LALONDE *et al.*, 2007). Entre as classes fitoquímicas mais estudas encontra-se os flavonoides, devido ao seu amplo espectro de propriedades farmacológicas de interesse e foram propostas várias modificações a partir das suas estruturas bases, com a finalidade de melhorar a atividade já existente ou modificar a sua propriedade farmacológica (NOVAK *et al.*, 2008; BABU *et al.*, 2013;)

Os flavonoides são metabólitos secundários fenólicos derivados dos fenilprenoides, amplamente encontrados frutas, folhas, galhos que lhes conferem uma pigmentação que varia entre o branco ao vermelho. Vários chás e extratos de plantas amazônicas utilizadas pela população possuem elevados destes fenólicos. Basicamente, todos os flavonóides são constituídos por três anéis, onde os seus carbonos podem sofrer variações esteroquímicas como hidroxilação, hidrogenação metilação e sulfonação, proporcionando a formação de mais de quatro mil compostos flavonóides, que são agrupados em classes (WANG; WELLER, 2006; GEORGIEV *et al.,* 2014)

As principais classes de flavonoides são: antocianina, flavononas, flavonas, os flavonóis e isoflavonóides. As atividades biológicas relacionadas a eles são antibacterianas, anti-inflamatória, hipoglicêmica e antineoplásica. Em ensaios *in vivo*, estes compostos demonstram ter ação terapêutica nos sistemas imunológico, circulatório, cardiovascular e nervoso (KANG *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.,* 2012)

A naringenina é um flavonoide pertencente à classe das flavononas, presente em frutas cítricas. As atividades biológicas referentes a esta flavonona, já descritas, são: anticancer e antiaterogênico. Este flavonoide mostrou capacidade de reduzir os níveis plasmáticos de glicose, lipídios, além de restabelecer a sensibilidade à insulina de células dos tecidos periféricos. (MULVIHILL *et al.*, 2009, 2010; ASSINI *et al.*, 2015). Em estudo realizado em ratos hiperglicêmicos, a naringenina reduziu os efeitos nocivos da resistência insulínica, havendo a supressão da expressão NF-kB, modulação negativa da produção de citocinas inflamatórias de outros mediadores inflamatórios (REN *et al.*, 2016).

Fan e colaboradores (2017) demonstram que a flavonona exerceu um potente efeito anti-inflamatório e antioxidante, diminuindo as concentrações de malondialdeido

– um produto da lipoperoxidação, e também reduziu a concentração de NF-kB, consequentemente a quantidade de infiltrado celular em modelo de artrite induzida em ratos. Além disso, houve o decréscimo da expressão de metaloproteinase (MMP-3 e MMP-9), reduzindo a degradação de matriz extracelular (FAN, R. *et al.*, 2017). Manchope e colaboradores (2016) atribuíram da atividade anti-inflamatória dos flavonoides a sua capacidade induz ativação do Fator de nuclear (NF-kB) que desencadeia uma resposta antioxidante e anti-inflamatória através expressão heme oxiganase-1, bem como inibi o recrutamento de macrófagos e neutrófilo. A naringenina possui uma possível propriedade analgésica através dos canais iônicos voltagem-dependente impedindo a despolarização e a sensibilização neuronal (MANCHOPE *et al*., 2017).

2.5 Aminoguanidina e suas atividades biológicas

A aminoguanidina (AMG) é um fármaco sintetizado há mais de 100 anos, mediante redução da nitroguanidina, com a finalidade de ser utilizado para o tratamento da diabetes. Apesar da sua eficácia, o composto apresentou efeitos tóxicos que inviabilizava a sua utilização farmacológica. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da formação dos produtos avançados da glicação (AGE's) associados com complicações secundária da fisiopatologia da diabetes bem como contribuem indiretamente nas doenças cardiovasculares. Um segundo efeito biológico atribuído a esta hidrazina é a inibição da oxido nítrico sintase induzida, assim exercendo um efeito anti-inflamatório (FARHAD *et al.*, 2011; NILSSON, 1999).

Misko e colaboradores (1993) demonstraram que a aminoguanidina inibiu seletiva a enzima óxido nítrico síntese induzida por citocinas liberadas por macrófagos durante o processo inflamatório tecidual. Griffith e colaboradores observaram os resultados semelhantes em um modelo de indução sepse em ratos, no qual o composto reduz a concentração de citocinas e da atividade da enzima inflamatória (GRIFFITHS *et al.*, 1993; MISKO *et al.*, 1993). Em 1997, Soulis e colaboradores (1997) verificaram que aminoguanidina reduz a concentração de AGE's em ratos que apresentavam retinopatia, junto a esta atividade houve inibição da expressão da iNOS. Os tecidos dos animais tratados com o fármaco apresentavam uma aparente redução do quadro inflamatório bem como de recuperação do tecido renal (SOULIS *et al.*, 1997).

Acredita-se que produtos avançados da glicação (AGE's) contribuem para elevação dos níveis de LDL oxidados devido à indução oxidação destas proteínas via estresse oxidativo, por elas serem susceptíveis às modificações induzidas pela interação com açúcares redutores. Esta interação resulta na formação do complexo LDL-AGE, elevando o risco de aterosclerose em pacientes diabéticos. Contudo, aminoguanidina é efetiva na inibição da formação deste complexo, apresentando um potencial antiaterosclerótico, mesmo de forma indireta (RASHID *et al.,* 2007; JAIRAJPURI *et al.,* 2015).

2.6 Novas abordagens para a descoberta e desenvolvimento de fármacos de fármacos anti-inflamatórios.

Os produtos naturais são a fonte principal de novos fármacos, principalmente de anti-inflamatórios. Vários medicamentos utilizados na clínica tiveram a sua origem a partir de uma estrutura base de uma molécula de origem natural. A etnofarmacologia possui um papel fundamental para descoberta de novos fármacos, por ser o ponto de partida na investigação de bioativos candidatos a fármacos. Contudo, com o advento da química combinatória e da biologia molecular, tornou-se possível o desenvolvimento de moléculas mais específicas, com menos efeitos colaterais, com maior eficiência, mediante modificações estruturais; o que possibilita a obtenção de novos fármacos que podem ser utilizados no tratamento de doenças inflamatórias crônicas e entre outras moléstias (BUCKNER &NAVABI, 2010; HUGHES, 2010, CRAGG *et al*., 2013; 2014).

A implementação de estratégias e estudos de reconhecimento molecular em meio biológicos, aliados com os recentes avanços biotecnológicos, juntamente a estudos computacionais e genômicas, acelerou exponencialmente a descoberta de novas moléculas com atividade farmacológicas, por permitir a predição do potencial farmacológico destas novas moléculas de forma muito mais precisa – algo que não era possível somente com estudos de relação estrutura-atividade, deste modo diversificando os locais de ação e o aumentando o leque de mecanismos farmacológicos. (SCHENONE *et al*., 2013; HUANG *et al*., 2013). Entre estes avanços na busca de novos anti-inflamatórios, destaque-se o acoplamento molecular: uma ferramenta computacional que utiliza os princípios da biologia molecular e da química teórica para

predizer possíveis atividades farmacológicas de novos derivados. Este método é geralmente utilizado como um método para *screening,* auxiliando na seleção daquelas moléculas que tenha um potencial farmacológico de interesse, tornando mais eficiente a procura. Mediante utilização de algoritmos matemáticos e cálculos físico-químicos como energia de ligação, afinidade e conformação do protótipo ao sítio ativo, é possível determinar a eficiência farmacológica da molécula frente ao seu alvo biológico (WANG *et al.,* 2007; MORRIS E LIM-WILBY, 2008).

Com o conhecimento da estrutura molecular do alvo e/ou ligante, é possível planejar e desenvolver fármacos mediante o processo de complementaridade, adequando as propriedades estruturais para o reconhecimento molecular e aumento da afinidade pelo receptor farmacológico (FRIESNER *et al*., 2004; FUKUNISHI *et al*., 2017). Essa estratégia é chamada de Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor (PBER). Utiliza-se esta abordagem quando há alvos terapêuticos com estrutura 3D disponível em bancos de dados de proteínas. (FRIESNER *et al.*, 2004; BERMAN *et al.*, 2007). Por meio de informações baseadas em dados cristalográficos são realizadas simulações do acoplamento da molécula com o sítio de ligação da proteína/enzima alvo (LIE *et al.*, 2011)

Para se iniciar o acoplamento, faz-se necessário um estudo de análise conformacional da molécula para a obtenção de uma geometria confiável para os estudos de interação com alvo biológico proposto, garantindo a validade do ensaio. Para gerar as estruturas são utilizados bancos de dados cristalográficos compilados em bibliotecas de fragmentos com geometria padrão e conversão de estruturas 2D em 3D via programas específicos, o último é muito mais acessível para indivíduos leigos. As

estruturas geradas devem ser “otimizadas” a para obtenção fidedigna do menor estado energético possível (DIAS E AZEVEDO 2008; PAGADALA *et al*, 2017).

Quando a estrutura macromolecular não é conhecida, o planejamento baseia-se nas características funcionais dos ligantes endógenos envolvidos no mecanismo farmacológico ou fisiopatológico em investigação, uma estratégia conhecida como Planejamento Baseado em Ligante (PBL)(TANRIKULU E SCHNEIDER, 2008; HOPKINS *et al.*, 2014). Porém, atualmente, estudos mais complexos têm sido realizados com a finalidade de suprir erros provenientes de técnicas simplificadas, com utilização de proteínas flexíveis e moléculas de água consideradas estruturais (KROEMER, 2007; MENG *et al.*, 2011a). As técnicas de ancoramento e modelagem se tornaram ferramentas essenciais para a descoberta de novos fármacos por sua versatilidade, reduzindo o tempo de rastreio de fármacos, além de diminui gastos em estudos de caracterização farmacológica de candidatos a fármacos: uma vez que os mesmo indicam quais atividades biológicas de maior relevância a serem exploradas, direcionado a escolha de ensaios *in vitro* e *in vivo* mais adequados para avaliação e determinação atividades farmacológicas de moléculas candidatas a fármaco (NAMBA *et al.,*2008; GUIDO *et al.,* 2010).

Outra ferramenta bastante utilizada para correção de erros denomina-se Dinâmica Molecular. Uma ferramenta versátil para o estudo de moléculas biologicamente ativas que fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, dos fatores individuais que compõem o sistema como pressão, energia interna, volume, temperatura, entropia, energia livre (ALONSO *et al.,*2006; DURRANT E MCCAMMON, 2011).

2.7 Fosfodisterase: Um novo alvo de fármacos anti-inflamatórios

O tratamento de doenças inflamatórias crônicas, incluindo asma, dermatites, artrite reumatoide, envolve a utilização de anti-inflamatórios glicocorticoides, cujo mecanismo farmacológico baseia-se na supressão de múltiplos genes pró-inflamatórios que são ativados em doenças inflamatórias crônicas, através da ligação de receptores de glicocorticóides, reduzindo a concentração de citocinas pró-inflamatórias e migração leucocitária, bem como o uso de anti-inflamatórios não corticóides, que inibem ação das ciclooxigenases (BARNES, 2006; TORRES *et al*, 2012). Porém, devem-se ser destacados os efeitos relacionados à ação destes fármacos como a elevação da concentração de LDL colesterol; a propensão ao desenvolvimento da síndrome de Cushing e aumento acentuado do peso; distúrbio na captação da glicose pelos tecidos periféricos (aumento da glicemia), osteoporose e outros efeitos mais raros como hirsutismo (TORRES *et al*., 2012; ERRANTE *et al*., 2015).Ademais, há uma relação indireta destes medicamentos com hipercortisolismo. Este distúrbio hormonal resulta na exacerbação do estado hiperglicêmico em pacientes diabéticos (CAMPOS *et al*., 2003; ROSS &MARAIS, 2014; ORAY *et al*., 2016). Os fármacos inibidores da cicloxigenase elevam o risco de complicações cardíacas, o uso contínuo de anti-inflamatórios da classe dos coxibe aumenta o risco de eventos adversos cardiovasculares e tromboembólicos graves por reduzirem o relaxamento dos músculos cardíaco promovido pela prostaciclina, e por não inibirem a ação da tromboxano A_2 (TXA_2). Junto a isso, há a ulceração da mucosa estomacal devido à inibição da síntese de prostaglidinas responsáveis pela proteção deste tecido (PATRONO *et al*., 2016; MESITSKAYA *et al*., 2018; SILVA *et al*., 2019).

A atuação direta na modulação do processo inflamatório por intermédio da neutralização da liberação de citocinas pró-inflamatórias provou-se eficiente no tratamento de condições inflamatórias crônicas como a artrite reumatoide. No entanto, diferentes dos glicocorticoides, a modulação ocorre via transdução de sinal (DE JONGE & ULLOA, 2007; SAGALA *et al*., 2016). Fullerton e Gilroy (2016) destacam que supressão da síntese de citocinas, inibição mobilização de granulocitos e a estimulação da mudança de macrófagos para sua versão anti-inflamatória, a M2, serão locais de ação de futuros fármacos anti-inflamatórios. Segundo os autores, teoricamente, as terapias que foquem na fase resolutiva inflamação serão mais eficazes que as convencionais, por atuarem na recuperação e reestabelecimento das funções normais do tecido lesado. Neste sentido, as fosfodiesterase é um dos alvos mais promissores para futuros anti-inflamatórios, por esta enzima modular a liberação de citocinas e influenciar indiretamente na ação de células participantes do processo inflamatório, semelhantes aos glicocorticoides (LI *et al*., 2018;).

As fosfodiestareses (PDE's) são enzimas responsáveis pela hidrólise de segundos mensageiros AMPc e GMPc em seus substratos 5-adenosina monofosfato e 5-guanidina monofosfato, resultando no cancelamento da transdução do sinal celular. Existem 11 tipos descritos de fosfodiesterases com propriedades farmacológicas diferentes e de variada distribuição tecidual. Estas enzimas atuam indiretamente na modulação da sinalização de via intercelulares - em particular o processo inflamatório, modulado pela fosfodiestarese Tipo 4 (PDE4) (De AZEVEDO &KUMMERLE, 2014; AHMAED *et al*., 2015). A PDE4 encontra-se presente células do sistema imunológico como macrófagos, neutrófilos, linfócitos T, basófilos e eosinófilos. Esta isoenzima está envolvida na modulação dos níveis de AMPc presentes nas células inflamatórias,

interferindo em suas atividades celulares como liberação de citocinas, por exemplo (PEREZ-ASO *et al*.,2015). Acredita-se que a inibição da atividade catalítica da PDE4 pode interferir na atuação das células imunitárias. Por estas células terem modificado o seu modo de ação pela elevação da atividade de segundos mensageiros, as seguintes ações desencadeadas são: redução da liberação de citocinas inflamatórias como IL-1B, TNFα, IL-2 e IL-6 diminuição da infiltração leucocitária, expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4 (ESSAYAN, 2001; CAMPOS *et al*, 2003; RAKER *et al*., 2016).

Apesar das PDE's serem alvos há tempos não utilizados, o seu ressurgimento abriu novos horizontes para o desenvolvimento de novos fármacos direcionados para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, bem como para exploração de novas abordagens de aplicação dos inibidores de PDE's (DE AZEVEDO E KUMMERLE, 2014). Em vista deste cenário, a PDE's apresentam-se como alvo alternativo que atendem as perspectivas estratégicas e abordagens para o tratamento de doenças inflamatórias, além de abrir uma novas possibilidades para desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios (KRIER *et al*., 2005; AHMED *et al*., 2015).

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Obter e avaliar o potencial anti-inflamatório e antidiabético de uma nova carboximidamida.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar um novo derivado semissintético a partir da condensação entre a naringenina e a aminoguanidina.

- ✓ Caracterizar quimicamente o novo derivado.

- ✓ Avaliar a atividade antioxidante, antiglicante e o efeito anti-inflamatório *in vitro* e *in silico* desta nova molécula.

- ✓ Determinar as atividades antidiabética e anti-inflamatória mediante modelos *in vivo*.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O projeto foi dividido em quatros etapas: (1) caracterização química, na qual foram realizadas as análises espectrométricas; (2) ensaios *in vitro*, o qual se verificou atividade antioxidante e antiglicação; (3) ensaios *in sílico* com a finalidade de avaliar afinidade molecular com receptores e enzimas; (4) ensaios *in vivo*, onde ocorreu a avaliação das atividades anti-inflamatórias e antidiabéticas conforme a figura abaixo (Figura 1).

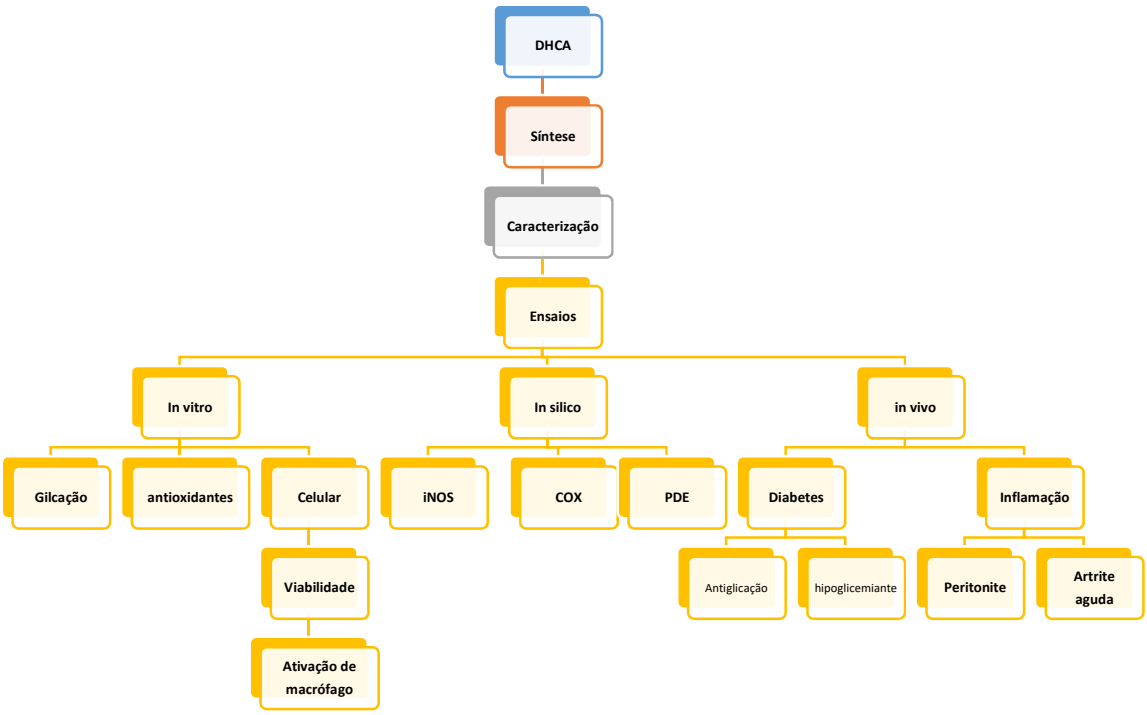

Figura 1 - Fluxograma do delineamento das etapas experimentais

4.2. Síntese do DCHA

Inicialmente, pesou-se a naringerina (50,8 mg; 0,1866 mmol) em um balão de reação de 50 mL e adicionou-se aminoguanidina (51,5 mg; 0,4659 mmol) em 10 mL de EtOH, HCl concentrado (1 mL) e água destilada (1 mL), deixou-se sob agitação e aquecimento (70 °C) por 6h. A formação do produto foi acompanhado por CCD, usando AcOEt: Acetona: H_2CO_2 (4:1:0,5). A solução reacional foi colocada em um becker para secagem em uma capela e, após este processo, o resíduo obtido foi dissolvido com água destilada (20 mL) e extraído com AcOEt (3x 20 mL). A solução AcOEt foi lavada com $NaHCO_3$ (2x 20 mL) e extraída novamente com AcOEt (3x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada (20 mL); logo após, foi adicionado Na_2SO_4 anidro para retirada da água. Em seguida a fase orgênica foi filtrada em papel de filtro, concentrado em rotavapor. O resíduo seco, obtido de uma secagem prévia, foi redissolvido em EtOH (10 mL) adicionado de HCl 1M (10 mL) e deixado em agitação por 1h. A mistura foi evaporada e o resíduo foi recristalizado em EtOH para precipitação do produto da reação na forma de sal de HCl. O derivado DCHA tem peso molecular igual a 328,33 g/mol e $C_{16}H_{16}N_4O_4$ (Adaptado de FUKUMOTO, 2002).

4.3. Elucidação estrutural

A identificação da estrutura química do DCHA foi realizada por espectrometria de massas sequencial (ESI-MS/MS-MS) e por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono nos Laboratórios de espectrometria de massas e RMN da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas. A espectroscopia no infravermelho

por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro do tipo Íon-trap, modo positivo, modelo LCQ Fleet (Thermo scientific), operando com fonte de elétron spray (ESI). Já os espectros de RMN de $_1H$ e C^{13} foram obtidos em um equipamento modelo Bruker Ascend (500 MHz). A amostra foi solubilizada em DMSO deuterado $(CD_3)_2SO$ e o tetrametilsilano (TMS) foram utilizados como padrão de referência interna. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz). Os espectros do infravermelho foram registrados em espectrômetro Shimadzu, modelo IR Prestige-21. Os espectros foram obtidos com resolução espectral de 4 cm-1 e 20 varreduras da região de 400 a 4000 cm^1.

4.4. Citotoxidade

A citotoxicidade das substâncias foi avaliada na linhagem MRC-5 pelo método do Alamar Blue. O Alamar Blue também conhecido como resazurina, em seu estado oxidado, é azul não fluorescente. Em células viáveis, as enzimas presentes no interior das mitocôndrias reduzem a resazurina em resofurina de cor rosa e fluorescente (RAMPERSAD, 2012). Neste ensaio as células foram plaqueadas na densidade de 5 x 10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com as substâncias nas concentrações de 12.5, 50, 200, 800 e 1000 μg/mL. Como controle positivo de morte, foi utilizada a doxorrubicina (10 μg/mL); como controle negativo, o meio de cultura e o diluente DMSO (0,1% v/v). Após o período de tratamento 24 horas, foram adicionados 10 μL de resazurina 0,4%

(diluída 1:20). Posterior ao tempo de metabolização da resazurina de 3 horas, foi realizada a leitura da fluorescência em espectrofotômetro com excitação em 570 nm e emissão em 610 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada com base no controle negativo (NAKAYAMA *et al*. 1997).

4.5 Ensaios antioxidantes

4.5.1 Atividade sequestrante do radical DPPH

O ensaio foi realizado segundo a metodologia utilizada por Marxen e colaboradores (2007), com modificações. Primeiramente, para a realização do teste, calibrou-se a absorbância do DPPH (2-difenil-1-picril-hidrazila) entre 0,8-1,00 ± 0,1 nm. Em seguida, 30 µL das substâncias foram adicionados juntamente com 170 µL de DPPH em microplacas de 96 poços. A quercetina (50 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Em seguida, a microplaca foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Por fim, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro (DTX800, Beckman Coulter) no comprimento de onde de 517 nm. Os cálculos de inibição foram realizados por meio da seguinte fórmula:

% inibição DPPH = 100 – (Abs da amostra/média controle) * 100

4.5.2. Atividade sequestrante do radical ABTS

O ensaio foi realizado segundo metodologia adaptada de Jemli e colaboradores (2016) com modificações. O 2,2´-azino-bis(ácido-etilbenzoalina-6-sulfônico) (ABTS) foi, primeiramente, diluído em água destilada e oxidado com persulfato de potássio a 5 mM por 24 horas, no escuro, em temperatura ambiente. Então, 270 µL do ABTS foram adicionados a 30 µL das substâncias. A quercetina (50 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Em seguida, a microplaca foi incubada em temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Posteriormente, a leitura da análise foi realizada em espectrofotômetro (modelo DTX800, Beckman Coulter) a 630 nm. Os cálculos de inibição foram realizados por meio da seguinte fórmula:

% inibição ABTS = 100 – (Abs da amostra/média controle) * 100

4.6. Ensaio de glicação *in vitro*

O ensaio foi realizado segundo as metodologias descritas por Malakul e Pengnet (2017) com modificações. Primeiramente, foi preparada uma solução de Tampão Fosfato a 200 mM, pH 7,4 com conservante Azida Sódica 3mM. Posteriormente foram obtidas as soluções de do Glioxal a 30 mM, da Frutose a 0,5M e da albumina a 10 mg/mL em Tampão Fosfato na concentração e pH supracitados. Posteriormente, em uma placa escura de 96 poços, foram adicionados em cada poço 135 µL de frutose ou de glioxal, 135 µL de proteína e 30 µL das substâncias.

Em seguida foi realizada a leitura por fluorescência, em espectrofotômetro (DTX800, Beckman Coulter), com excitação em 365nm e emissão em 465nm que correspondeu ao dia 0 da reação. Após a leitura, a placa foi vedada e incubada na estufa a 37 ºC por 24h para a reação com glioxal, e 5 dias para a reação com frutose, quando a leitura foi realizada novamente para avaliar a inibição da reação pela amostra. Como controle positivo foi utilizado a quercetina. Em seguida, foram efetuados os cálculos por meio da seguinte fórmula:

% Inibição AGEs = 100 - (luminescência da amostra / luminescência do controle) x 100

4.7. Inibição da ativação de macrófagos por LPS

As células de macrófago murino J774A.1 foram plaqueadas na concentração de $1x10^6$ células/poço em placa de 96 poços. Após o tempo de incubação de 24 h das células a 37ºC em atmosfera de 5% de CO_2, o meio foi retirado e adicionado meio RPMI suplementado com 1% de SFB com volume final de 100 µL/poço, a seguir as células foram estimuladas com 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) extraído de *Escherichia coli* sorotipo 450111:B4 (Sigma-Aldrich, Alemanhã) e tratadas com os compostos nas concentrações de 2.5, 5, 10 e 20 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado meio RPMI 1640 enriquecido com LPS e como controle negativo meio RPMI1640 sem LPS. As células foram incubadas por 24 h a 37ºC, 5% de CO_2, e o sobrenadante celular foi coletado para a análise de óxido nítrico $NO^{\cdot}$ e alíquotas foram congeladas a -20ºC para posterior análise das citocinas (GUSMAN *et al*., 2015)

4.8. Ancoragem molecular

O procedimento de ancoragem molecular foi realizado com as estruturas cristalográficas das enzimas ciclooxigenase-1 (COX-1), óxido nítrico sintese (NOS), fosfodiestarese (PDE4) obtidas no banco de proteína Protein Data Bank (ORLANDO & MALKOWSKI, 2016). As estruturas tridimensionais (3D) dos ligantes padrões, naringenina e aminoguanidina foram obtidas a partir do banco de dados ZINC (IRWIN *et al*., 2012) e a estrutura 3D do derivado DCHA foi gerada através do software Marvin Sketch e Chemdraw professional da PerkinElmer (CHEMAXON, 2017).

A otimização geométrica de todos os ligantes fora feita através do método semi-empírico PM7 (STEWART, 2013) disponível no software MOPAC2016 (STEWART, 2016). A preparação do receptor e dos ligantes foi alcançada por meio do software Autodock tools 1.5.6 (MORRIS *et al*., 2009), sendo o grid box definido em relação ao sítio ativo ocupado pelo ligante presente no sítio ativo das enzimas utilizada neste ensaio. O procedimento de ancoragem foi realizado através do software Autodock Vina (TROTT & OLSON, 2010). Os resultados foram processados através do software Discovery Studio (Discovery Studio Visualizer, 2016).

4.9. Testes *in vivo*

4.9.1 Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa envolveu a utilização de animais de laboratório e foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFAM. Após solicitação, a mesma foi analisada e aprovada sob o **N. 026/2019**.

4.9.2 Peritonite induzida por LPS

A inflamação aguda em camundongos foi realizada por meio da injeção intraperitoneal de LPS bacteriano dentro da cavidade peritoneal dos camundongos (LPS 500ng/cavidade/0,2mL), conforme metodologia de Marques e colaboradores (2003) com modificações. Inicialmente, os camundongos foram distribuídos em 6 grupos (n=4 animais/grupo) para o pré-tratamento oral com dexametasona, naringenina, DCHA e aminoguanidina, em uma dose 1 mg/Kg. Após uma hora de tratamento, foi administrado o indutor da inflamação LPS (500ng/0,2mL) na cavidade intraperitoneal nos grupos teste e no grupo controle negativo administrou-se salina. Depois quatro horas, os animais foram eutanasiados com cetamina (180mg/kg) e xilazina (30mg/kg), administrado por via intraperitoneal. Decorrido este procedimento, a cavidade peritoneal foi lavada com 10 mL de tampão PBS gelado (10mM, pH 7,4) contendo EDTA (3mM). A cavidade abdominal foi gentilmente massageada 3 vezes e a suspensão celular foi aspirada com seringa de 5 mL. As alíquotas do fluido abdominal foram colocadas em tubos de eppendorfs e sucessivamente coradas com solução de

Turk para contagem de leucócitos totais em câmara de Newbauer (MARQUES *et al*., 2016).

4.9.3 Teste da Artrite Aguda induzida por zimosan

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia estabelecida por Rosas e colaboradores (2015) com modificações. O experimento foi realizado utilizando camundongos machos com 6 semanas de idade pesando entre (28-32g) obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Os animais foram separados e tratados em grupos (n=4 camundongos/grupo) com os compostos DCHA, naringenina, aminoguanidina (5mg/kg), controle positivo (diclofenaco 100mg/kg). Após de 60 minutos, foi administrado 10µL da solução de Zimosan (10µg/mL de salina) na articulação do joelho dos camundongos (100 ng/cavidade articular). Logo depois dos procedimentos, a patas dos animais foram aferidas com um paquímetro digital nos tempos 0, 1 e 6 horas. Ao termino do experimento, foi calculado a porcentagem de edema em relação à pata controle dos animais.

4.9.5 Avaliação da atividade Antiglicação e Antidiabética *in vivo*

Foram utilizados para este estudo camundongos swiss albinos, machos, 6 semanas de idade, pesando 20-25 gramas, obtidos do Biotério Central da UFAM; Manaus. Eles foram mantidos sobre condições padrão de laboratório (Ciclo claro-escuro

de 12 h, temperatura de 21 ± 2 ° C e umidade relativa de 35% a 60%). Eles foram alimentados com rações e água já padronizados pela instituição.

Para o Teste de Atividade Hipoglicemiante Crônica foram divididos aleatoriamente em sete animais diabéticos por grupo. Os grupos foram divididos da seguinte maneira: grupo controle hiperglicêmico não tratado (GCNT); grupo controle normoglicêmico (GCN); grupo padrão (GP) e grupos testes (GT).

4.9.7 Teste de Atividade Antidiabética em animais com diabetes tipo 2 induzida

Os camundongos machos normais foram divididos em seis grupos de 4 animais (grupos descritos anteriormente), que ficaram em jejum por 12 horas (durante o período noturno). Após o jejum, foi realizada a primeira coleta de sangue pela veia caudal de todos os camundongos para o doseamento basal da glicose. Logo após, foi realizada a indução da diabetes tipo 2 por administração intraperitoneal de Nicotinamida da Sigma com código N6005-1G (180 mg/kg; diluído em solução salina) e estreptozotocina da SIGMA com código S0130-1G (160mg/kg; diluído em tampão citrato 0,1M-pH4,5) com uma diferença de 15 minutos. Após a indução, os camundongos ingeriram uma solução de glicose a 5% durante 12 horas. Os camundongos que apresentaram glicemia em jejum maior que 200mg/dL, após 72h da indução, foram considerados diabéticos e utilizados para o teste. A partir desta confirmação, o tratamento foi iniciado em todos os animais do grupo de tratamento. Durante os 21 dias do experimento, a substâncias foram administradas diariamente por via oral na seguinte maneira: no grupo GCNT e GCN o veículo (3% de Koliforem e soro fisiológico-200µL, respectivamente), o grupo padrão (GP) recebeu 300 mg/kg de Metformina e os grupos testes (GT 60, GT30, N30 e

A10) receberam o DCHA, naringenina, aminoguanidina, nas doses 60, 30, 30 e 10mg/kg, respectivamente. Ao término do período de tratamento, os animais foram eutanasiados mediante administração intraperitoneal de Cetamina e Xilazina (100 mg/kg de peso) para a coleta para determinação de glicose sanguínea, índice de glicação e análises bioquímicas (ARYA *et al.*, 2012)

4.10. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± D.P.M. (desvio padrão da média) e as médias foram analisadas pelo software GraphPad Prism® 6.0, por meio da análise de variância ANOVA one-way, seguidas dos testes de Tukey ou Dunnett de comparações múltiplas com nível de significância de $p < 0,05$.

5.0. RESULTADOS

5.1. Síntese do derivado DCHA

A reação ocorrida entre a naringenina e aminoguanidina foi de condensação seguida de uma desidratação, obtendo-se uma molécula de aspecto cristalino com coloração acinzentada, caracterizada como (2E)-2-[5,7-diidroxi-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ilideno) hidrazina-1-carboximidamina com rendimento pós-reacional de aproximadamente de 81%. (Figura 2)

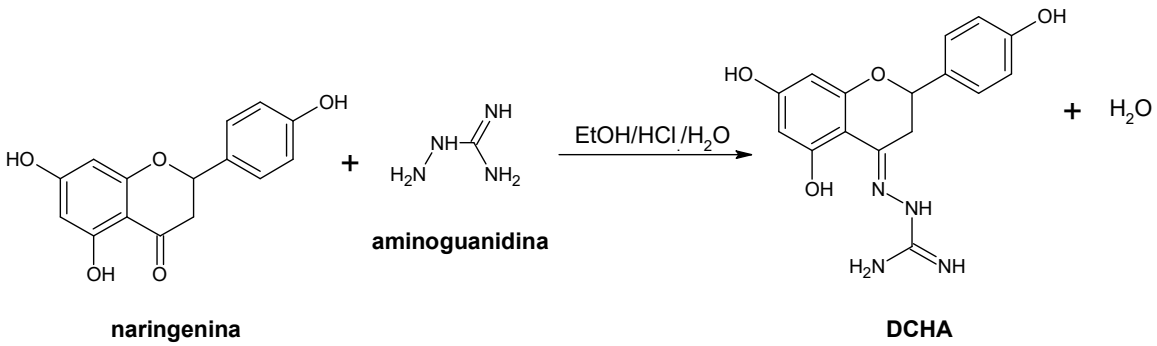

Figura 2: Reação de condensação entre naringenina e aminoguanidina em meio ácido alcoólico, sob refluxo a 70º C por 6 h, originando o derivado DCHA.

5.2 Caracterização química do DCHA

A massa molecular estimada do derivado DCHA foi de 328 g/mol. A análise por espectrometria de massas apresentou como pico base de 329 g/mol, confirmando a presença do produto esperado, já que no modo positivo há um acréscimo de um próton na estrutura analisada. (Figura 3)

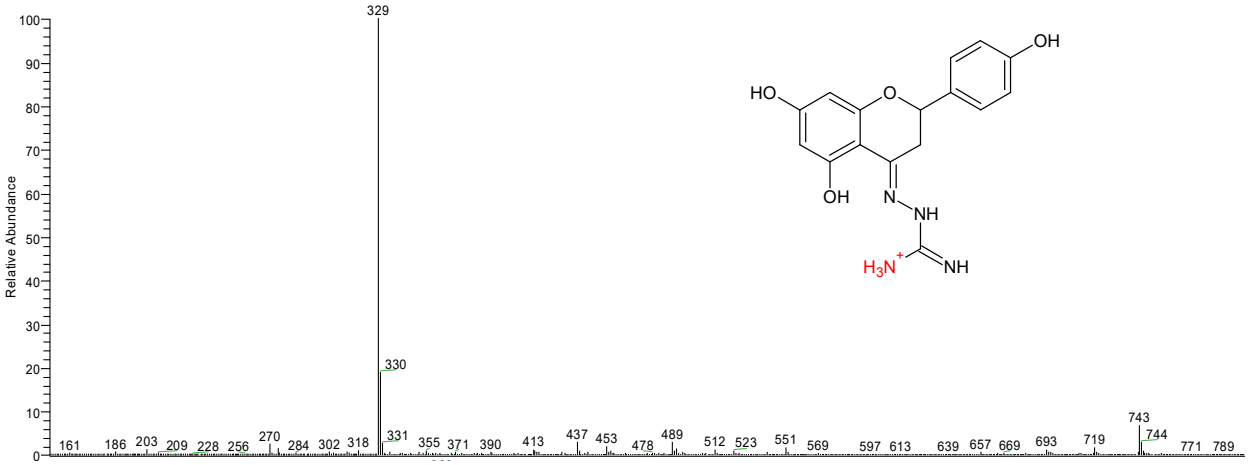

Figura 3- Espectro de massas do derivado DCHA no modo positivo [M+H]+, registrado no espectrômetro tipo Íon-trap, modelo LCQ Fleet (Thermo scientific) com fonte de eletronspray (ESI)

O espectro de fragmentação (MS/MS) do íon de m/z 329 (Fig. 4) revelou a presença dos fragmentos de massa/carga com m/z 312 e m/z 270, resultantes das perdas dos grupos amina e guanidina da aminoguanidina, evidenciando a ocorrência da reação entre a naringenina e aminoguanidina.

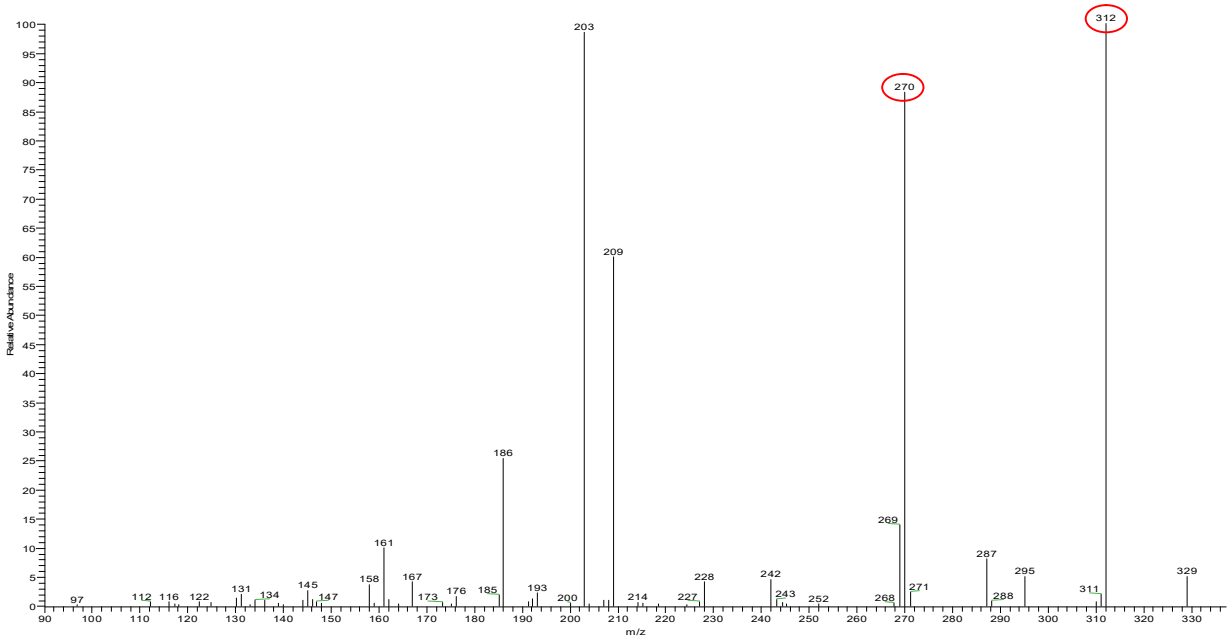

Figura 4 - Espectro MS/MS do íon m/z 329 registrado no espectrômetro tipo Íon-trap, modelo LCQ Fleet (Thermo scientific) com fonte de eletronspray (ESI).

O íon 312 m/z trata-se de uma imina que possui características eletrônicas similares às carbonilas, demonstrando que houve a reação entre amina da guanina e o grupo cetona da naringenina (MA *et al.*, 1997; LLORENT-MARTINEZ *et al.*, 2015; SPÍNOLA *et al.*, 2016).

O fragmento de 209 m/z caracteriza a perda do grupo 4-etilfenol do flavonoide. Esse de tipo de fragmentação é utilizado para identificação de compostos fenólicos presente em extrato ricos destes flavonoides (YANG *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2017). Já a presença do fragmento de m/z 203 refere-se à perda do grupo 1,3,5-trihidroxibenzeno da naringenina. Ye e colaboradores observaram fragmentação similar caracterização dos flavonoides da *Millettia nítida*, cujo espectrograma correspondia a uma catequina. As isoflavonas e flavononas podem ser identificadas e elucidas mediante este método de fragmentação (CHENG *et al.*, 2005; YE, M. *et al.*, 2012; FAN *et al.*, 2013).

O espectro de RMN de ^{1}H do derivado DCHA apresentou perfil com sinais semelhantes aos encontrados na naringerina e aminoguanidina. Foram observados singletos em δ10,77 (NH2), para H-3, um singleto em δ5,92 (2,4 Hz) e δ5,95 ppm (2,4 Hz) referente aos hidrogênios H-6 e H-8. Sinais dupleto em δ5,10 ppm (12 e 3,2 Hz),δ7,32 (8,8 Hz) e δ6,81 ppm (8,8 Hz) para H-2 e para os hidrogênios H-2', H-6', H-3' e H-5' do anel B. Por fim, sinais multipletos em δ2,94 (16,6 e 12 Hz) e 3,17 ppm (16,6 e 3,2 Hz). O espectro de RMN de ^{13}C (DCM; 100 MHz) mostra os deslocamentos de carbonos com sinais atribuídos aos carbonos do anel aromático A e C da naringenina com deslocamentos em δ 94,58 e 95,77 ppm para os carbonos metínicos, do anel A e para carbonos metínicos em δ 126,69 e 114,18 ppm para carbonos C-2' e 6' e C-3' e 5' do anel C. Além disso, observou-se sinal em δ 156,88 referente à guanidila (Tabela 1).

Por comparação desses sinais com o espectro de DEPT (Tabela 1), foi possível confirmar a multiplicidade dos carbonos da cadeia (FUKUMOTO *et al.*, 2002; ALMEIDA, M. C. S. DE *et al.*, 2010; ANDRADE, DE *et al.*, 2010;).

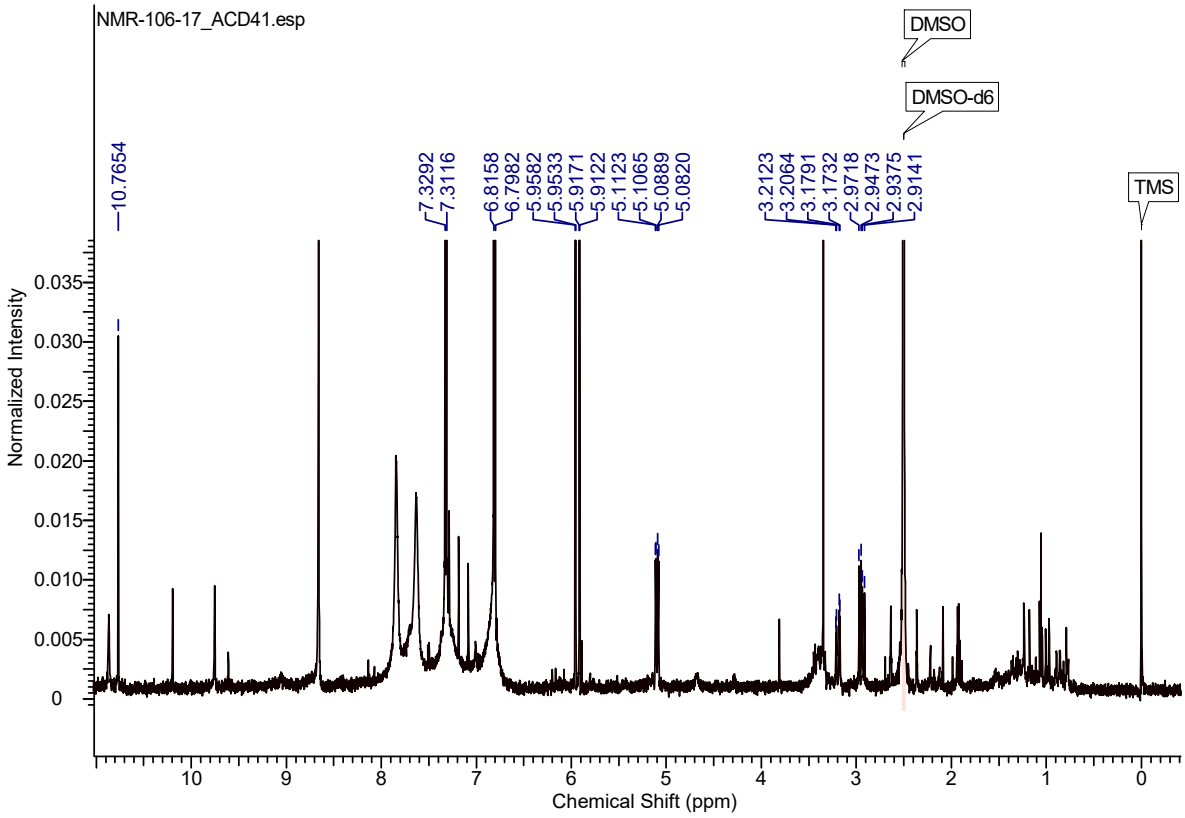

Figura 5 - Espectro RMN de ¹H do derivado DCHA obtido no equipamento modelo Bruker Ascend (500 MHz). A amostra solubilizada em DMSO deuterado (CD3)2SO. Padrão interno utilizado: tetrametilsilano (TMS).
:

Tabela 1 - Dados de RMN de H e δ13Cdo derivado DCHA.

DCHA					
***n°*^{13}C**	***δ*^{1}H *(ppm)***	***δ*^{1}HRef. 1,2**	***δ*^{13}C**	***δ*^{13}CRef. 1**	***Mult.***
1	-	-	-	-	**-**
2	5,05dd	5,24dd	75,55	80,5	**CH**
3	2,92dd; 3,21dd	2,99dd; 3,03dd	46,3	44,05	**CH_2**
4	-	-	195,19	197,81	**C**
5	-	-	159,29	165,47	**C**
6	5,96s	5,81s	94,58	96,21	**CH**
7	-	-	159,77	168,39	**C**
8	6,00s	5,81s	95,77	97,09	**CH**
9	-	-	162,09	164,9	**C**
10	-	-	97,03	103,37	**C**
11	-	-	156,88	-	**C**
1'	-	-	129,06	131,1	**C**
2'	7,32dd	7,23d	129,06	129,07	**CH**
3'	6,82m	6,74d	114,18	116,36	**CH**
4'	-	-	157,83	159,02	**C**
5'	6,82m	6,74d	114,18	116,36	**CH**
6'	7,32dd	7,23d	129,06	129,07	**CH**
NH	??	9	-	-	**-**
= NH	-	12,31s	-	-	**-**
NH_2	10,77s	10,77s(1)	-	-	**-**

Para fins de elucidação estrutural do derivado DCHA, foi realizada uma análise de espectroscopia de infravermelho para identificar os grupos funcionais que compõem a molécula. As regiões de absorção de infravermelho apresentadas no espectro foram semelhantes àquelas descritas na literatura para flavonoides. Estas bandas referem-se ao estiramento do –C=O (1600-1800 cm^{-1}), estiramento C-O (1080-1250 cm^{-1}), alongamento d OH (3100-3290 cm^{-1}), alongamento da ligação C-C (1150 cm^{-1}) e o estiramento C=C (1450-1630 cm^{-1}). No entanto, a molécula apresentou fortes picos na região de 3000 a 3500 cm^{-1}, corresponde à vibração de alongamento que ocorre nas ligações O-H e N-H, sendo pico em 1490 cm^{-1} pertence à vibração de flexão N-H. (TURKKAN *et al*., 2012; KUMAR *et al*., 2013; ZHANG *et al*., 2017). (Figura 5)

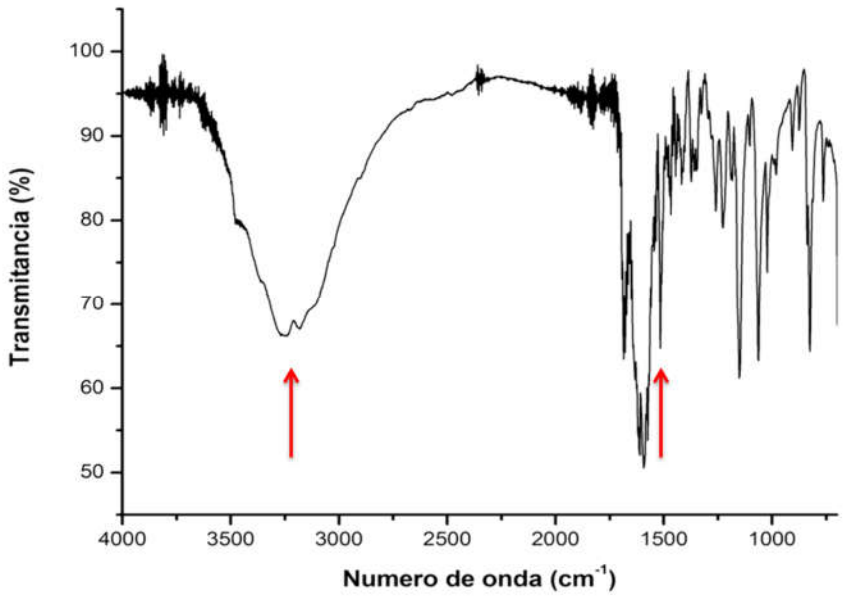

Figura 6 - Espectro no infravermelho da DCHA por FTIR, utilizando espectrômetro Shimadzu, modelo IR Prestige-21.

5.3 Atividade biológicas *in vitro*

5.3.1 Citotoxidade

Para avaliar a segurança do derivado DCHA, realizou-se o ensaio de citotoxidade, utilizando linhagem de fibroblasto humano MRC-5. Uma curva de dose-reposta foi construída para determinar qual a concentração de cada substância apresentava toxicidade. Nos fibroblastos MRC-5, a aminoguanidina não apresentou toxicidade nas concentrações testadas, com viabilidade superior a 80% em todas as concentrações e CI_{50} superior a 1000 μg/mL. DCHA e a naringenina (NAR) somente apresentaram redução da viabilidade na concentração de 800 μg/mL, com CI_{50} igual a 767,4 ± 18,71 μg/mL e 524,45 ± 12,23 μg/mL, respectivamente. Os resultados demonstraram que as substâncias testadas são consideradas seguras e viáveis para a realização de teste *in vivo*. (Figura 7).

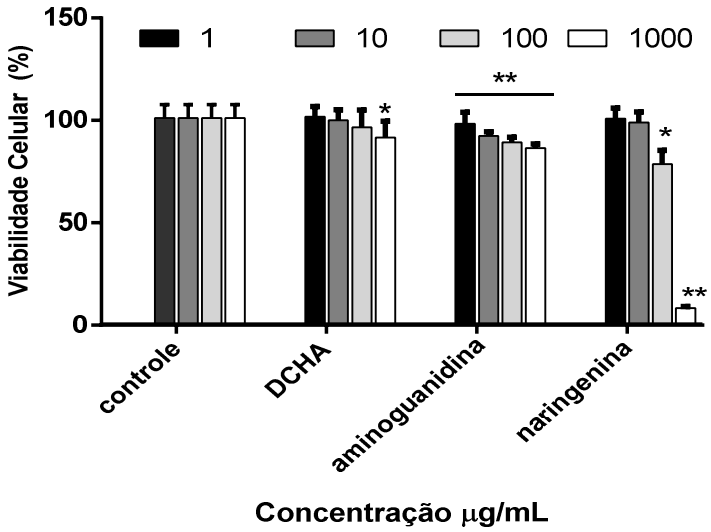

Figura 7 - Viabilidade celular em fibroblastos MRC-5. O DCHA, a AMG e a NAR foram testadas em células THP-1 por 48 horas e MRC-5 por 24 horas. Dados expressos como média ± desvio padrão, analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. * p< 0,05.

O ensaio de citotoxicidade in vitro é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade e segurança de qualquer material para uso biomédico, alimentar ou farmacológico. Quando a porcentagem de células viáveis está acima de 80% considera-se nenhuma citotoxicidade; entre 80 e 60% baixa; 60 e 40% moderada e abaixo de 40% alta citotoxicidade (ROGERO *et al.*, 2003; ISO, 2009).

5.3.2 Ensaio de ativação de macrófago por LPS

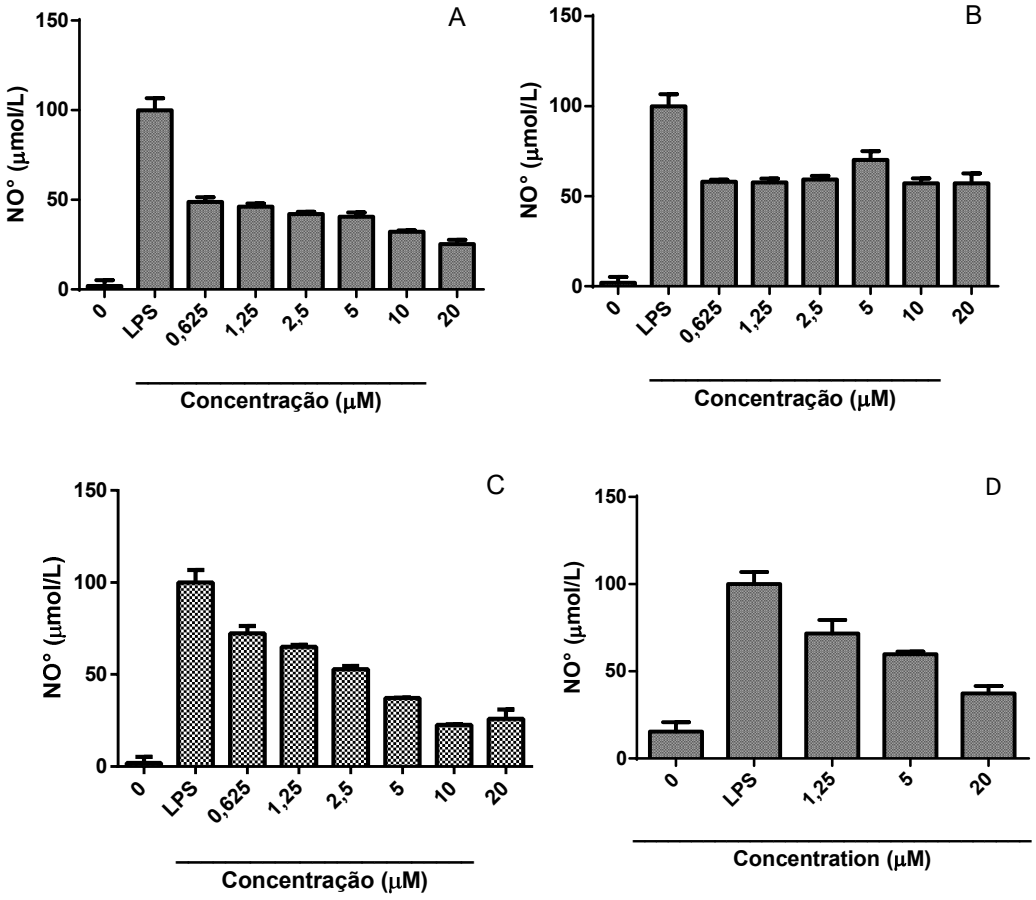

Figura 8 – Capacidade de inibição da síntese de óxido nítrico da DCHA (A), Naringenina (B), Aminoguinidina (C) e Indometacina (D) em macrófagos ativados por LPS. Dados expressos com média ± desvio padrão, analisados por Anova seguido por múltiplas comparações de Newman-Keul com grupo normal. ($p < 0,05$).

Macrófagos da linhagem J774A.1 foram ativados com 1 µg/mL de LPS com finalidade de avaliar a capacidade do DCHA, naringenina e aminoguanidina de inibirem a produção de óxido nítrico destas células. As concentrações utilizadas variaram entre 20 a 0,625 µmol/L.

Todas as substâncias conseguiram inibir a produção de óxido nítrico nos macrófagos ativados. Contudo, DCHA e aminoguanidina demonstraram uma redução mais significativa da concentração de óxido nítrico, apresentando uma relação dose-resposta inversamente proporcional à síntese de óxido nítrico. Ou seja, à medida que se eleva dose, menor é produção de óxido nítrico. No entanto, observou-se em todas as doses testadas da naringenina quase não houve variação. Em uma comparação entre os efeitos apresentados nas doses testadas do DCHA ($IC_{50\%}$ 0,70 µmol/L) e aminoguinidina ($IC5_{0\%}$ 2,70 µmol/L), foi observado que a primeira demonstrou potencial inibitório mais significativo (<0,0001) frente à segunda, sendo que, nas doses testadas, o DCHA conseguiu manter a produção de óxido nítrico abaixo de 50 µmol/L.

5.3.3 Atividade Antioxidante

Os métodos para avaliação da atividade antioxidante total (AAT) propostos na literatura são diversos. Porém, alguns são mais apropriados que outros, dependendo da natureza dos compostos a serem avaliados. Para determinação capacidade antioxidante do DCHA, naringenina (NAR) e da aminoguanidina (AMG) foram realizados o ensaio capacidade sequestrante do radical DPPH e ABTS. A determinação da atividade antioxidante foi feita pelo decréscimo da coloração, indicando que os radicais presentes no meio foram sequestrados ou estabilizados (SUCUPIRA *et al.*, 2012, 2014). No

ensaio do ABTS, o DCHA apresentou CI_{50} de 5,54 ± 0,17 μg/mL. A AMG e NAR que apresentaram CI_{50} de 160 ± 19,91 μg/mL e 714,55 ± 155 μg/mL, ao passo que no ensaio DPPH, o DCHA obteve CI_{50} de 14,04 ± 0,89 μg/mL, enquanto a AMG e NAR apresentaram CI50 de 81,51 ± 4,66 μg/mL e 443,58 ± 63,42μg/mL.

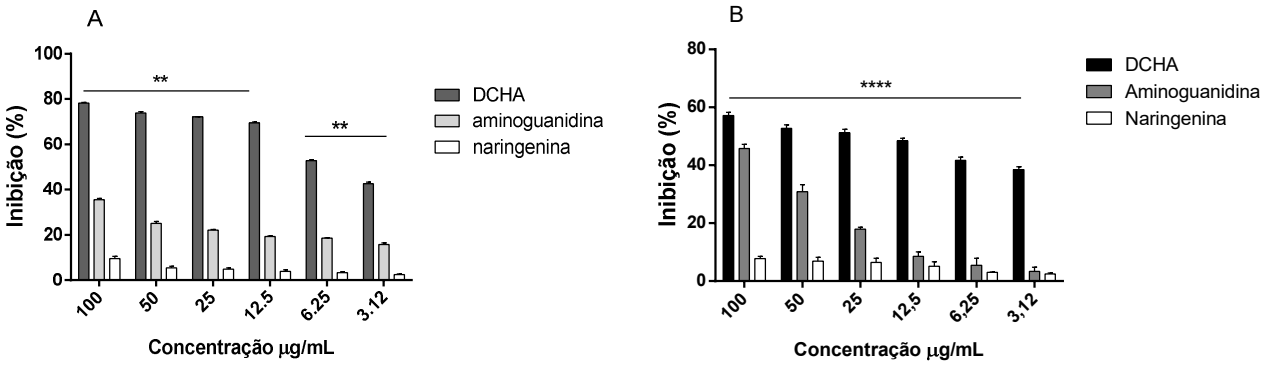

Figura 9 - Atividade sequestrante do DCHA frente aos radicais ABTS (A) e DPPH (B). Dados expressos como média ± desvio padrão, analisados por one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. **** p< 0,0001 – todas as concentrações foram estatisticamente significativas.

5.3.4Atividade antiglicação

Os AGE's estão envolvidos diretamente com diabetes, além de contribuírem para exacerbação de neuropática e aumentar o risco de doenças cardíacas. A formação dos AGE's está ligada com estresse oxidativo, que desencadeia a inflamação em síndromes metabólicas. Então, a busca de compostos com potencial em inibir a formação de AGE's se faz importante, uma vez que a redução deles melhora o perfil glicêmico, reduzindo o risco de morte por doenças cardiovasculares (SINGH *et al.*, 2001; OTT *et al.*, 2014; PALIMERI *et al.,* 2015).

Para avaliar essa atividade foi utilizado o método de glicação por via oxidativa (glioxal) e glicação não-oxidativa (frutose), sendo a albumina a proteína a ser glicada. O DCHA apresentou uma CI_{50} de 77,11 µg/mL ± 1,61 pela via do glioxal, enquanto o CI_{50} da naringenina foi de 30,49 µg/mL ± 0,97 Porém, a aminoguinidina, em comparação com o derivado (DCHA), apresentou CI_{50} maior (278,98 µg/mL ± 4,90),

Pela via não-oxidativa, ambas DCHA e AMG apresentaram um melhor perfil de inibição; enquanto a NAR teve um perfil antiglicação menos efetivo. Os CI_{50} foram 2,72 µg/mL ± 0,50; 2,96 µg/mL ± 2,05 e 28,70 µg/mL ± 2,26, respectivamente.

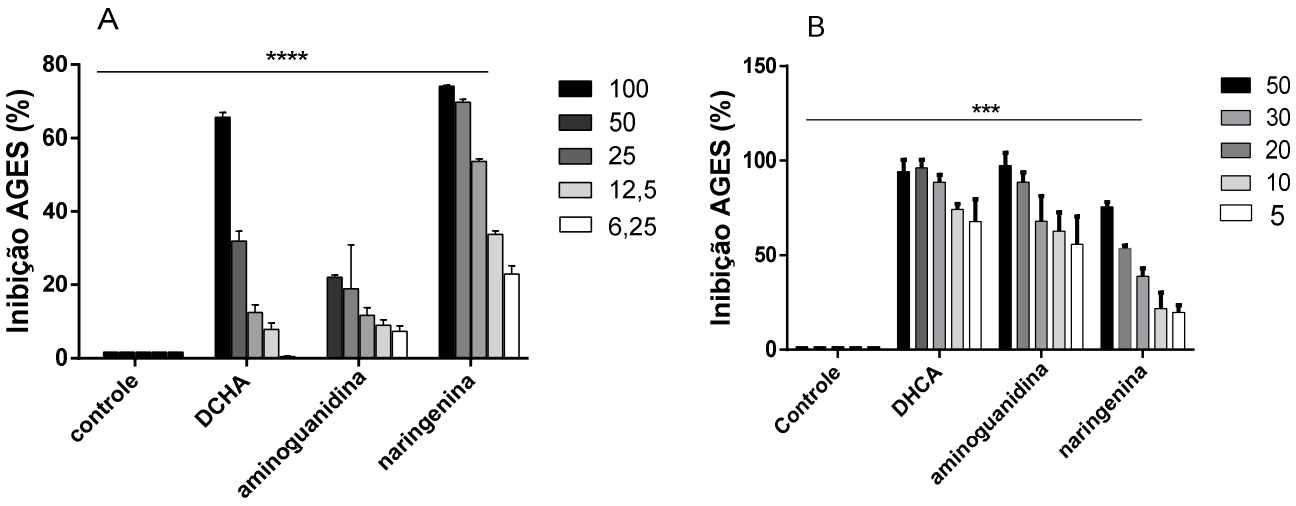

Figura 10 - Capacidade inibitória da glicação pela via glioxal (A) e frutose (B) da DCHA, AMG e NAR Dados expressos como média ± desvio padrão, analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. * p< 0,05.

5.4 Ancoragem molecular

A ancoragem molecular se tornou uma ferramenta importante para determinação e busca de potenciais candidatos a fármacos. Através da informação físico-química e de afinidade dos protótipos pelo alvos, juntamente com cálculos teóricos e relação estrutura-atividade, pode-se avaliar uma determinada propriedade farmacológica, sendo que os alvos mais utilizados são enzimas e receptores celulares (MENG *et al.*, 2011a, 2011b). Nos estudos *in silico* foi avaliado as interações do DCHA com as enzimas iNOS e COX-2. As estruturas cristalográficas das enzimas foram obtidas no banco de proteínas Protein Data Bank (PDB) sob os ID: 1QW5 e ID: 2OYU, respectivamente.

O DCHA apresentou três ligações de hidrogênio com os resíduos ASP 376 e GLU 371; ao passo que os anéis aromáticos fazem interações de Van der Vaals com os resíduos PRO 344 e VAL 346 no sítio ativo da iNOS. (Figura 10)

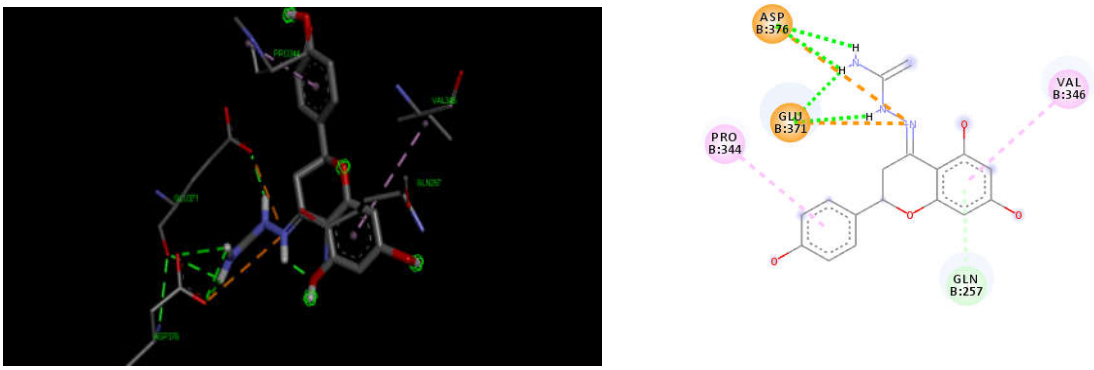

Figura 11 - Interações da DCHA com resíduos de aminoácido da iNOS.

As isoezimas COX catalisam a biossíntese das prostagladinas, responsáveis pela inflamação e pelo estímulo da liberação outros de mediadores inflamatórios, bem como pela proteção do tecido parietal do estômago (COX-1). A maioria dos estudos envolvendo atividade anti-inflamatória utiliza a COX-2 como alvo, por ela catalisar a síntese de prostagladinas inflamatórias (EL-SAYED *et al*., 2012; PEDRIALI *et al*., 2008).

O DCHA apresentou na porção hidrazina interações de hidrogênio com resíduos LEU 351 e SER 352. Os anéis aromáticos interagiram com os resíduos TYR 384, GLU 525 e houve duas interações alquil, caracterizando pontes de Van Der Vaals, com energia de ligação próxima a -8,4. Porém, fazem-se necessários outros testes *in silico* para a confirmação das interações. Apesar de haver interações comumente vistas entre ligantes e os resíduos do sítio da COX-2, os resultados obtidos se diferem daqueles encontrados em outros trabalhos. (Figura 11).

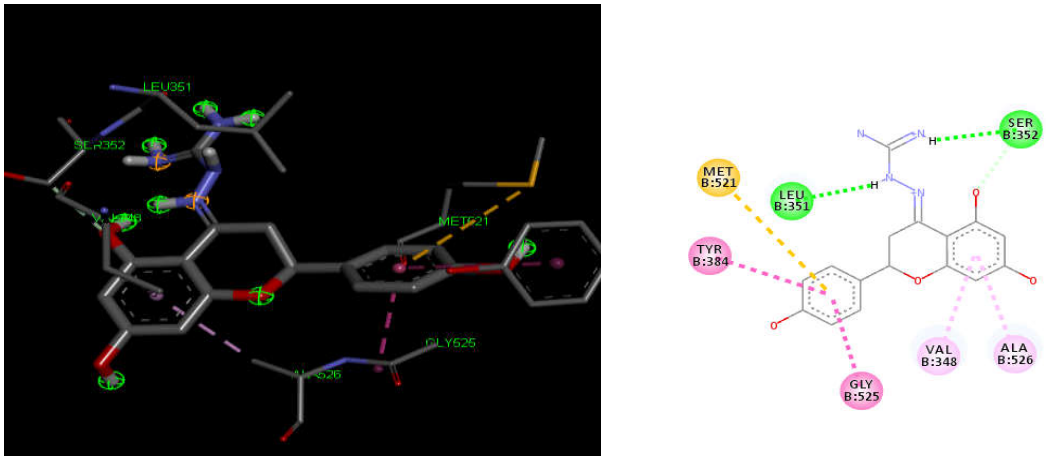

Figura 12 - Interações do DCHA com resíduos de aminoácido da cicloxigenase -1

Nestes estudos *in silico*, também foi avaliado o grau de afinidade dos ligantes com a enzima fosfodiestarese IV variante A, sendo inibidor padrão o (4R)-4-(3-butoxi-4-metoxibenzoil)imidazolidin-2-ona. As estruturas cristalográficas foram obtidas do banco de dados do site Protein Data Bank (PDB) sob o ID: 3I8V. O ligante padrão possui uma energia de ligação de -7,0 Kcal/Mol; apresentando 2 ligações de pontes de hidrogeno com resíduo de glicina 581a, interações do tipo pi-pi com o fenilalanina 584a, e um acoplamento no balsão hidrofóbico formado pelos resíduos de metionina 485a; tirosina 483a; serina 580a. Em contrapartida, O DCHA demonstrou-se possuir maior afinidade com sítio da fostadieterase (-9,1 Kcal/Mol); a sua energia de ligação mostrou-se superior àquela apresentada pelo padrão. A interaçoes foram similares àquelas apresentadas pelo inibidor padrão, mas as pontes de hidrogeno encontram-se em locais diferentes - mais especificamente, elas ocorrem entre os resíduos Asparagina 530a e triptofano 544a e a hidroxila do anel aromático B e a porção final imina do derivado, repectivamente. As interações hidrofóbicas são mais abuntantes; contudo, as mais importante para estabalização do acoplamento são as interações aromáticas do tipo pi-pi, ocorridas entre os resíduos de fenilalanina 584a e histidina 372a com os aneis B e A.

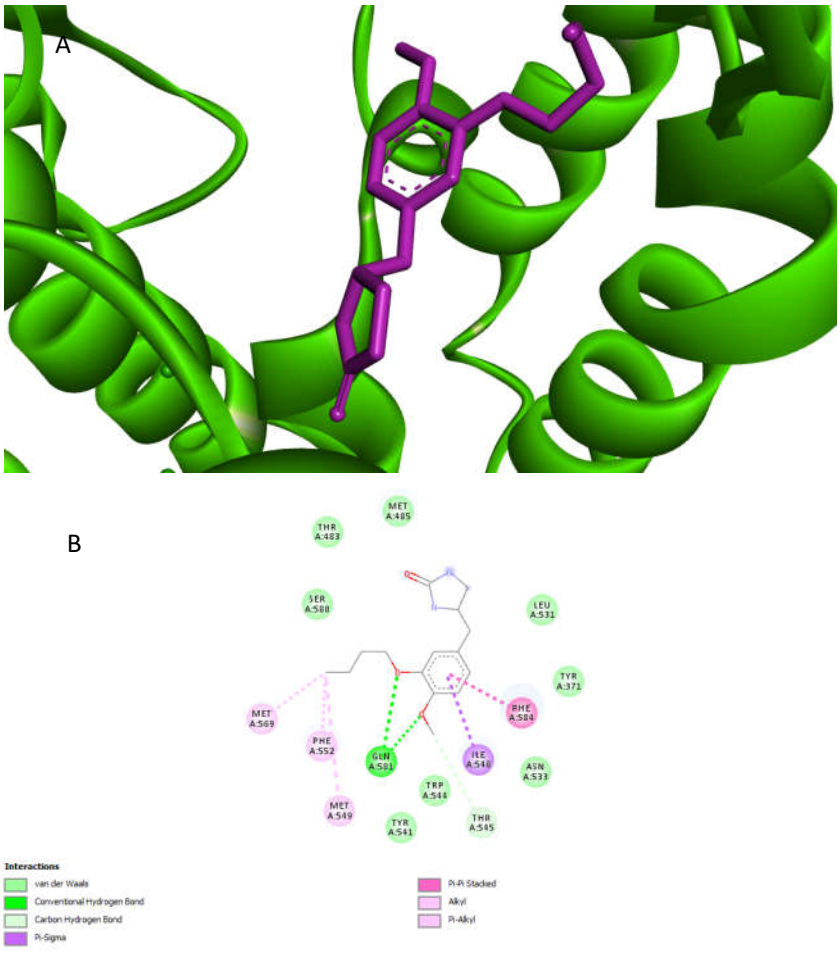

Figura 13– Docking do inibidor padrão (4R)-4-(3-butoxi-4-methoxibenzil)imidazolidin-2-ona com a fosfodiesterase IVa. . (A) Pose de conformação mais favorável no sítio ativo. (B) Ligação com os resíduos de aminoácidos da fosfodiesterase IVa.

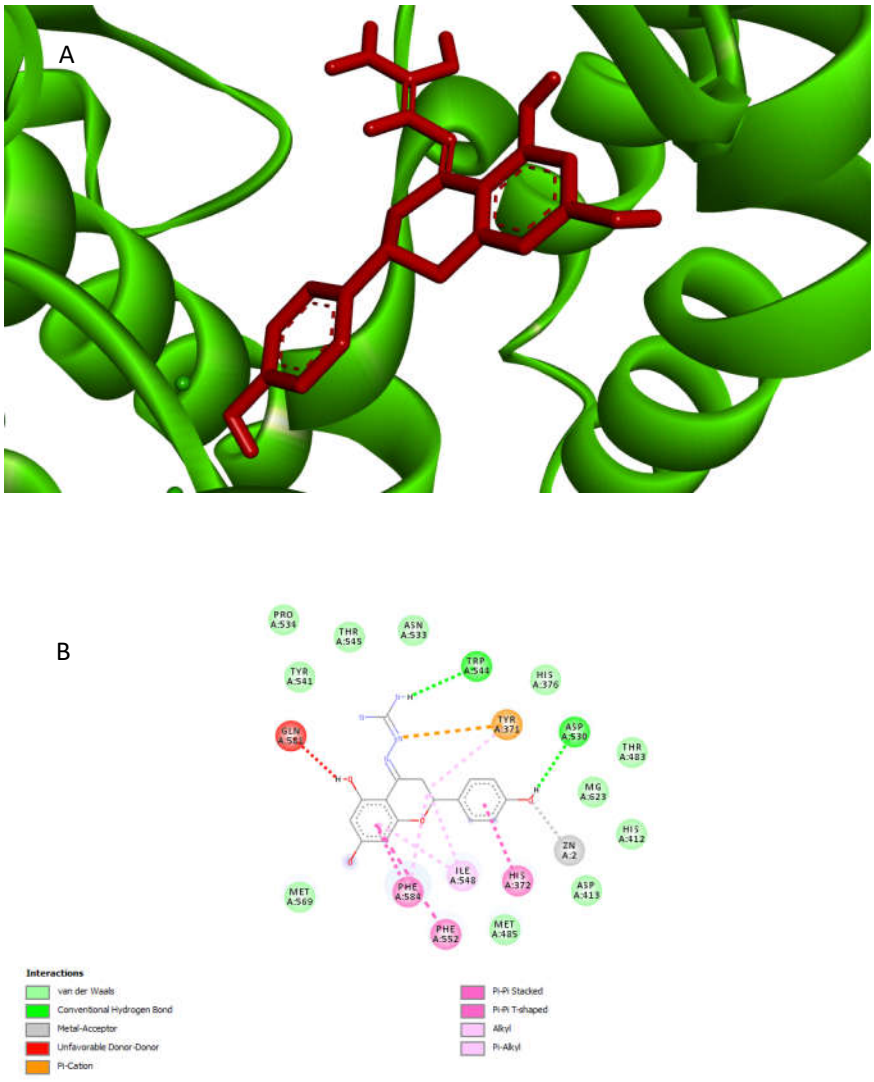

Figura 14 – Docking do composto semissintético DCHA com a fosfodiesterase IVa. (A) Pose de conformação mais favorável no sítio ativo. (B) Ligação com os resíduos de aminoácidos da fosfodiesterase IVa

5.5 Atividade biológicas *in vivo*

5.5.1 Indução de peritonite por LPS

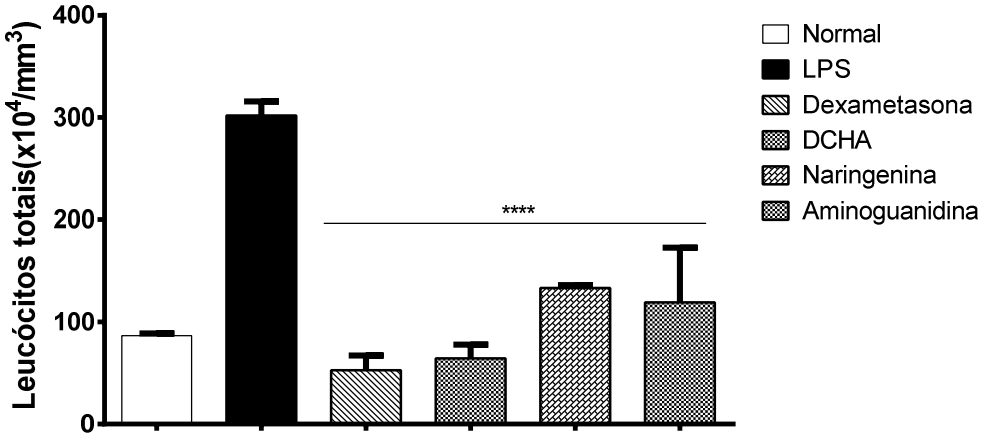

Figura 15– Efeito anti-inflamatório e contagem de leucócitos totais após 6h da indução de peritonite por LPS em camundongos. Dados expressos com média ± desvio padrão, analisados por Anova seguido por múltiplas comparações de Newman-Keul com grupo normal. ($p < 0,05$).

Para avaliar o potencial anti-inflamatório do DCHA, realizou-se a indução de inflamação do tecido peritoneal de camundongos da linhagem Swiss por LPS (500 ng/por cavidade), no qual se observou a quantidade células inflamatórias que imigraram para a cavidade peritoneal. Todos os animais foram tratados com as moléculas que compõem o DCHA (aminoguanidina e naringenina), bem com o próprio DCHA. O padrão utilizado no ensaio foi a Dexametasona, anti-inflamatório esteroide de escolha para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Todas as substâncias foram administradas por via oral na concentração de 1 mg/Kg de peso animal. No grupo controle somente foi administrado salina pela cavidade intraperitoneal, ao passo que foi inoculado o lipopolissarídeo (LPS) nos animais do grupo controle negativo e ambos receberam o veículo (salina) por via oral.

O DCHA reduziu efetivamente a infiltração leucocitária no tecido peritoneal, não havendo diferenças entre as respostas apresentadas pelo derivado e pela dexametasona (p-valor 0,365), o que evidencia um potencial anti-inflamatório da nova carboximidamida. Apesar de sua estrutura básica ser proveniente de um de flavonoide, esta capacidade não provém desta entidade química, mas é uma propriedade intrínseca do próprio DCHA, visto que a naringenina demonstrou-se menos efetiva na redução de concentração local de leucócitos.

5.5.2 Ensaio de artrite por zimosan

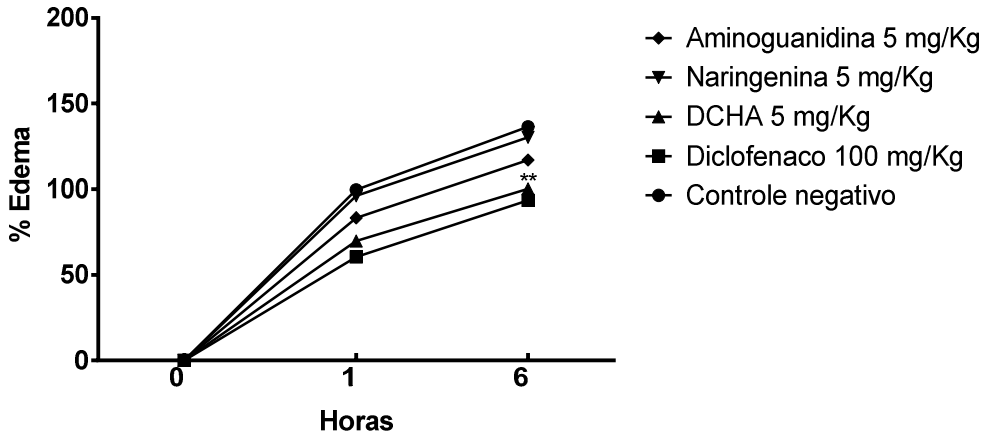

Figura 16– Porcentagem de edema de pata após indução por zimosan em camundongos. Dados expressos com média ± desvio padrão, analisados por Anova seguido por múltiplas comparações de Newman-Keul com grupo normal. ($p < 0,05$)

O DCHA foi administrado numa concentração de 5m/Kg, 30 minutos antes da indução de edema pela inoculação plantar de zimosan. A dose administrada reduziu significativamente (p valor 0,00064) o edema provocado pelo zimosan. O efeito apresentado pela substância foi similar (p valor 0,55) ao do diclofenaco (100 mg/Kg). Ou seja, uma resposta farmacológica 20 vezes maior em relação diclofenaco, ao passo

que a naringenina mostrou-se menos efetividade na redução da reação flogística do zimosan.

Apesar da aminoguanidina reduzir efetivamente o inchaço das patas dos animais tratados, o decréscimo promovido foi menor do aquele observado no DCHA. A diferença entre as respostas se destaca significativamente (p valor 0,00063) no ápice do processo inflamatório, que ocorre 6 horas após a indução.

5.5.3 Atividade antidiabética e antiglicação in vivo

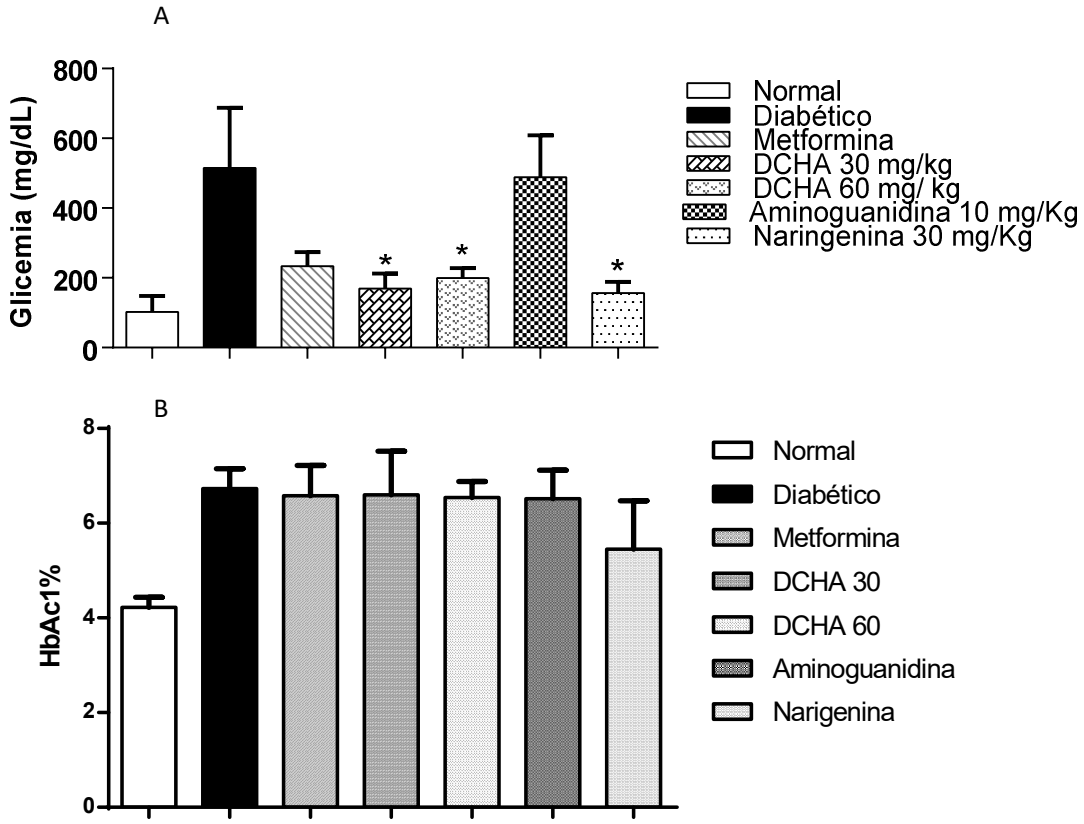

Figura 17 – Avaliação de atividade hipoglicemiante (A) e antiglicante (B) em camundongos com diabetes tipo 2 induzida por estreptozotocina. Dados expressos com média ± desvio padrão, analisados por Anova seguido por múltiplas comparações de Newman-Keul com grupo normal. ($p < 0,05$)

Para avaliação da atividade antidiabética do DCHA foram utilizados camundongos swiss, divididos em 5 grupos contendo 5 animais, sendo o total de 35 animais. A diabetes tipo 2 foi induzida pela administração de estreptozotocina e nicotinamida; e os animais que apresentaram uma glicemia > 200 mg/dL foram considerados diabéticos. Após 21 dias de tratamento aferiu-se novamente a glicemia.

No grupo diabético tratado com DCHA observou-se a redução da glicemia, o que denota um efeito hiperglicemiante da carboximidamida. Além disso, não houve diferença significativa de reposta entre as doses de 60 µg e 30 µg/Kg, demonstrando uma relação dose-resposta não depende. Como esperado, a metformina reduziu os níveis glicêmicos dos camundongos diabéticos tratados; porém, a sua resposta foi significativamente menor (< 0,05) do que aquela observada nos animais tratados com DHCA. A redução observada nos animais tratados com aminoguanidina muito menor em relação às outras substâncias avaliadas neste teste.

Contudo, a naringenina foi mais efetiva na redução dos níveis de glicêmicos. Os valores obtidos na quantificação de glicemia plasmática foram semelhantes ao do grupo normoglicêmico. Entretanto, efeito hipogliceminante deste flavonoide é similar ao do DCHA por não haver diferença significativa (p-valor > 0,05) entre eles. Diante destes resultados, infere-se que o efeito hipoglicemiante do derivado é semelhante ao da narigenina, assim não havendo perda desta atividade após a síntese.

Em relação à atividade antiglicante, não foi observado uma redução significativa (> 0,05) nos níveis de hemoglobina glicada dos animais tratados; salvo a naringenina, descrita como um fenólico antiglicante (YEH *et al*., 2017), que reduziu o processo de glicação de forma mais significativa, em comparação ao demais grupos-teste. A

naringenina, dentre as substâncias testadas, reduziu nos níveis de hemoglobina dos animais tratados. Apesar desse decréscimo, o perfil de glicação estava elevado em relação aos normoglicêmicos. Nas doses avaliadas de 30 e 60 mg/kg, não foi observada uma diferença significativa, o que leva a crer que o derivado exerce fraca atividade antiglicação. Não obstante, a aminoguanidina não se mostrou efetiva na inibição da glicação nas condições estabelecidas neste ensaio de atividade antidiabética, haja vista que a mesma é conhecida por sua atividade antiglicação. Por sua vez, a naringenina apresentou uma resposta antiglicante, mas não o suficiente para reduzir a níveis similares encontrados nos camundongos normoglicêmicos.

5.5.4 Analises bioquímicas

Apesar da hiperglicemia, os resultados das análises bioquímicas mostram que não houve alterações significativas nos marcadores bioquímicos, o que indica a preservação das funções fisiológicas normais de órgãos como fígado e dos rins. Não houve diferença significativa na concentração de plasmática de ácido úrico, transaminase e creatina entre grupos que compuseram o ensaio; os marcadores com maior alteração foram os triglicerídeos e a ureia. Porém, observa-se que nos grupos tratados com o DCHA, nas doses de 30 e 60 mg/kg não houve redução dos níveis de triglicerídeos em relação ao grupo normoglicêmico, mas se observou alterações nas concentrações de creatinina plasmáticas nos animais tratados com DCHA na dose 60 mg/Kg. Não obstante, o grupo tratado com naringenina apresentou um perfil lipídico muito próximo do valor de normalidade (< 150 mg/dL). O grupo tratado com aminoguanidina apresentou níveis mais elevados de marcadores lipídicos, bem como foram observadas alterações nos níveis de creatinina.

Tabela 2 - Avaliação de atividade hipoglicemiante e antiglicante em camundongos com diabetes tipo 2 induzida por estreptozotocina. Dados expressos com média ± desvio padrão, analisados por Anova seguido por múltiplas comparações de Newman-Keul com grupo normal. ($p < 0,05$)

Grupos	Ácido úrico (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Colesterol (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Triglicerídeo (mg/mL)	Ureia (mg/dL)
Normoglicêmico	3,28 ± 0,92	46,6 ± 18,66	20,2 ± 10,66	62,4 ± 10,61	0,7 ± 0,43	101,4 ± 45,85	19,08 ± 13,66
Hiperglicêmico	1,03 ± 0,58	29,33 ± 6,66	15,7 ± 15,53	107,5 ± 6,72	0,6 ± 0,55	152,7 ± 47,06	33,2 ± 8,6
Metformina (300 mg/Kg)	5,92 ± 2,20	53,48 ± 27,94	50,96 ± 5,18	106,88 ± 9,4	1,32 ± 0,55	126,40 ± 19,79	40,9 ± 16,63
DCHA (30 mg/Kg)	3,86 ± 0,92	46,25 ± 26,40	37 ± 18,20	95,7 ± 54,14	1,58 ± 1,51	169,2 ± 43,14	44,78 ± 6,03
DCHA (60 mg/Kg)	3,3 ± 0,61	37, 67 ± 13,61	37, 00 ± 13,54	121,18 ± 15,77	0,38 ± 0,22	198,6 ± 29,26	55,26 ± 9,47
Naringenina (30 mg/dL)	2,25 ± 0,87	45,25 ± 5,73	31,75 ± 24,5	100,25 ± 23,86	0,63 ± 0,33	158,25 ± 36,89	1,77 ± 0,57
Aminoguanidina (10 mg/dL)	0,96 ± 0,43	38,00 ± 38,65	14,2 ± 12,19	125,18 ± 8,68	0,48 ± 0,46	204,8 ± 39,21	30,22 ± 10,98

6.0 DISCUSSÃO

O processo de síntese do DCHA consistiu-se numa reação de conjugação, a uma temperatura de 60ºC por 6 horas, entre a naringenina e aminoguinidina com a finalidade de gerar um novo derivado com atividade anti-inflamatória e antidiabética. O produto resultante foi um resíduo cristalizado, de cor acinzentada, que após determinação e caracterização química, identificou-se estruturalmente como uma carboximidamida: uma classe de química como múltiplas propriedades biológicas e com vasto potencial de aplicação para tratamento de doenças crônicas, sejam elas de origem metabólica ou de origem inflamatória (SILVA *et al*., 2011).

A reação entre a carbonila presente no anel C da naringenina com o grupo amina da aminoguanidina resultou na formação de uma hidrizina, também conhecida como base de schiff: um grupo funcional com propriedades antiglicação, antioxidante, anticâncer e anti-inflamatória (CORDES E JENCKS, 1961; ANAND *et al*., 2012; PANDEY *et al*., 2012; SINGH *et al*., 2016). A dupla ligação presente entre o carbono e nitrogênio contribui diretamente na formação de isômeros geométricos. Além disso, exerce um importante papel na bioatividade dos derivados produzidos, o que enfatiza a importância de estudos prévios de estrutura-atividade em modelos de sínteses para obtenção de novas derivados com uma atividade biológica específica (SINGH *et al*., 2016; KOLMEL *et al*., 2017, PATEL *et al*., 2018) Porém, a possibilidade de uma substância conter todas estas propriedades biológicas possíveis presente em hidrizina e/ou hidrazona é muito remota, por depender da localização do grupo funcional na estrutura molecular de uma entidade química (HODNETT *et al*., 1970).

Alguns derivados sintetizados a partir de reações entre a aminoguinidina, e outras hidrazinas já foram propostos, os quais demonstraram algumas propriedades

farmacológicas como antioxidantes e antidiabéticas. Wei e colaboradores (2016) sintetizaram derivados de chalconas com aminoguinidina chamados acilidrazonas. Estes derivados mostraram-se anti-inflamatórios eficazes, com resposta de 92,45 %, ao passo que as respostas apresentadas pelo ibuprofeno e indometacina foram de 87,36% e 89,36%, respectivamente. A adição da aminoguinidina às estruturas das chalconas incrementou a anti-inflamatória destes fenólicos. Pórem, a formula estrutural resultante, apesar do modo de síntese ser muito similar à DCHA, diferiu totalmente da estrutura da carboximidamida. Ademais, DCHA possui uma potência de reposta anti-inflamatória maior da que destas acilidrazonas.

Wu e colaboradores (2019) fizeram algumas sínteses que envolveram a aminoguinidina e ácido ursólico. Os derivados produzidos exerceram atividades analgésica e anti-inflamatória, reduzindo a sensação de dor (nocicepção) e edema das patas dos animais tratados. Segundo os autores, a aminoguanidina tem um papel fundamental para o efeito anti-inflamatório dos derivados do ácido ursólico, uma vez que a sua retira limita esta atividade (VERMA *et al*., 2014). A adição de grupos nitrogenados como hidrizinas podem conferir elevada a atividade antioxidante e antiglicação aos derivados. Socea e colaboradores (2018) observaram que alguns derivados de acilidrazonas tiveram uma atividade antioxidante maior que o BHT, um antioxidante sintético utilizado como conservante em alimentos, sendo a sua concentração mínima inibitória (CI_{50}) foi considerada elevada. Segundo os autores, as mudanças esterioquímicas realizadas influenciaram na interação com DPPH. Khan e colaboradores (2015) sugerem que atividade antiglicação observada nos derivados de feniltiozolidrizona está ligada com a dupla ligação presente entre o carbono e nitrogênio, devido ao próton situado na azometina, ao qual os produtos da glicação

possuem atração. Os derivados que continham a base de schiff nas posições orto e para mostram-se mais ativos na inibição da glicação por metilglioxal, o que sugere que a posição da azometina no anel influencia diretamente na atividade antiglicação in vitro dos derivados, corroborando com a tese de Khan e colaboradores.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade e segurança de qualquer material para uso biomédico, alimentar ou farmacológico. Quando a porcentagem de células viáveis está acima de 80%, considera-se que não há citotoxicidade; entre 80 e 60% baixa; 60 e 40% moderada e abaixo de 40% alta citotoxicidade (ROGERO *et al.*, 2003; ISO, 2009). O DCHA apresentou toxicidade moderada, apresentando citotoxicidade somente em concentrações elevadas. A aminoguinidina e naringenina apresentaram baixa toxicidade celular em concentrações próximas a 1000 µg/mL. Apesar disso, a naringenina possui uma atividade citotoxicidade conhecida, principalmente contra células cancerígenas, cuja flavonona promove, por via apoptótica, a morte celular destas células. Mas, este efeito ocorre em concentrações em torno de 200 a 600 µg/mL, com citotoxicidade entre 60 a 80% (SHI, D. *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2017). Stompor e colaboradores (2017) observaram elevada atividade citotóxica da naringenina e de seu derivado prenilnaringenina em células cancerígenas da linhagem U-118, bem como em fibroblastos humanos normais, em concentrações próximas de 200 µg/mL.

A aminoguanidina é conhecida por sua toxicidade renal, apesar da sua eficácia na redução da glicação. Porém, Sabuncuoglu e colaboradores (2014) observaram que hidrazina tende a inibir a morte celular devido ao seu efeito antioxidante, por reduz a concentração de espécies reativas de nitrogênio pela inibição da ação iNOS. Zingarelli e colaboradores (1997) observaram que aminoguanidina exerceu efeito tóxico em

concentrações superiores a 3000 mM (ZINGARELLI *et al.*, 1997; SABUNCUOGLU, 2014), corroborando com o estudo anterior. Em uma comparação entre os efeitos apresentados nas doses testadas do DCHA ($IC_{50\%}$ 0,70 µmol/L) foi observado que o derivado demonstrou potencial inibitório mais significativo (<0,0001) frente à ação da iNOS, sendo que nas as doses testadas a produção de óxido nítrico ficou abaixo de 50 µmol/L.

Sabe-se que a produção de óxido nítrico tem uma ligação direta com processo inflamatório, devido à sua produção ser realizada pelos macrófagos M1, que expressam NOS induzível. Além disso, há evidência que apontam o envolvimento de macrófagos M1 ativados na patogênese da artrite reumatoide (YOSHIDA 2002; ZHANG *et al*., 2015). A inibição da produção de óxido por bloqueio da atividade iNOS é uma abordagem estratégica promissora para o tratamento de neuropatias, principalmente da neuropatia diabética, e doenças inflamações crônicas (HUANG *et al*., 2014; OBROSOVA *et al*., 2017).

Mladenova e colaboradores (2014) relatam que tiofeno-2-carboximidamida apresentou um potencial promissor para tratamento de dor neuropática - comum em paciente com neuropatia diabética -, por esta carboximidamida inibir a ação da iNOS neural. Em vista disso, o DCHA poderá ser usado para os tratamentos de comorbidades advindas de doenças neuropáticas. Huang e colaboradores (2014) observaram a inibição da produção *in vitro* de óxido nítrico mediante inibição seletiva, bem como pela supressão da expressão da iNOS de neurônios pelos derivados da uma classe da carboximidamida: as tiofenocaboximidamidas. Tal observação corrobora e reforça o potencial de inibição da ação do iNOS exercido pelo DCHA.

Os estudos *in silico* apontaram que o DCHA possui elevado potencial anti-inflamatório, por inibir fortemente a ação das enzimas participantes do processo inflamatório. Os testes de acoplamento foram realizados nas enzimas COX, NOS e fosfodiestareses tipo 4 (PDE4). Em relação à inibição do óxido nítrico síntese, Federov e colaboradores observaram que os inibidores interagem com os resíduos GLU 371 e TRP 366. As interações encontradas foram semelhantes as do DCHA, mas a energia de ligação obtidas no presente estudo de Federov e colaboradores foi menor (-7,1 kcal/mol) . As interações hidrofóbicas do tipo π-π e de Van der Vaals são frequentes e características nas interações entre o sítio de ligação e o ligante. Compostos que apresentam aromaticidade possuem elevada afinidade pela enzima (STEFANI *et al*., 2012).

O DCHA mostrou elevada afinidade pelas isoenzimas ciclooxigenases (COX) com os resíduos de tirosina e serina. Seus anéis aromáticos e aril estabilizam o acoplamento por meio de ligações hidrofóbicas e de Van Vaals, respectivamente. As enzimas COX's são responsáveis pela biossíntese das prostagladinas, pela ativação da via inflamatória e pelo estímulo da liberação outros de mediadores inflamatórios por células inflamatórias (HONMORE *et al*., 2016; MANIKANDAN *et al*., 2017). Harman e colaboradores (2007) encontraram interações similares àquelas do DCHA com os resíduos LEU-517, PHE-518, ILE-523, GLN-192, Ser-516. Enquanto, Fioravant e colaboradores (2010) observaram interações semelhantes na interação do derivado DCHA com resíduos TYR 385, ILE 517 e PHE 518.

Hipoteticamente, infere-se que atividade anti-inflamatória do DCHA deve-se pela inibição de uma enzima denominada fosfodiestarese, pois os estudos *in silico* reveleram que DCHA tem uma elevada afinidade pela fosfodiesterase do tipo IV, cuja

participação no processo inflamatório se faz de forma ativa. As fosfodiesterase ao longo dos anos tornaram-se um dos alvos alternativos mais promissores para o controle de doenças inflamatórias, por terem papel fundamental na modulação ação de células do sistema imune como linfócitos, macrófagos que atuam na expressão de moléculas de adesão e liberação de citocinas inflamatórias (SEKUT *et al*., 1998; REDONDO *et al*., 2012; DE AZEVADO & KÜMMERLE, 2014).

O desenvolvimento de inibidores de isoenzimas da família das fosfodiestarese, principalmente, as enzimas do tipo 4, abre novas possibilidades desenvolvimento de novoas medicamentos para tratamento de doenças inflamatórias crônicas como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, psoríase e artrite reumatoide (MULHALL *et al*., 2015; PEIXOTO & GOMES, 2015). Os estudos *in silico* foram realizados com finalidade de obtenção de novos fármacos com elevada afinidade a estas isoenzimas (REDONDO *et al*., 2012; ZHONG *et al*., 2013).

Kreir e colaboradores (2005), em estudo de relação estrutura-atividade de derivados da zardaverina, construíram uma biblioteca contendo estruturas e grupos funcionais com elevada afinidade pelas fosfodiesterase; entre estes grupos, encontravam-se as hidrazinas. A incoporação de hidrazinas, bem como de outros grupos nitrogenos, à estrutura básica da zardaverina conferiu aos derivados elevada afinidade pelas fosfodiesterases, inibindo fortemente as fosfodiesterases *in vivo*. Sharma e colaboradores (2011) e Sharma & Wakode (2017) dizem que os resíduos de histidina, asparagina e glicina, em todas das isoformas de fosfodiesterases, possuem um papel importante na estabilização da interação do substrato com sítio catalítico destas isoenzimas, juntamente com as interações hidrofóbicas feitas por meio de ligações π-π com resíduos de fenilalanina e tirosina. Segundo Zhu e colaboradores (2013), as

interações nas regiões de resíduos asparagina auxiliam na flexibilidade e na acomodação do ligante no sítio ativo, enquanto nas regiões contendo leucina e isoleucina aumentam a estabilidade da interação em zonas hidrofóbicas.

Goto e colaboradores (2013) verificaram que as interações com glicina e tirosina do sítio da fosfodiesterase do tipo IV foram primordiais para o efeito anti-inflamatório observados nos ensaios de inflamação induzida por LPS. Estes aminoácidos atuam ativamente na formação de pontes de hidrogênio, o que eleva o grau de afinidade dos ligantes pelo seu alvo, mas também auxiliam no processo hidrolítico realizado por estas hidrolases. Portanto, a interação direta dos inibidores com essa porção catalítica interfere na ação do PDE4 sobre AMPc e GMPc (DE AZEVEDO & KUMMERLE, 2014).

Em relação à ação antioxidante e antiglicação, o DCHA inibiu significativamente ação dos radicais lives e dos AGE's, demonstrando uma capacidade inibitória 30 vezes maior que aquela exercida pela naringenina e aminoguinidina.

Os flavonoides bem com outros compostos fenólicos são conhecidos por sua elevada capacidade antioxidante devido às hidroxilas presentes em sua estrutura doarem seus os hidrogênios para estabilizar os radicais livres (LIMA *et al.,* 2011; RODRIGUES DA SILVA *et al.*, 2015). Porém, a naringenina apresenta poucas hidroxilas, diferente de outros flavonoides como quercetina, miricetina que são poliidroxilados. Salgueiro e Castro (2016) relatam que naringenina é pouco eficiente como antioxidante, apresentando CI_{50} 1000 µg/mL, aproximadamente (SALGUEIRO E CASTRO, 2016)

A aminoguanidina é considerada um antioxidante potente, sendo utilizada para o tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, além de apresentar uma capacidade antiglicante, sendo eficaz no tratamento da diabetes (GAGLIARDI, 2003).

A aminoguanidina evita oxidação do LDL em paciente com aterosclerose, mas em doses elevadas promovem oxidação, ao passo que doses moderadas da guanidina são eficientes para inibir ação dos radicais lipoperóxidos (PHILIS-TSIMIKAS *et al.*, 1995).

O DCHA exerce as duas atividades, e a adição dos grupamentos aminas da aminoguanidina na estrutura do flavonoide potencializou a atividade antioxidante do DCHA frente os radicais DPPH e ABTS, algo quase ausente na naringinina. Sabe-se que ação de antiglicante está estreitamente ligada à ação antioxidante, pois uma das formas de se evitar a glicação da hemoglobina é inibição do estresse glicativo e autooxidação da glicose e dos produtos de Amadori (ELOSTA *et al*., 2017; MUÑIZ *et al*., 2018ab).

O processo de glicação inicia-se com a formação dos AGE's, envolvendo a síntese de produtos de Amadori. Estes produtos geram compostos α-dicarbonílicos capazes de reagir com aminoácidos, dando origem aos aductos proteicos, como a carboximetilisina (CML), carboxietilisina (CEL) e a pirralina, além de produtos de ligação cruzada entre diferentes resíduos de aminoácidos, como a pentosidina, e compostos imidazólicos, tais como o GOLD (dímero de lisina-glioxal) e DODIC (produto da condensação cruzada entre lisina, arginina e 3-desoxiglicosona) (CHO *et al.*, 2007; JAIRAJPURI *et al.,* 2015; PORTO BARBOSA *et al.*, 2016).

Alguns estudos reportam sobre a capacidade dos flavonoides em inibiram a formação destes produtos avançados. Estes polifenóis reduzem ou retardam síntese de radicais livres na fase inicial da reação de Maillard, levando a um decréscimo na produção de radicais carbonil e dicarbonil, precursores carboximetilisina (CML), carboxietilisina (CEL) e a pirralina. Ou seja, esta atividade está ligada à capacidade antioxidante dos flavonoides (CHEN, Y. *et al.*, 2011; YEH *et al.*, 2017).

A naringenina por não ter elevada capacidade antioxidante, por consequência, apresenta um perfil antiglicante pouco satisfatório por possuir poucas hidroxilas. A atividade antiglicante do DCHA pode-se ser atribuída à adição das aminas presente na aminoguanidina, juntamente com as hidroxilas presente na naringenina, que potencializaram o efeito antiglicante do derivado.

O potencial hipoglicemiante das carboximidamidas foi destacado por estudos realizados por Breslin e colaboradores (1993) sintetizaram uma série de derivados desta classe. No teste de tolerância oral, os autores observaram que o pico glicêmico dos animais tratados com os derivados carboximidamídicos foi menor em relação aos não tratados. Gutierrez-Lara e colaboredores (2017) produziram alguns derivados a partir da metformina com o intuito de obter novos fármacos hipoglicemiantes, havia entre os derivados uma carboximidamida. O efeito hipoglicemiante apresentado por estes derivados foi atribuído ao aumento da fosforilação da AMP proteína quinase, cuja função é ativar a produção de energia, diminuindo os níveis de glicose plasmática e no fígado, o que favorece a diminuição da resistência à insulina, sendo este mecanismo de ação similar ao da metformina. Carvalheira e colaboradores (2002) dizem que a resistência à insulina pode estar relacionada com diminuição dos níveis de AMP cíclico, causada pela ação da fosfodiesterases, o que leva a crer que a inibição destas enzimas pode auxiliar no controle da diabetes tipo II. Fu e colaboradores (2015) utilizaram a leucina como inibidor de fosfodiesterases e observaram que o aminoácido melhorou a ação da insulina nos tecidos periféricos. Wu e colaboradores (2015) observaram que antagonistas da fosfodiesterase tipo IV auxiliaram na ativação da termogênese e lipólise, o que promoveu a redução da resistência à insulina, consequentemente diminuiu os níveis de glicose plasmática.

A atividade antidiabética da aminoguanidina é amplamente descrita e vários análogos foram feitos a partir dela. A sua aplicação para tratamento de síndromes metabólicas dá-se pela capacidade de inibição da NOS induzida durante as inflamações ocorrentes neste distúrbio metabólico. Contudo, há uma relação entre o estresse oxidativo por via nitrosativa e a resistência à insulina, a redução de agentes oxidantes como peroxinitrilo, por exemplo, pode contribuir para atenuação da diabetes tipo 2

Os flavonoides possuem várias propriedades farmacológicas amplamente descritas como: anti-inflamatória, antioxidante (a mais comum) e hipoglicemiante e hipolipemiante. A naringenina apresentou propriedade hipoglicemiante, que foi observada em estudo realizado por Ren *et al* (2016), no qual a naringenina reduziu os níveis de malondialdeído (marcador da peroxidação lipídica), de glicose plasmática e colesterol, além de auxiliar na restauração da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina.

Hartogh e Tsiani (2019) atribuem o efeito hipoglicemiante à capacidade da naringenina de elevar os níveis de AMPK fosforilada celular, o que estimula a recaptação de glicose via GLUT 4, semelhante à DCHA, mas esta evita a degradação de AMP, mantendo os seus níveis citossólicos elevados. Muito embora na estrutura molecular do DCHA haja um grupo imina, não foi vista a atividade antiglicante *in vivo* esperada. Por outro lado, a aminoguinidina, conhecida por sua atividade antidiabética e pelo potencial antiglicante, não demonstrou não foi eficiente na redução dos níveis hemoglobina glicada. O efeito antiglicante foi visto no ensaio *in vitro*, por este ser realizado em um ambiente controlado, sem interferência de fatores biológicos encontrados num ambiente *in vivo* (NEGRI 2005; JEDSADAYANMATA, 2013). Muito embora a aminoguanidina e DHCA tenham apresentado capacidade antiglicante

promissora *in vitro*, isso não significa que a mesma se reproduza *in vivo*; sendo necessárias modificações moleculares para melhora desta propriedade (CHEN *et al*., 2005).

O DCHA é um produto de uma reação de base de Schiff, cujos derivados costumam ter um potencial antiglicante. Além disso, podem apresentar outras propriedades biológicas que variam de antidiabética à anti-helmíntica, assim sendo multifuncionais (ANAND *et al*., 2012; KAJAL *et al*., 2013). As mesmas propriedades descritas estão presentes na classe das carboximidamidas, classe a qual o DCHA pertence, mas atividade hipoglicemiante é mais bem descrita, não havendo tantos trabalhos que descrevam as atividades antiglicação das carboximiadamidas (BRESLIN *et al*., 1993; OLIVEIRA *et al*., 2014).

Contudo, as modificações moleculares podem conferir novas atividades ou, até mesmo, acentuar uma propriedade intrínseca dos derivados. Khan e colaboradores (2009) realizaram modificações estruturais em compostos oxindólicos, tornando-as base de Schiff pela adição do grupo orgânico imina. A modificação conferiu aos novos derivados uma atividade antiglicação moderada *in vitro,* em comparação a rutina, um antiglicante fenólico. Estes derivados foram mais eficazes na inibição da glicação (GREWAL *et al*., 2014). Porém, algumas modificações podem reduz a resposta ou, até mesmo, modificar a sua propriedade, como ocorreu no caso do DCHA.

Por mais que seja uma base de Schiff, nas condições experimentais dadas, não apresentou uma atividade antiglicação significante. Segundo, Khan *et al* (2013), a posição, onde se insere um grupamento de schiff, pode influenciar criticamente na atividade antiglicação de um derivado. Portanto, a adição de uma imina à estrutura na naringenina pode impactar negativamente o seu efeito antiglicação.

A hiperglicemia persistente ativa as vias dos polióis, elevando os níveis de concentração de sorbitol, o que ocasiona um desequilíbrio na proporção relação oxidante e antioxidante. Este desequilíbrio metabólico propicia a síntese exacerbada de produtos finais da glicação, aumentando ainda mais os riscos de doenças inflamatórias e outras complicações advindas da diabetes como retinopatia, nefropatia e hepatopatia (GIACOMINI *et al*., 2013). Os produtos avançados da glicação podem alterar, de forma danosa, o metabolismo hepático, o que leva o desenvolvimento de esteatose não hepática por acúmulo de lipídios. Simultaneamente, a oxidação lipídica vem como consequência cronicidade da glicação, aumentado o risco de doenças coronarianas (GIESTAS *et al*., 2015; NEVES *et al*., 2017). A redução da glicemia em conjunto com a diminuição da glicação de hemoglobina atenua o risco do surgimento destas comorbidade comuns da hiperglicemia crônica.

Os radicais livres elevam os níveis de lipoperoxidação das lipoproteínas hepática; a função renal fica comprometida devida à inflamação desencadeada pelo dano oxidativo glomerular. O efeito antioxidante de compostos fenólicos e carboximidamida promovem uma proteção contra danos oxidativos causados pelos agentes oxidantes e pelos produtos avançados da glicação, por inibiram redução da ação oxidativa destes agentes oxidativos. Tal propriedade pode ter influência direta na preservação do funcionamento renal e hepático, esta ação se confirma pela ausência de diferença os níveis transminases, creatinina e ureia entre o grupo normal e o diabético (RAO *et al*., 2015; NAGAVOLU *et al*., 2017; PATEL *et al*., 2018).

Por ser uma carboximidamida, podemos associar o efeito do DCHA àqueles já demonstrados por outros derivados desta classe, sendo que muitos destes são de origem sintética. Page e colaboradores (1996) relacionaram o efeito anti-inflamatório de alguns

derivados sintéticos categorizados como carboximidamidas com a ação inibitória da ação das fosfodiesterases, principalmente as do tipo IV, cuja inibição propiciou redução da permeabilidade endotelial de leucocócitos, mediante a supressão da expressão de moléculas de adesão. Embora a fosfodiestarase não seja um alvo inovador, no tocante à inflamação, o seu uso como alvo de medicamentos anti-inflamatórios é muito promissor, devido à sua capacidade impedir a migração de células inflamatórias, cuja função está ligada com a progressão do processo inflamatório. Além disso, a inibição seletiva da ação das fosfodiesterases reduz a concentração plasmática de histamina, IL-1β, TNFα, consequentemente diminuindo hiperreatividade de tecidos altamente vascularizados (SANTING *et al*., 2001).

Segundo Li e colaboradores (2018), a PDE4 regula a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, bem como a proliferação via degradação do cAMP. A inibição da PDE4 leva ao acúmulo de cAMP intracelular, que pode desencadear ativação da proteína quinase A (PKA) e Epac1/2. A ativação da PKA resulta na fosforilação da proteína ligada a elemento responsivo à cAMP (CREB) e do fator de transcrição ativado 1 (ATF-1), recrutando proteína ligada à CREB (CBP) e levando ao aumento da síntese de citocinas anti-inflamatórias. O atividade transcricional do NF-kB pode ser regulada pela PKA ativada, mediante modulação de sua interação com p300; a inibição desta proteína promove a redução da síntese de citocinas inflamatórias via NF-kB. Além disso, a ativação do PKA pode interferir na síntese da proteína de linfoma celular B -6 (Bcl-6) mediada por citocinas pró-inflamatórias, assim como na proliferação de células imunitárias. A compartimentalização do cAMP intracelular contribui para formação sinalossoma transcricional do Epac1/2, que pode servir como

um mecanismo alternativo para ação anti-inflamatória e anti-proliferação de novos fármacos (Figura 18).

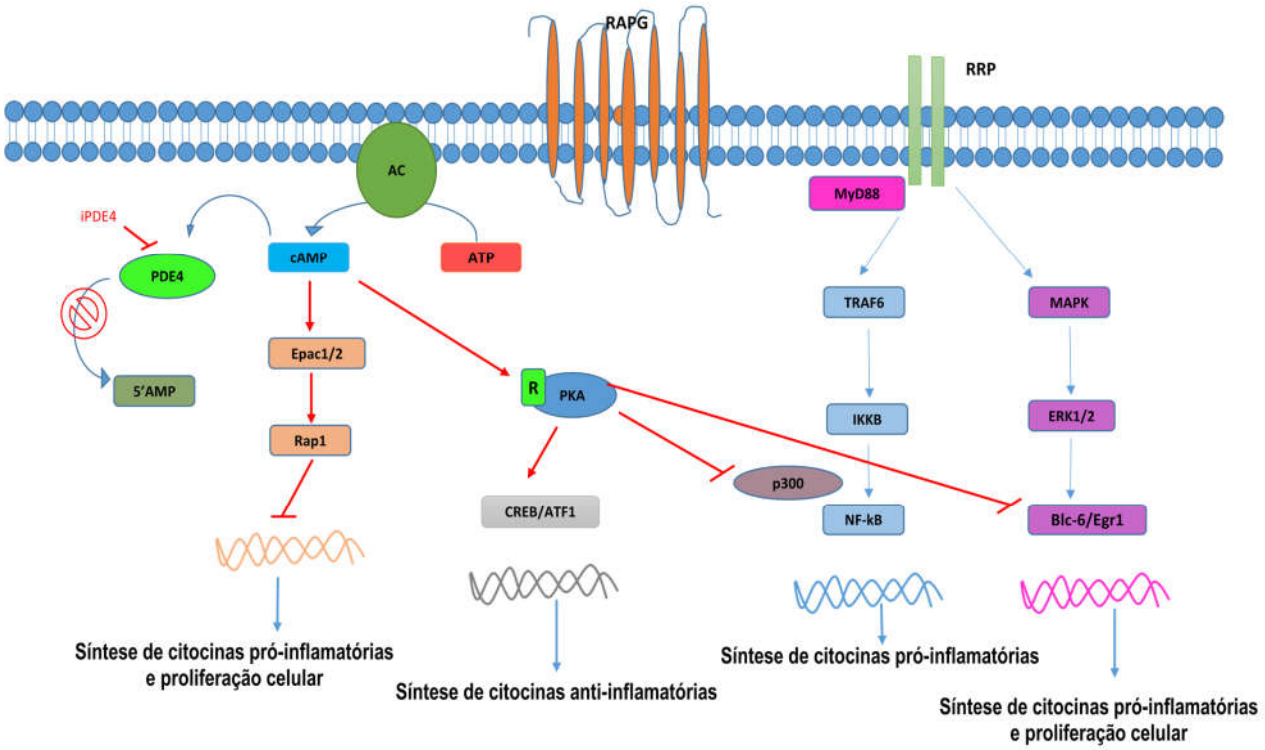

Figura 18 – Modo de regulação da reposta inflamatória via inibição da PDE4. Adaptado de Li e colaboradores, 2018.

Morytko e colaboradores reforçam o potencial anti-inflamatório das carboximidamida pelo decréscimo da infiltração leucocitária, presentes na fase crônica da inflamação, assim direcionado esta propriedade para o tratamento de inflamações crônicas como artrite, por exemplo (MORYTKO *et al*., 2008). Wei e colaboradores (2016) fizeram semissínteses conjugando aminoguanidina e chalconas (compostos fenólicos semelhantes aos flavonoides) e obtiveram derivados com estruturas semelhantes ao DCHA. Estes derivados apresentaram elevada atividade anti-inflamatória, o que foi observada pela redução do edema induzido. Porém, estes

derivados apresentaram atividade anti-inflamatória na dose 100 mg/Kg, enquanto a dose de resposta do DCHA foi de 5 mg/Kg no edema de pata induzida por zimozan.

O zimosan é um agente inflamatório que induz infiltração leucocitária para cavidade sinovial, gerando um edema, sendo a fase mais aguda alcançada em 6 horas após a indução (CONTE *et al*., 2008). Nos estágios iniciais da inflamação, muitos mediadores cruciais para o desenvolvimento da hiperalgesia e recrutamento leucocitário são produzidos causando uma destruição maciça do tecido articular (CONTE *et al*., 2015). O bloqueio deste recrutamento exercido pelo DCHA diminuiu o edema induzido pelo zimosan.

Sabe-se que carboximidamidas podem suprimir indiretamente na expressão de moléculas importantes para adesão leucocitária no endotélio como VCAM-1, E-selectina e ICAM, bem como a quimiotaxia celular. A inibição da PDE4 influencia a liberação de leucotrienos e histaminas induzida pela IgE em mastócitos e basófilos (SEKUT *et al*., 1995). Segundo Yang e colaboradores (2011), a PDE4 regula negativamente a liberação de citocinas quimiotáticas, o que culmina no decréscimo dos níveis locais de IL-1β e TNFα, mas também diminui a transcrição de NF-κβ. Estes moduladores imunogênicos podem ser suprimidos em macrófagos ativados por LPS *in vivo* (GUIMARÃES *et al*., 2018).

Goto e colaboradores (2013) observaram que a inibição das fosfodiesterases pelos derivados 4-amino-2-fenilpirimidina bicíclica suprimiu a produção de TNF-α e reduziu a inflamação tecidual induzida por LPS em ratos. Então, pode-se inferir que atividade anti-inflamatória do DCHA não advém das propriedades biológicas da aminoguanidina e naringerina, é um efeito farmacológico da própria da substância gerada pela adição de uma base de Schiff à naringenina.

Os testes *in vitro* mostram que o DCHA tem um potencial antioxidante e antiglicante significativos. Apesar de ter demonstrado uma atividade antiglicante *in vitro*, não houve redução dos níveis de hemoglobina glicada dos animais tratados com DCHA. Por outro lado, reduziu níveis glicêmicos dos animais diabéticos tratados após 21 dias de tratamento, exercendo um efeito hipoglicemiante. A adição da aminoguinidina conferiu uma propriedade anti-inflamatória ao DCHA, cujo efeito foi confirmado nos testes de inflamação induzida por LPS e Zymosan.

Os estudo *in silico* mostraram que o DCHA tem forte afinidade pela PDE4. Hipoteticamente, a inibição desta enzima é responsável pelo efeito anti-inflamatório do derivado, por esta influenciar na modulação da permeabilidade celular e na liberação de citocinas inflamatórias durante a inflamação. Além disso, a inibição da fosfodiesterase do tipo IV pode melhorar a liberação da insulina, bem como reduzir a resistência insulínica dos tecidos periféricos. O DCHA mostrou-se um promissor candidato a fármaco anti-inflamatório e pode ser utilizado para tratamento de inflamações crônicas no futuro. Mas também, pode ser associado com outros antidiabéticos presente no mercado, potencializando o seu efeito hipoglicemiante. Porém, ainda é necessário mais estudos para melhor caracterizar o seu perfil farmacodinâmico e farmacocinético, os quais serão realizado em futuros trabalhos.

7.0 CONCLUSÃO

- A reação de condensação entre a naringenina e a aminoguanidina deu origem a uma nova carboxiimidamida ((2E)-2-[5,7-diidroxi-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ilideno)hidrazina-1-carboximidamina) – DCHA, com massa molecular estimada 328,33 g/mol.

- O DCHA possui significativo potencial antioxidante e efeito antiglicação *in vitro*.

- Nos testes *in silico*, observou-se que o DCHA possui significativa afinidade pelas enzimas COX-1, iNOS e PDE; sendo esta última o possível alvo das ações anti-inflamatória e hipoglicemiante do derivado.

- Após 21 dias de tratamento, por via oral, o DCHA reduziu os níveis glicêmicos de camundongos diabéticos.

- A adminstração do DCHA por via oral em camundongos foi capaz de inibir a migração de leucocitos para a cavidade abdominal e de reduzir a artrite induzida por zimozan. Alem disso, inibiu a produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados por LPS.

- Portanto, os resultados obtidos demonstram o que o novo derivado DCHA tem potencial de aplicação para tratamento de inflamações crônicas, assim como pode ser utilizado para o controle da hiperglicemia. Assim sendo, um promissor candidato a um fármaco anti-inflamatório e antidiabético.

8.0. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDELLATIF, K. R. A. *et al.*Design, synthesis and biological screening of new 4-thiazolidinone derivatives with promising COX-2 selectivity, anti-inflammatory activity and gastric safety profile. **Bioorganic Chemistry**, 2016. v. 64, p. 1–12.

AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes research and clinical practice**, 2005. v. 67, n. 1, p. 3–21.

AHMAD, Faiyaz *et al*. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: important signaling modulators and therapeutic targets. Oral diseases, 2015, v. 21, n. 1, p. e25-e50.

ALMEIDA, M. C. S. DE *et al.* Flavonoides e outras substâncias de Lippia sidoides e suas atividades antioxidantes. **Quimica Nova**, 2010. v. 33, n. 9, p. 1877–1881.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREADY, J. E. **Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design**. **Medicinal Research Reviews**.

AMORIM, N. O.; LISBOA, H. R. K.; SIQUEIRA, L. De O. Glicação não enzimática de proteínas na gênese da nefropatia diabética. **Clinical & Biomedical Research**, 2013. v. 33, n. 2.

ANDRADE, C. A. DE *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of extracts, fractions and isolated substances from the flowers of Acacia podalyriifolia A. Cunn. ex G. Don. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2010. v. 46, n. 4, p. 715–721.

ANAND, P. *et al*. Schiff bases: A review on biological insights. **International Journal of Drug Design & Discovery**, 2012, v. 3, p. 851-868.

ARYA, A. *et al.* Anti-diabetic effects of Centratherum anthelminticum seeds methanolic fraction on pancreatic cells, ??-TC6 and its alleviating role in type 2 diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 2012. v. 144, n. 1, p. 22–32.

ASSINI, J. M. *et al.* Naringenin prevents obesity, hepatic steatosis, and glucose intolerance in male mice independent of fibroblast growth factor 21. **Endocrinology**, 2015. v. 156, n. 6, p. 2087–2102.

BABU, P. V. A.; LIU, D.; GILBERT, E. R. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. **The Journal of nutritional biochemistry**, 2013. v 24, n. 11, p. 1777-1789.

BAKRIS, G. L.; BANK, A. J.; KASS, D. A.; NEUTEL, J. M.; PRESTON, R. A.; OPARIL, S. (2004). Advanced glycation end-product cross-link breakers: a novel approach to cardiovascular pathologies related to the aging process. American journal of hypertension, 2014. v. 17(S3), p. 23S-30S.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização : uma revisão. 2005. v. 41.

BANSKOTA, Arjun H. *et al*. New diacylglyceryltrimethylhomoserines from the marine microalga Nannochloropsis granulata and their nitric oxide inhibitory activity. **Journal of applied phycology**, 2013, v. 25, n. 5, p. 1513-1521.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2008. v. 52, n. 6, p. 940–950.

BARNES, P. J. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2013. v. 12, n. 7, p. 543–559.

BARRERA, G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. **ISRN Oncology**, 2012. v. 2012, p. 1–21.

BATLOUNI, M. Artigo de Revisão Vasculares e Renais Artigo de Revisão. [s.d.]. p. 556–563.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C. Flavonóide Quercetina : Aspectos Gerais E. 2004. p. 285–292.

BERMAN, H. *et al.* The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): Ensuring a single, uniform archive of PDB data. **Nucleic Acids Research**, 2007. v. 35, n. SUPPL. 1.

BÉTÉNÉ A DOOKO, C. *et al.* Interleukin-6, high sensitivity C-reactive protein, and the development of type 2 diabetes among HIV-positive patients taking antiretroviral therapy. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, 2014. v. 67, n. 5, p. 538–46.

BORBA, Anna Karla de Oliveira Tito *et al*. Conhecimento sobre o diabetes e atitude para o autocuidado de idosos na atenção primária à saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, 2019 v. 24, p. 125-136.

BRAS, A.; METAB, E.; FEDERAL, U. Papel da Dieta na Prevenção e no Controle da Inflamação Crônica – Evidências Atuais. 2008.

BUCKNER, F. S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009–2010. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 2010. v. 23, n. 6, p. 609–616.

BRESLIN, H. J., KUKLA, M. J., TUMAN, R. W., REBARCHAK, M. C., & BOWDEN, C. R. A novel series of N-(1-aminoalkylidene) carboximidamides as potential hypoglycemia agents. **Journal of medicinal chemistry**, 1993, v. 36, n. 11, p. 1597-1603.

CAMPOS, H. *et al*. Phosphodiesterase inhibitors: new perspectives on an old therapy

for asthma?. **Jornal de Pneumologia**, 2003 v. 29, n. 6, p. 405-412.

CAO, Gui-Yun *et al*. New neolignans from the seeds of Myristica fragrans that inhibit nitric oxide production. **Food chemistry**, 2015, v. 173, p. 231-237.

CAROLINA, A. *et al.* Efeitos antioxidantes do selênio e seu elo com a inflamação e síndrome metabólica Selenium antioxidant effects and its link with inflammation and metabolic syndrome. 2010. v. 23, n. 4, p. 581–590.

CARVALHEIRA, José BC; ZECCHIN, Henrique G.; SAAD, Mario JA. Vias de sinalização da insulina. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 2002 v. 46, n. 4, p. 419-425.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico. revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 2002. v. 17, n. 6, p. 417–423.

CHEN, Y. *et al.* Relationship between antioxidant and antiglycation ability of saponins, polyphenols, and polysaccharides in Chinese herbal medicines used to treat diabetes. **Journal of Medicinal Plant Research**, 2011. v. 5, n. 11, p. 2322–2331.

CHENG, J. *et al.* Flavonoids from Millettia nitida var. hirsutissima. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, 2005. v. 53, n. 4, p. 419–421.

CHENG, Y. Role of Prostacyclin in the Cardiovascular Response to Thromboxane A2. **Science**, 2002. v. 296, n. 5567, p. 539–541.

CHEMAXON. MarvinSketch 17.1.2.0; ChemAxon, Budapest, 2017.

CHO, S.-J. *et al.* The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective. **Current medicinal chemistry**, 2007. v. 14, n. 15, p. 1653–1671.

CIPRIANI-THORNE, E.; QUINTANILLA, A. Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina . **Revista med Hered**, 2010. v. 21, n. cita11, p. 160–170.

COUTINHO, MARCELA A. S.; MUZITANO, MICHELE F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista virtual de química**, 2009. v. 1, n. 3, p. 241–256.

CONTE, F. P *et al*. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB4, TNF-α, and CXCL-1. Journal of leukocyte biology, 2008, v. 84, n. 3, p. 652-660.

CONTE, Fernando *et al*. Effect of gedunin on acute articular inflammation and hypernociception in mice. Molecules, 2015, v. 20, n. 2, p. 2636-2657.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, 2014. v. 77, n. 3, p. 703–723.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013. v. 1830, n. 6, p. 3670-3695.

DE JONGE, W. J.; ULLOA, L. The alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. **British journal of pharmacology**, 2007, v. 151, n. 7, p. 915-929.

DE SOUZA, C.; FONSECA, V. Therapeutic targets to reduce cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2009. v. 8, n. 5, p. 361–367.

DE AZEVEDO, L. L.; KUMMERLE, A. E. PDE4 inhibitors: From Discovery and Announced Failure to its Resurgence. **Revista virtual de quimica**, 2015, v. 7, n. 2, p. 465-494.

DEN HARTOGH, DANJA J.; TSIANI, E. Antidiabetic Properties of Naringenin: A Citrus Fruit Polyphenol. **Biomolecules**, 2019v. 9, n. 3, p. 99.

DIAS, R.; AZEVEDO JR., W. DE. Molecular Docking Algorithms. **Current Drug Targets**, 2008. v. 9, n. 12, p. 1040–1047.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biology**, 2011. v. 9, n. 1, p. 71.

EL-SAYED, M. A. A. *et al.* Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of pyrazole and pyrazoline derivatives as selective COX-2 inhibitors and anti-inflammatory agents. Part 2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2012. v. 20, n. 10, p. 3306–3316.

ELOSTA, A.; SLEVIN, M.; RAHMAN, K.; AHMED, N. Aged garlic has more potent antiglycation and antioxidant properties compared to fresh garlic extract in vitro. Scientific reports, 2017. v 7, p. 39613.

ERRANTE, Paolo Ruggero *et al*. Mecanismo de Ação e Resistência ao Uso de Glicocorticóides. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, 2015, v. 6, n. 2.

ESSER, N *et al*. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, 2014, v. 105, n. 2, p. 141-150.

ESSAYAN, D. M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2001, v. 108, n. 5, p. 671-680, 2001.

FURST, R.; ZUNDORF, I.Plant-derived anti-inflammatory compounds: hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. **Mediators of inflammation**, v. 2014, 2014.

FAN, L. L. *et al.* Characterization of flavonoids in the ethomedicine fordiae cauliflorae radix and its adulterant millettiae pulchrae radix by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSn.

Molecules, 2013. v. 18, n. 12, p. 15134–15152.

FAN, R. *et al.* Anti-inflammatory and anti-arthritic properties of naringenin via attenuation of NF-κB and activation of the heme oxygenase (HO)-1/related factor 2 pathway. **Pharmacological Reports**, 2017.

FARHAD, A. R. *et al.* Use of aminoguanidine, a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor, to evaluate the role of nitric oxide in periapical inflammation. **Journal of oral science**, 2011. v. 53, n. 2, p. 225–30.

FLOR, L. S.; CAMPOS, M. Prevalência de diabetes mellitus e fatores associados na população adulta brasileira: evidências de um inquérito de base populacional. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 2017, v. 20, p. 16-29.

FERNÁNDEZ-BERGÉS, D. *et al.*Metabolic and inflammatory profiles of biomarkers in obesity, metabolic syndrome, and diabetes in a Mediterranean population. DARIOS Inflammatory study. **Revista española de cardiología (English ed.)**, 2014. v. 67, n. 8, p. 624–631.

FERREIRA, L. T. .; SAVIOLLI, I. H. .; VALENTI, V. E.; ABREU, L. C. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arquivo Brasileiros de Ciências da Saúde**, 2010. v. 36, p. 182–188.

FERREIRA, A. M *et al*. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. Revista da Escola de Enfermagem da USP, 2012, v. 46, n. 3, p. 752-760.

FILHO, A. C. *et al.* Inflamação e Aterosclerose : Integração de Novas Teorias e Valorização dos Novos Marcadores. **Rev Bras Cardiol Invas**, 2005. v. 11, n. 3, p. 14–19.

PORTAL FIOCRUZ. Taxa de incidência de diabetes cresceu 61,8% nos últimos 10 anos. Disponível em https://portal.fiocruz.br/noticia/taxa-de-incidencia-de-diabetes-cresceu-618-nos-ultimos-10-anos. Acesso em: 08 de junho de 2019.

FRIESNER, R. A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2004. v. 47, n. 7, p. 1739–1749.

FIORAVANTI, Rossella *et al*. Synthesis and biological evaluation of N-substituted-3, 5-diphenyl-2-pyrazoline derivatives as cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, 2010, v. 45, n. 12, p. 6135-6138.

FUKUMOTO, S. *et al.* Novel, non-acylguanidine-type Na+/H+ exchanger inhibitors: Synthesis and pharmacology of 5-tetrahydroquinolinylidene aminoguanidine derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2002. v. 45, n. 14, p. 3009–3021.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature reviews Drug discovery**, v. 15, n. 8, p. 551, 2016.

FU, L *et al*. Interaction between leucine and phosphodiesterase 5 inhibition in modulating insulin sensitivity and lipid metabolism. Diabetes, Metabolic syndrome and obesity: **Targets and therapy**, 2015, v. 8, p. 227.

FUKUNISHI, Y. *et al.* Quantitative Structure-activity Relationship (QSAR) Models for Docking Score Correction. **Molecular Informatics**, 2017. v. 36, n. 1.

GAGLIARDI, A. R. T. Neuropatia diabética periférica Peripheral diabetic neuropathy. **J Vasc Br**, 2003. v. 22, n. 1, p. 67–74.

GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2006. v. 50, n. 2, p. 208–215.

GIESTAS, S.; GIESTAS, A.; AGOSTINHO, C. Doença Hepática e Diabetes Mellitus–Uma Relação Bi-Direcional. **Revista Portuguesa de Diabetes**, 2015, v. 10, n. 4, p. 158-166.

GIACOMINI, M. M *et al*. Análise de correlação do perfil lipídico e dano oxidativo em pacientes diabéticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 2013, v. 34, n. 2, p. 251-255.

GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**, 2014. v. 6, n. 1, p. 391–415.

GOBATO, A. O. *et al.* Síndrome metabólica e resistência à insulina em adolescentes obesos Metabolic syndrome and insulin resistance in obese adolescents. **Rev Paul Pediatr**, 2014. v. 32, n. 1, p. 55–62.

GOLDIN, A.; BECKMAN, J. A.; SCHMIDT, A. M.; CREAGER, M. A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. Circulation, 2006. v 114, n.6, p. 597-605.

GOMES, F. *et al.* Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2010. v. 94, n. 2, p. 273–279.

GOMES, M. De B. Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2006. v. 50, n. 2, p. 271–280.

GOTO, Taiji *et al*. Identification of the fused bicyclic 4-amino-2-phenylpyrimidine derivatives as novel and potent PDE4 inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 2013, v. 23, n. 11, p. 3325-3328.

GREWAL, AJMER SINGH. Isatin derivatives with several biological activities. **International Journal of Pharmaceutical Research**, 2014 v. 6, n. 17, p. 4.

GRIFFITHS, M. J. *et al.* Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. **British journal of pharmacology**, 1993. v. 110, n. 3, p. 963–8.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, 2010. v. 24, n. 70, p. 81–98.

GUIMARÃES, E. T.; DOS SANTOS, T. B.; SILVA, D. K. C.; MEIRA, C. S.; MOREIRA, D. R. M.; DA SILVA, T. F.; SOARES, M. B. P. Potent immunosuppressive activity of a phosphodiesterase-4 inhibitor N-acylhydrazone in models of lipopolysaccharide-induced shock and delayed-type hypersensitivity reaction. **International immunopharmacology**, 2018, v 65, p. 108-118.

GUSMAN, G. S.; CAMPANA, P. R.; CASTRO, L. C.; CASTILHO, R. O.; TEIXEIRA, M. M.; BRAGA, F. C. (2015). Evaluation of the effects of some Brazilian medicinal plants on the production of TNF-α and CCL2 by THP-1 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015, v2015.

GUTIERREZ-LARA, E., MARTÍNEZ-CONDE, C., ROSALES-ORTEGA, E., RAMÍREZ-ESPINOSA, J. J., RIVERA-LEYVA, J. C., CENTURIÓN, D.,NAVARRETE-VÁZQUEZ, G. Synthesis and in vitro AMPK activation of cycloalkyl/alkarylbiguanides with robust in vivo antihyperglycemic action. **Journal of Chemistry**, 2017.

HARMAN, C. A. *et al*. Structural basis of enantioselective inhibition of cyclooxygenase-1 by S-α-substituted indomethacin ethanolamides. **Journal of Biological Chemistry**, 2007, v. 282, n. 38, p. 28096-28105.

HERDER, C.; CARSTENSEN, M.; OUWENS, D. M. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. **Diabetes, obesity & metabolism**, 2013. v. 15 Suppl 3, p. 39–50.

HOPKINS, A. L. *et al.* The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2014. v. 13, n. 2, p. 105–121.

HONMORE, V. S. *et al*. Isolates of Alpinia officinarum Hance as COX-2 inhibitors: Evidence from anti-inflammatory, antioxidant and molecular docking studies. **International immunopharmacology,** 2016, v. 33, p. 8-17.

HU, F. B. *et al.* Inflammatory Markers and Risk of Developing Type 2 Diabetes in Women. **Diabetes**, 2004. v. 53, n. 3, p. 693–700.

HUANG, Q. T. *et al.* Advanced glycation end products as an upstream molecule triggers ROS-induced sFlt-1 production in extravillous trophoblasts: A novel bridge between oxidative stress and preeclampsia. **Placenta**, 2013. v. 34, n. 12, p. 1177–1182.

HUANG, H *et al*. Potent and selective double-headed thiophene-2-carboximidamide inhibitors of neuronal nitric oxide synthase for the treatment of melanoma. **Journal of medicinal chemistry**, 2014, v. 57, n. 3, p. 686-700.

HUANG, S. M *et al*. The utility of modeling and simulation in drug development and regulatory review. **Journal of pharmaceutical sciences**, 2013, v. 102, n. 9, p. 2912-2923.

HUBER, S.; MORESCO, R. N. Biomarcadores cardíacos na avaliação da síndrome coronariana aguda Cardiac biomarkers for assessment of acute coronary syndrome. **Scientia**, 2011. v. 21, n. 55, p. 132–142.

HUGHES, B. 2009 FDA drug approvals. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2010. v. 9, n. 2, p. 89–92.

HAUTZ, Theresa *et al*. Histopathologic characterization of mild rejection (grade I) in skin biopsies of human hand allografts. **Transplant International**, 2012, v. 25, n. 1, p. 56-63.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. **Iso 10993–5.**

IRWIN, J. J. *et al*. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. J. Chem. Inf. Model., 2012. v. 52, p. 1757–1768.

JAIRAJPURI, D. S.; FATIMA, S.; JAIRAJPURI, Z. S. Glycation Induced Physicochemical Changes in Low-Density Lipoprotein and Its Role in Promoting Cholesterol Accumulation in Macrophages along with Antiglycation Effect of Aminoguanidine. **Advances in Biological Chemistry**, 2015. v. 5, n. 5, p. 203–214.

JANAKIRAM, N B.; RAO, C. V. The role of inflammation in colon cancer. In: **Inflammation and Cancer**. Springer, Basel, 2014. p. 25-52.

JEDSADAYANMATA, A. In vitro antiglycation activity of arbutin. **Naresuan University Journal: Science and Technology**, 2013, v. 13, n. 2, p. 35-41.

JEMLI, M. E. Radical-Scavenging Activity and Ferric Reducing Ability of Juniperus thurifera (L.), J. oxycedrus (L.), J. phoenicea (L.) and Tetraclinis articulata (L.). Adv Pharmacol Sci, v. 2016, p.1-7, 2016.

JURENKA, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of Curcuma longa: a review of preclinical and clinical research. **Alternative medicine review**, 2019, v. 14, n. 2.

KANG, J. *et al.* Flavonoids from acai (Euterpe oleracea Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, 2011. v. 128, n. 1, p. 152–157.

KAYAL, R. A. *et al.* TNF-α mediates diabetes-enhanced chondrocyte apoptosis during fracture healing and stimulates chondrocyte apoptosis through FOXO1. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2010. v. 25, n. 7, p. 1604–1615.

KAJAL, ANU *et al*. Schiff bases: a versatile pharmacophore. Journal of Catalysts, v. 2013.

KESHARI, K. R. *et al.* Noninvasive in vivo imaging of diabetes-induced renal oxidative stress and response to therapy using hyperpolarized 13C dehydroascorbate magnetic resonance. **Diabetes**, 2015. v. 64, n. 2, p. 344–352.

KHAN, K. M *et al*. Synthesis of bis-Schiff bases of isatins and their antiglycation activity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 2009 v. 17, n. 22, p. 7795-7801.

KHAN, K. M. *et al*. Oxindole derivatives: Synthesis and antiglycation activity. **Medicinal Chemistry**, 2013 v. 9, n. 5, p. 681-688.

KIERDORF, K.; FRITZ, G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. **Journal of Leukocyte Biology**, 2013. v. 94, n. 1, p. 55–68.

KIM, C. H. Retinoic acid, immunity, and inflamation. **Vitamins and the Immune System**. [S.l.]: [s.n.], 2011, V. 86, p. 83–101.

KING, G. L. The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetes and Its Complications. **Journal of Periodontology**, 2008. v. 79, n. 8s, p. 1527–1534.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Review. **Cell**, 2015. v. 160, n. 5, p. 816–827.

KROEMER, R. T. Structure-Based Drug Design: Docking and Scoring. **Current Protein and Peptide Science**, 2007. v. 8, p. 312–328.

KRIER, Mireille *et al*. Design of small-sized libraries by combinatorial assembly of linkers and functional groups to a given scaffold: application to the structure-based optimization of a phosphodiesterase 4 inhibitor. **Journal of medicinal chemistry**, 2005, v. 48, n. 11, p. 3816-3822.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. **Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview**. **The Scientific World Journal**.

LAGRANHA, C. J. *et al.* Bases moleculares da glomerulopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2007. v. 51, n. 6, p. 901–912.

LALONDE, R. L. *et al.* Model-based Drug Development. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 2007. v. 82, n. 1, p. 21–32.

LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Vascular Oxidative Stress, Nitric Oxide and Atherosclerosis. **Atherosclerosis**, 2014.

LI, Z *et al*. Identification of novel phosphodiesterase-4D inhibitors prescreened by

molecular dynamics-augmented modeling and validated by bioassay. Journal of chemical information and modeling, 2013, v. 53, n. 4, p. 972-981.

LIE, M. A. *et al.*Molecular docking with ligand attached water molecules. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2011. v. 51, n. 4, p. 909–917.

LIMA, P. G. C.; COELHO-FERREIRA, M.; OLIVEIRA, R. Plantas medicinais em feiras e mercados públicos do Distrito Florestal Sustentável da BR-163, estado do Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 2011. v. 25, n. 2, p. 422–434.

LIU, X. *et al.* Berberine inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via COX-2/PGE2 mediated JAK2/STAT3 signaling pathway. **PLoS ONE**, 2015. v. 10, n. 5.

LLORENT-MARTINEZ, E. J. *et al.* HPLC-ESI-MSn characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in Bituminaria bituminosa. **Industrial Crops and Products**, 2015. v. 69, p. 80–90.

LOPES, E. L. *et al.*Flavonoides e sesquiterpenos de croton pedicellatus kunth. **Quimica Nova**, 2012. v. 35, n. 11, p. 2169–2172.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. [S.l.]: [s.n.], 2002. V. 50, p. 3–16.

LUCA, C. DE; OLEFSKY, J. M. Inflammation and insulin resistance. **FEBS Letters**. 2008, v. 582, n. 1, p. 97-105.

LUDWIG, M. *et al.* Processos químicos e biológicos associados a fisiopatologia do Diabetes Mellitus. **Contexto e Saúde**, 2014.

LUEVANO-CONTRERAS, C.; CHAPMAN-NOVAKOFSKI, K. **Dietary advanced glycation end products and aging**. **Nutrients**.

MA, Q. G. *et al.* Diterpenoids from Euphorbia fischeriana. **Phytochemistry**, 1997. v. 44, n. 4, p. 663–666.

MANIKANDAN, A. *et al*. Efficacy of phenyl quinoline phenol derivatives as COX-2 inhibitors; an approach to emergent the small molecules as the anti-inflammatory and analgesic therapeutics. **Inflammopharmacology**, 2017, v. 25, n. 6, p. 621-631,

MALAKUL, W.; PENGNET, S. Inhibitory Effect of 6-shogaol on Fructose-Induced Protein Glycation and Oxidation in Vitro. **Naresuan Univ J: Sci Technol,** 2017**.** v. 25, n.2.

MANCHOPE, M. F. *et al.* Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATPChannel Signaling Pathway. **PloS one**, 2016. v. 11, n. 4, p. e0153015.

MANCHOPE, M. F.; CASAGRANDE, R.; VERRI, JR., W. A. Naringenin: an analgesic and anti-inflammatory citrus flavanone. **Oncotarget**, 2017. v. 8, n. 3, p. 3766–3767.

MARTIN, K. A.; MANI, M. V.; MANI, A. New targets to treat obesity and the metabolic syndrome. **European Journal of Pharmacology**, 2015. v. 763, p. 64–74.

MARQUES, L.C.F *et al*. Anti-inflammatory effects of a pomegranate leaf extract in LPS-induced peritonitis. **Planta medica**, 2016, v. 82, n. 17, p. 1463-1467.

MARXEN, K. *et al*. Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. Sensors, v. 7, p. 2080-2095, 2007.

MESITSKAYA, Dinara F. *et al*. Thromboxane A Synthase: A New Target for the Treatment of Cardiovascular Diseases. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents)**, 2018, v. 16, n. 2, p. 81-87.

MCLELLAN, K. C. P. *et al.*Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Revista de Nutrição**, 2007. v. 20, n. 5, p. 515–524.

MLADENOVA, G *et al*. First-in-class, dual-action, 3, 5-disubstituted indole derivatives having human nitric oxide synthase (nNOS) and norepinephrine reuptake inhibitory (NERI) activity for the treatment of neuropathic pain. **Journal of medicinal chemistry**, 2012, v. 55, n. 7, p. 3488-3501,.

MENG, X.-Y. *et al.* Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, 2011a. v. 7, n. 2, p. 146–57.

MENG, X. Y. *et al.* Molecular {Docking}: {A} powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Des**, 2011b. v. 7, n. 2, p. 146–157.

MESQUITA JR, Danilo *et al*. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Rev Bras Reumatol**, 2008, v. 10, p. 66-81, 2008.

MIRANDA, C. L.; MAIER, C. S.; STEVENS, J. F. Flavonoids. **eLS**, 2012. p. 1–13.

MIRZA, S. *et al.* Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-alpha, IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: A cross-sectional study. **Cytokine**, 2012. v. 57, n. 1, p. 136–142.

MISKO, T. P. *et al.* Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. **European Journal of Pharmacology**, 1993. v. 233, n. 1, p. 119–125.

MIZUNO, C. S. *et al.* Type 2 diabetes and oral antihyperglycemic drugs. **Current medicinal chemistry**, 2008. v. 15, n. 1, p. 61–74.

MORYTKO, Michael J. *et al*. Synthesis and in vitro activity of N′-cyano-4-(2-phenylacetyl)-N-o-tolylpiperazine-1-carboximidamide P2X 7 antagonists. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2008, v. 18, n. 6, p. 2093-2096.

MOLLER, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Nature**, 2001. v. 414, n. 6865, p. 821–827.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular docking. **Methods Mol Biol**, 2008. v. 443, p. 365–382.

MORRIS, G. M. *et al*. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem, 2009, v. 30, p. 2785–2791.

MOURA, R. S. De *et al.*Effects of Euterpe oleracea Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, 15 fev. 2012. v. 19, n. 3–4, p. 262–9.

MULVIHILL, E. E. *et al.* Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. **Diabetes**, 2009. v. 58, n. 10, p. 2198–2210.

MULVIHILL, E. E. *et al.* Naringenin decreases progression of atherosclerosis by improving dyslipidemia in high-fat-fed low-density lipoprotein receptor-null mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 2010. v. 30, n. 4, p. 742–748.

MULHALL, Aaron M. *et al*. Phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a review of current and developing drugs. Expert opinion on investigational drugs, 2015, v. 24, n. 12, p. 1597-1611.

MUNIZ, A *et al*. In vitro inhibitory activity of Acca sellowiana fruit extract on end products of advanced glycation. **Diabetes Therapy**, 2018, v. 9, n. 1, p. 67-74.

MUÑIZ, A *et al*. antioxidant activity and in vitro antiglycation of the fruit of Spondias purpurea. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** 2018, v. 2018.

NAKAYAMA, G. R *et al*. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, n. 204, p. 205–208, 1997.

NAVIAUX, R. K. Metabolic features of the cell danger response. **Mitochondrion**, 2014, v. 16, p. 7-17.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. DA; SILVA, C. H. T. P. DA. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Quimica**, 2008. v. 33, n. 4, p. 13–24.

NATHAN, D. M. Diabetes. **JAMA**, 2015. v. 314, n. 10, p. 1052.

NAGAVOLU, V. R *et al*. Synthesis and in-vitro Antioxidant Activity of Novel Schiff Bases and Azetidines Derived from Phenyl Urea Derivatives. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, 2017,v. 51, n. 4, p. S707-S711.

NEVES, Christian André Fernandes. O metilglioxal altera o perfil lipídico no fígado de ratos obesos, induzindo insulino-resistência e contribuindo para a doença de fígado gordo não alcoólico. 2017. **Dissertação de Mestrado**.

NGOC, P. B. *et al.* A new anti-inflammatory β-carboline alkaloid from the hairy-root cultures of Eurycoma longifolia. **Natural Product Research**, 2016. v. 30, n. 12, p. 1360–1365.

NEGRI, Giuseppina. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 2005, v. 41, n. 2, p. 121-142.

NILSSON, B. O. Biological effects of aminoguanidine: an update. **Inflammation research**, 1999, v. 48, n. 10, p. 509-515.

NOVAK, I. *et al.* Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, 2008. v. 630, n. 2, p. 107–115.

NYMAN, I.; LARSSON, H.; WALLENTIN, L. Prevention of Serious Cardiac Events by Low-Dose Aspirin in Patients with Silent-Myocardial-Ischemia. **Lancet**, 1992. v. 340, n. 8818, p. 497–501.

OBROSOVA, I. G. *et al*. Role of nitrosative stress in early neuropathy and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 2017.

OLIVEIRA, Simone *et al*. Anti-candida, anti-enzyme activity and cytotoxicity of 3, 5-diaryl-4, 5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboximidamides. **Molecules**, 2014, v. 19, n. 5, p. 5806-5820.

ORAY, Merih *et al*. Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert opinion on drug safety**, 2016, v. 15, n. 4, p. 457-465.

ORLANDO, B. J.; MALKOWSKI, M. G. Crystal structure of rofecoxib bound to human cyclooxygenase-2. **Acta Crystallographica Section A**, 2016, Sect.F 72, p. 772-776.

OTT, C. *et al.***Role of advanced glycation end products in cellular signaling**. **Redox Biology**.

OZOUGWU, J. *et al.* The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2

diabetes mellitus. **Journal of Physiology and Pathophysiology**, 2013. v. 4, n. 4, p. 46–57.

PAGADALA, N. S., SYED, K., & TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical reviews**, 2017, v. *9*, n. 2, p. 91-102.

PAKALA, S. V; KURRER, M. O.; KATZ, J. D. T helper 2 (Th2) T cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice. **The Journal of experimental medicine**, 1997. v. 186, n. 2, p. 299–306.

PALIMERI, S.; PALIOURA, E.; DIAMANTI-KANDARAKIS, E. Current perspectives on the health risks associated with the consumption of advanced glycation end products: recommendations for dietary management. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy**, 1 jan. 2015. v. 8, p. 415–26.

PATRONO, Carlo. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. **British journal of clinical pharmacology**, 2016, v. 82, n. 4, p. 957-964.

PEIXOTO, C. A.; DOS SANTOS GOMES, Fabiana Oliveira. The role of phosphodiesterase-5 inhibitors in prostatic inflammation: a review. **Journal of Inflammation**, 2015, v. 12, n. 1, p. 54.

PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F.; REZAEE, R.; IRANSHAHI, M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. **Phytotherapy Research**, 2015, v29 n. 3), p. 323-331.

PARK, H. J. *et al.* Naringenin causes ASK1-induced apoptosis via reactive oxygen species in human pancreatic cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, 2017. v. 99, p. 1–8.

PATARRÃO, R. S.; WAYNE LAUTT, W.; PAULA MACEDO, M. Assessment of methods and indexes of insulin sensitivity. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, 2014. v. 9, n. 1, p. 65–73.

PATEL, K; SINGH, G. K.; PATEL, D. K. A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin. **Chinese journal of integrative medicine**, v. 24, n. 7, p. 551-560, 2018.

PEDRIALI, C. A. *et al.*The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent. **Quimica Nova**, 2008. v. 31, n. 8, p. 2147–2151.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química nova**, v. 30, n. 1, p. 171, 2007.

PÉRES, D. S.; FRANCO, L. J.; SANTOS, M. A. Dos. Comportamento alimentar em mulheres portadoras de diabetes tipo 2. **Revista de Saúde Pública**, 2006. v. 40, n. 2, p.

310–317.

PEREZ-ASO, M. *et al*. Apremilast, a novel phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor, regulates inflammation through multiple cAMP downstream effectors. **Arthritis research & therapy**, 2015, v. 17, n. 1, p. 249.

PHILIS-TSIMIKAS, A. *et al.*Aminoguanidine has both pro-oxidant and antioxidant activity toward LDL. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 1995. v. 15, n. 3, p. 367–76.

BARBOSA, J. H. P.; SOUZA, I. T.; SANTANA, A. E.; GOULART, M. O. (2016). A determinação dos produtos avançados de glicação (AGES) e de lipoxidação (ALES) em alimentos e em sistemas biológicos: Avanços, desafios e perspectivas. **Química Nova**, 2016, v. 39, p. 608-620.

PRADHAN, A. D. *et al.* C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **JAMA**, 2001. v. 286, n. 3, p. 327–34.

RAO, V *et al*. Flavonoid: A review on Naringenin. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, 2017, n. 5, p. 2778-83.

RAKER, V. K.; BECKER, C.; STEINBRINK, K. The cAMP pathway as therapeutic target in autoimmune and inflammatory diseases. **Frontiers in immunology**, 2016, v. 7, p. 123.

RAMASAMY, Ravichandran *et al*. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. **Glycobiology**, 2005, v. 15, n. 7, p. 16R-28R.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, 2012, v. 12, n. 9, p. 12347-12360.

RASHID, I.; REYK, D. M. VAN; DAVIES, M. J. Carnosine and its constituents inhibit glycation of low-density lipoproteins that promotes foam cell formation in vitro. **FEBS Letters**, 2007. v. 581, n. 5, p. 1067–1070.

REN, B. *et al*. Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, 2016. v. 773, p. 13–23.

RIDKER, P. M. *et al.* Effects of interleukin-1?? inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen a phase IIb randomized, placebo-controlled trial. **Circulation**, 2012. v. 126, n. 23, p. 2739–2748.

RODRIGUES DA SILVA, L. *et al.* Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, 2015. v. 23, p. 36–43.

ROGERO, S. O. *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas

metodologias. **Materials Research**, 2003. v. 6, n. 3, p. 317–320.

REDONDO, M. *et al*. Neuroprotective efficacy of quinazoline type phosphodiesterase 7 inhibitors in cellular cultures and experimental stroke model. **European journal of medicinal chemistry**, 2012, v. 47, p. 175-185.

ROSAS, E. C *et al*. Anti-inflammatory effect of Schinus terebinthifolius Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. Journal of ethnopharmacology, 2015, v. 175, p. 490-498.

ROCHETTE, L *et al*. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets?. **Pharmacology & therapeutics**, 2013, v. 140, n. 3, p. 239-257.

ROSS, Ian L.; MARAIS, A. David. The influence of glucocorticoids on lipid and lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **SAMJ: South African Medical Journal**, 2014, v. 104, n. 10, p. 671-674.

ROSSANEIS, Mariana Angela *et al*. Diferenças entre mulheres e homens diabéticos no autocuidado com os pés e estilo de vida. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, 2016 v. 24, p. 1-8.

SABUNCUOGLU, S. Antiapoptotic effect of aminoguanidine on doxorubicin-induced apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2014. v. 394, n. 1–2, p. 129–135.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Quimica Nova**, 2016. v. 39, n. 10, p. 1192–1199.

SEKUT, L. *et al*. Anti-inflammatory activity of phosphodiesterase (PDE)-IV inhibitors in acute and chronic models of inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, 1995, v. 100, n. 1, p. 126-132.

SANTING, R. E. *et al*. Bronchodilatory and anti-inflammatory properties of inhaled selective phosphodiesterase inhibitors in a guinea pig model of allergic asthma. **European journal of pharmacology**, 2001, v. 429, n. 1-3, p. 335-344, 2001.

SHARMA, V. *et al*. Structure based rational drug design of selective phosphodiesterase-4 ligands as anti-inflammatory molecules. **Bull. Pharm. Res**, 2011, v. 1, n. 2, p. 33-40.

SHARMA, V.; WAKODE, S. Structural insight into selective phosphodiesterase 4B inhibitors: pharmacophore-based virtual screening, docking, and molecular dynamics simulations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2017 v. 35, n. 6, p. 1339-1349.

SCHENONE, Monica *et al*. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. **Nature chemical biology**, 2013, v. 9, n. 4, p. 232.

SHI, D. *et al.* Co-treatment of THP-1 cells with naringenin and curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis via numerous pathways. **Molecular Medicine Reports**, 2015. v. 12, n. 6, p. 8223–8228.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. **Gastroenterology**, 2007. v. 132, n. 6, p. 2169–2180.

SILVA, M. M *et al*. O uso crônico de anti-inflamatórios não-esteroidais e seus efeitos adversos. **Cadernos da Medicina-UNIFESO**, 2019, v. 2, n. 2.

SINGH, R. *et al*. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129-146, 2001.

SINGH, V. P. *et al.*Advanced glycation end products and diabetic complications. **The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, 2014. v. 18, n. 1, p. 1–14.

SMITH, C. J. *et al.* Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1998. v. 95, n. 22, p. 13313–13318.

SOULIS, T. *et al.* Relative contributions of advanced glycation and nitric oxide synthase inhibition to aminoguanidine-mediated renoprotection in diabetic rats. **Diabetologia**, 1997. v. 40, n. 10, p. 1141–1151.

SOUZA, R. J. D *et al.*Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMJ (Clinical research ed.)**, 2015. v. 351, p. h3978.

SPÍNOLA, V. *et al.* Ulex europaeus: From noxious weed to source of valuable isoflavones and flavanones. **Industrial Crops and Products**, 2016. v. 90, p. 9–27.

STEFANI, H. A. *et al.* Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of 3-(triazolyl)-coumarin derivatives: Effect on inducible nitric oxide synthase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2012. v. 58, p. 117–127.

STEWART, J. J. P. Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, 2016. HTTP://OpenMOPAC.net

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**. 2013, v.19, p. 1-32,

STOMPOR, M.; URAM, Ł.; PODGÓRSKI, R. In vitro effect of 8-prenylnaringenin and naringenin on fibroblasts and glioblastoma cells-cellular accumulation and cytotoxicity.

Molecules, 2017, v. 22, n. 7, p. 1092,.

SUCUPIRA, N. R. *et al.*Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, 2012. v. 14, n. 4, p. 263–269.

SUCUPIRA, N. R. *et al.* Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, 2014. v. 14, n. 4, p. 263–269.

TANRIKULU, Y.; SCHNEIDER, G. Pseudoreceptor models in drug design: bridging ligand- and receptor-based virtual screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2008. v. 7, n. 8, p. 667–677.

TORRES, Rafael Carvalho *et al*. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticoides. 2012.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v.30, p. 455–461, 2010.

TÜRKKAN, B *et al*. Synthesis, characterization and antioxidant capacity of naringenin-oxime. Spectrochimica Acta Part A: **Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2012, v. 85, n. 1, p. 235-240.

VASQUES, A. C. J. *et al.*Análise crítica do uso dos índices do Homeostasis Model Assessment (HOMA) na avaliação da resistência à insulina e capacidade funcional das células-beta pancreáticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2008. v. 52, n. 1, p. 32–39.

VOLP, A. C. P. *et al.* Capacidade dos Biomarcadores Inflamatórios em Predizer a Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab 2008; 52/3:537-549**, 2008. v. 52, n. 3, p. 537–549.

WANG, C.; BRADLEY, P.; BAKER, D. Protein-Protein Docking with Backbone Flexibility. **Journal of Molecular Biology**, 2007. v. 373, n. 2, p. 503–519.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, 2006, v. 17, n. 6, p. 300-312.

WEYER, C. *et al.* The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **The Journal of clinical investigation**, 1999. v. 104, n. 6, p. 787–794.

WEI, Zhi-Yu *et al*. Synthesis and biological evaluation of chalcone derivatives containing aminoguanidine or acylhydrazone moieties. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 2016, v. 26, n. 24, p. 5920-5925.

WYNN, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. **The Journal of clinical investigation**, 2007, v. 117, n. 3, p. 524-529.

XIAO, Y. C. *et al.* Identification of Multiple Constituents in Shuganjieyu Capsule and Rat Plasma after Oral Administration by Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization and Ion Trap Mass Spectrometry. **Acta Chromatographica**, 2017. p. 1–8.

XIE, J.; MÉNDEZ, J. D.; MÉNDEZ-VALENZUELA, V.; AGUILAR-HERNÁNDEZ, M. M. (2013). Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). **Cellular signalling**, 2013, v. 25, n. 11, p. 2185-2197.

YANG, G. E. *et al.* Phenolic constituents from the stems of Acanthopanax senticosus. **Chemistry of Natural Compounds**, 2011. v. 46, n. 6, p. 876–879.

YAMAUCHI, Y.; NAGASE, T. New Anti-inflammatory Drugs for COPD: Is There a Possibility of Developing Drugs That Can Fundamentally Suppress Inflammation?. In: Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Springer, Singapore, 2017. p. 267-278.

YE, M. *et al.* Characterization of flavonoids in Millettia nitida var. hirsutissima by HPLC/DAD/ESI-MSn. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2012. v. 2, n. 1, p. 35–42.

YEH, W. J. *et al.* Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. **Journal of Food and Drug Analysis**, 2017. v. 25, n. 1, p. 84–92.

ZHANG, L *et al*. Comparative study of the binding of 3 flavonoids to the fat mass and obesity-associated protein by spectroscopy and molecular modeling. Journal of Molecular Recognition, 2017, v. 30, n. 6, p. e2606.

ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. Clinical Section Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance – A Mini-Review. **Gerontology**, 2009. v. 55, p. 379–386.

ZINGARELLI, B. *et al.* The inhibitory effects of mercaptoalkylguanidines on cyclo-oxygenase activity. **Br.J.Pharmacol.**, 1997. v. 120, n. 3, p. 357–366.

ZHONG, Jiasheng *et al*. Chemical constituents of Aloe barbadensis Miller and their inhibitory effects on phosphodiesterase-4D. **Fitoterapia**, 2013, v. 91, p. 159-165.

ZHU, Jian *et al*. X-ray crystal structure of phosphodiesterase 2 in complex with a highly selective, nanomolar inhibitor reveals a binding-induced pocket important for selectivity. **Journal of the American Chemical Society**, 2013, v. 135, n. 32, p. 11708-11711.