



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA

**ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA DA 4-METOXICALCONA
ISOLADA E NANOENCAPSULADA**

Leonard Domingo Rosales Acho

MANAUS
2023



LEONARD DOMNGO ROSALES ACHO

**ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA DA 4-METOXICALCONA
ISOLADA E NANOENCAPSULADA**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Inovação Farmacêutica da
Universidade Federal do Amazonas,
como requisito para obtenção do título
de Doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Emersom Silva Lima

MANAUS-AM

2023

Ficha Catalográfica

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

A179a Acho, leonard domingo rosales
Atividade antidiabética da 4-metoxichalcona isolada e
nanoencapsulada / leonard domingo rosales Acho . 2023
208 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Emersom Silva Lima
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Diabetes. 2. glicação. 3. nanocápsula. 4. insolubilidade. 5.
toxicidade. I. Lima, Emersom Silva. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

“Atividade antidiabética da 4-metoxichalcona isolada e nanoencapsulada”

DISCENTE: LEONARD DOMINGO ROSALES ACHO

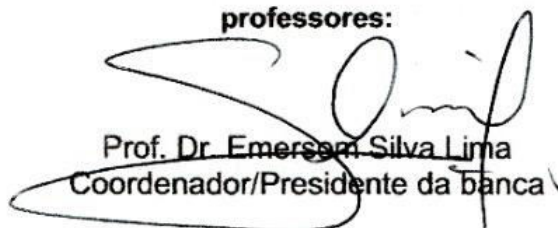
PARECER:

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM, 28/04/2023.

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes

professores:


Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador/Presidente da Banca

Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges
Membro (UFPA)

Documento assinado digitalmente
ROSIVALDO DOS SANTOS BORGES
Data: 12/05/2023 07:54:59 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Tatiane Pereira de Souza
Membro (UFAM)

Documento assinado digitalmente
TATIANE PEREIRA DE SOUZA
Data: 14/05/2023 20:23:01-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Membro (URCA)

Documento assinado digitalmente
IRWIN ROSE ALENCAR DE MENEZES
Data: 11/05/2023 17:55:53-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>


Profa. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho
Membro (UFAM)

Primeiramente a gradeço a Deus por ser o autor do meu destino.

Agradeço imensamente aos meus pais por serem a base sólida e essencial que impulsionou cada passo da minha jornada. Com amor e dedicação incansável, eles foram os verdadeiros pilares que me conduziram até esta fase da minha vida. Sou profundamente grato pelo constante apoio e incentivo que me proporcionaram, moldando quem sou e quem serei. Seu amor e sacrifício são a fundação sobre a qual construo meu futuro.

Quero expressar minha profunda gratidão à minha querida esposa, cujo apoio carinhoso me fortaleceu e inspirou nas horas difíceis. Seu amor incondicional foi minha luz nos momentos de desafio. Também quero agradecer ao meu amado filho, cuja presença especial ilumina meu coração e mente de maneira extraordinária. Seu sorriso e sua energia são um constante lembrete do que é mais importante na vida.

Desejo expressar minha mais profunda gratidão ao meu orientador, cujo apoio incansável e orientação valiosa foram essenciais ao longo da minha jornada de doutorado. Sua vasta experiência, entusiasmo contagiante, paciência inestimável e dedicação ao meu projeto foram os pilares fundamentais que impulsionaram o sucesso da minha pesquisa.

Estendo meus agradecimentos aos professores, cujo conhecimento e colaboração foram fundamentais para tornar este trabalho uma realidade. Não posso deixar de mencionar meus colegas de trabalho do BIOPHAR, FITOPHAR e LIDETEF, laboratório Espectrometria de Massas da Universidade Federal do Amazonas, pelo valioso suporte prestado, em especial a Edinilse, Leilane, Angela Comapa, Marcia de Jesus, Talita Machado, Barbara Janaína, Isabella e Serafim, entre outros pelos momentos compartilhados e pela contribuição inestimável ao projeto. Seu apoio e parceria foram essenciais para o sucesso deste trabalho.

*Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e
de repente você estará fazendo o impossível.*

São Francisco de Assis

RESUMO

O diabetes mellitus, uma alteração metabólica resultante de defeitos na secreção ou produção de insulina, tornou-se um sério problema de saúde pública em todo o mundo. Dadas as implicações das alterações metabólicas causadas pela diabetes na sociedade, economia e qualidade de vida, a busca por novas alternativas terapêuticas para essa doença é de extrema importância. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antidiabética da 4-metoxichalcona isolada (MPP) e de sua formulação nanoencapsulada (NC), por meio de ensaios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, a MPP foi sintetizada utilizando a reação de condensação de Claisen-Schmidt e, posteriormente, caracterizada e quantificada por RMN e espectrometria de massas. A nanoencapsulação do MPP resultou em uma formulação estável e de liberação prolongada, com características favoráveis, incluindo uma distribuição monomodal com tamanho de $187 \pm 3,85$ nm, potencial zeta de $-19,9 \pm 0,72$ mV, índice de polidispersão de $0,21 \pm 0,007$ e condutividade de $0,041 \pm 0,004$ mS. Essa formulação demonstrou estabilidade em ampla faixa de temperaturas (10°C a 80°C) e pH (1 a 5). A MPP apresentou resultados promissores, demonstrando ausência de toxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, exibiu efeito hipoglicemiante em camundongos saudáveis e diabéticos durante o teste de tolerância oral à glicose (TTOG), embora não tenha apresentado o mesmo efeito no teste de tolerância oral à sacarose (TTOS). A administração oral tanto da MPP isolada quanto de sua formulação nanoencapsulada demonstrou efeito hipoglicemiante em camundongos diabéticos após tratamento de 7 semanas. Os níveis de glicemia obtidos com a nanocápsula contendo MPP (NC10 = 166 ± 58) na dose de 10 mg kg^{-1} pc, metformina (MET200 = 199 ± 64) e MPP (MPP200 = 123 ± 44) na dose de 200 mg kg^{-1} pc foram estatisticamente equivalentes ao grupo não diabético (GN = 121 ± 15), indicando que a nanoencapsulação potencializou em 20 vezes o efeito antidiabético da MPP. Além disso, foi observado um efeito antiglicante *in vitro*, e esses resultados foram corroborados pela redução dos níveis de HbA1c (%) nos grupos MET200, MPP200 e NC10, alcançando níveis comparáveis ao grupo não diabético (GN). É relevante destacar que o controle da glicemia foi alcançado sem causar dano hepático, conforme comprovado pelas baixas concentrações de malonaldeído ($\mu\text{mol/g}$) e pela histologia hepática. Esses resultados são de extrema relevância, uma vez que a MPP é uma molécula de baixo custo e de fácil obtenção. O desenvolvimento de uma nanoformulação ativa contendo essa molécula mostra-se como uma excelente opção terapêutica para o tratamento do diabetes. Assim, esse estudo contribui significativamente para a busca de novas abordagens farmacológicas no combate a essa doença metabólica crônica. Entretanto, são necessárias futuras investigações e ensaios clínicos para validar completamente o potencial terapêutico e a segurança dessa nanoformulação, de forma a viabilizar sua aplicação clínica e seu potencial como um medicamento eficaz no tratamento do diabetes mellitus.

Palavras-chave: Diabetes, glicação, nanocápsula, insolubilidade, toxicidade.

ABSTRACT

Diabetes mellitus, a metabolic disorder resulting from defects in insulin secretion or production, has become a serious public health problem worldwide. Given the implications of metabolic alterations caused by diabetes on society, economy, and quality of life, the search for new therapeutic alternatives for this disease is of utmost importance. In this context, the present study aimed to evaluate the antidiabetic activity of isolated 4-methoxychalcone (MPP) and its nanoencapsulated formulation (NC), through *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* assays. Initially, MPP was synthesized using the Claisen-Schmidt condensation reaction and subsequently characterized and quantified by NMR and mass spectrometry. The nanoencapsulation of MPP resulted in a stable and sustained release formulation with favorable characteristics, including a monomodal distribution with a size of 187 ± 3.85 nm, zeta potential of -19.9 ± 0.72 mV, polydispersity index of 0.21 ± 0.007 , and conductivity of 0.041 ± 0.004 mS. This formulation demonstrated stability over a wide range of temperatures (10 °C to 80 °C) and pH (1 to 5). MPP showed promising results, demonstrating no toxicity both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, it exhibited hypoglycemic effects in both healthy and diabetic mice during the oral glucose tolerance test (TTOG), although it did not have the same effect in the oral sucrose tolerance test (TTOS). Oral administration of both isolated MPP and its nanoencapsulated formulation demonstrated hypoglycemic effects in diabetic mice after 7 weeks of treatment. The glycemia levels obtained with the MPP-containing nanocapsule (NC10 = 166 ± 58) at a dose of 10 mg/kg bw, metformin (MET200 = 199 ± 64), and MPP (MPP200 = 123 ± 44) at a dose of 200 mg/kg bw were statistically equivalent to the non-diabetic group (GN = 121 ± 15), indicating that nanoencapsulation potentiated the antidiabetic effect of MPP by 20 times. Additionally, an antiglycation effect was observed *in vitro*, and these results were confirmed by the reduction of HbA1c levels (%) in the MET200, MPP200, and NC10 groups, reaching levels comparable to the non-diabetic group (GN). Importantly, glycemic control was achieved without causing hepatic damage, as evidenced by the low malondialdehyde concentrations ($\mu\text{mol/g}$) and liver histology. These results are of great significance, as MPP is a low-cost and readily available molecule. The development of an active nanoformulation containing this molecule proves to be an excellent therapeutic option for diabetes treatment. Thus, this study significantly contributes to the search for new pharmacological approaches in the fight against this chronic metabolic disease. However, further investigations and clinical trials are necessary to fully validate the therapeutic potential and safety of this nanoformulation, enabling its clinical application and potential as an effective medication for diabetes mellitus treatment.

Keywords: Diabetes, glycation, nanocapsule, insolubility, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fisiopatologia diabética, estado hiperosmolar cetônico. Fonte adaptado do Baynes, 2011	29
Figura 2: Fisiopatologia diabética, estado hiperosmolar não cetônico. Fonte adaptado do Baynes, 2011.	30
Figura 3: Glicotoxicidade por via alternativa do poliol. Fonte: adaptado de Brownlee, 2001	32
Figura 4: Fisiopatologia celular por acúmulo de sorbitol. Fonte: Adaptado de Champe., P. C. 2006.....	102
Figura 5: Efeito do diacilglicerol em um estado de hiperglicemia. Fonte adaptado de Brownlee, 2001.....	103
Figura 6: Rotas de formação dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs). Fonte: Adaptado de Vistoli et al., 2013.....	106
Figura 7: Ativação dos Receptores AGEs (RAGEs) por Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs). Fonte: Adaptado de Mesquita, 2014.....	107
Figura 8: sistema de sinalização intracelular do receptor de insulina ativado. Fonte: adaptado de White, 1997.....	110
Figura 9: Mecanismo de resistência insulina por PTP1B. Fonte: adapto de FELDHAMMER, 2013.....	111
Figura 10: Organograma de planejamento e elaboração dos ensaios realizados.....	116
Figura 11: Síntese da 4-metoxichalcona: p-metoxi-benzaldeído (A), acetofenona (B).....	117

Artigo 01:

figura 1: ¹ H NMR amplificação de espectro e região 7.0 – 8.3 ppm de 4-metoxichalcona (MPP) (DMSO-d ₆ , 500 MHz).....	135
figura 2: Cálculo de docking de MPP em sítios ativos da BSA representando interações 3D e 2D no sítio da droga 1 (a) e representando interações 3D e 2D no sítio da droga 2 (b).	137
figura 3: Visualização das interações dos ligantes Sitagliptina (A) e MPP (B) no sítio de ligação da enzima DPP-IV.....	139
figura 4: Visualização das interações dos ligantes ácido benzóico 2-(oxalilamino) (A) e MPP (B) no sítio de ligação da enzima PTP1B.....	140
figura 5: O efeito da MPP na formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs). Atividade antiglicante por via oxidativa: Cl ₅₀ do MPP (A) e Cl ₅₀ da Quercetina (B). Atividade antiglicante por via não oxidativa: Cl ₅₀ do MPP (C) e Cl ₅₀ da Aminoguanidina (D).	142
figura 6: Atividade hemolítica de MPP na concentração de 420 µM em comparação com o padrão Triton X-100. Resultados com média ± desvio padrão (n=3). ****p < 0.0001. (B) Viabilidade celular do grupo de controle não tratado, controle positivo doxorrubicina a 20 µM (doxo) e MPP em diferentes concentrações por período de 24, 48 e 72 horas em linhagem celular de MRC-5. Resultados foram apresentados em média ± DP (n=3). ns = Não significativa	

($p > 0.05$) vs. grupo de controle não tratado; ** $p < 0.01$ (ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett).....	143
figura 7: Atividade inibitória da acarbose, quercetina e MPP na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ sobre as enzimas α -glucosidase extraída de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e α -glucosidase extraída de pós de acetona intestinal de rato. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP, $n=3$. **** $p < 0.0001$ (ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett).....	144
figura 8: (A) Efeito da administração oral do MPP e acarbose sob a concentração de glicose em camundongos carregados com sacarose. Valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão, $n = 6$. * $p = 0.05$; **** $p < 0.0001$ comparado com grupo controle não tratado. Acarbose100: acarbose 100 mg kg^{-1} pc. (Controle positivo); MPP200: 4-metoxichalcona (200 mg kg^{-1} pc). (B) Efeito da administração oral do MPP e metformina sob a concentração de glicose em camundongos carregados com glicose. Valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão, $n = 6$. * $p = 0.05$; **** $p < 0.0001$ comparado com grupo controle não tratado. (ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test).	146
Figura 9: Efeitos da administração oral de MPP e metformina sobre a concentração de glicose no sangue em camundongos diabéticos hiperglicêmicos. Metformina 200: metformina 200 mg kg^{-1} pc (controle positivo); MPP100 e MPP200: 4-metoxichalcona (100 mg kg^{-1} e 200 mg kg^{-1} de peso corporal, respectivamente). DNTG: grupo controle diabético não tratado. NTG: grupo de camundongos saudáveis não tratados. Os valores são expressos como média $\pm$ Desvio padrão, $n = 6$. ns = não significativo ($p > 0,05$), **** $p < 0,0001$ vs. grupo de controle não tratado (ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett).	147

Artigo 02:

Figura 0 1: Tamanho partículas: $187,13 \pm 3,85 \text{ nm}$ com uma polidispersão de: $0,210 \pm 0,007$ da Nanocápsula	175
Figura 0 2: O Potencial Z $-19,90 \pm 0,72 \text{ mV}$ e condutividade de $0,041 \pm 0,004 \text{ mS}$ da nanocápsula.....	176
Figura 0 3: Efeito do pH sobre o potencial de Zeta da nanocápsula (IeP = ponto isoelétrico).....	177
Figura 0 4: Efeito da temperatura sobre tamanho de partícula e o índice de dispersão da nanocápsula.	178
Figura 0 5: Teste crônico em camundongos diabéticos por 7 semanas. Os camundongos com glicemia superior a 200 mg/dl foram separados e em grupos: Grupo não diabético (GN), Grupo diabético não tratado (GD), metformina 200 mg kg^{-1} (GP200) e os grupos tratados com MPP 100 e 200 mg kg^{-1} (MPP100 e MPP200). Os grupos GN e GD foram tratados com $200 \mu\text{L}$ de veículo (Soro fisiológico). Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM para ($n = 6$). Two way ANOVA multe comparação com teste Dunnett de foi aplicado. Onde: $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ mostram diferencia estatística quando comparado com o Grupo não tratado (GNT) e ^{ns} $p > 0.05$ não apresenta diferencia estatística.....	179
Figura 0 6: Teste crônico em camundongos diabéticos por 7 semanas. Os camundongos com glicemia superior a 200 mg/dl foram separados e em	

grupos: Grupo não diabético (GN), Grupo diabético não tratado (GD), metformina 200 mg kg⁻¹ (GP200) e os grupos tratados com Nanocápsula com MPP 5 e 10 mg kg⁻¹ (NC5 e NC10). Os grupos GN e GD foram tratados com 200µL de veículo (Soro fisiológico). Os valores foram expressos em média ± SEM para (n = 6). Two way ANOVA multie comparação com teste Dunnett de foi aplicado. Onde: p < 0.05 **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001 mostram diferencia estatística quando comparado com o Grupo não tratado (GNT) e ^{ns}p > 0.05 não apresenta diferencia estatística..... 179

Figura 0 7: Mensuração da glicemia (A) e hemoglobina glicada (B) em camundongos diabéticos após 7 semanas de tratamento com MPP e nanocápsula com MPP. Os valores foram expressos em média ± SEM para (n = 6). One way ANOVA os grupos foram comparados com o grupo diabético não tratado (GD) com teste Dunnett de foi aplicado. Onde: p < 0.05 **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001 mostram diferencia estatística quando comparado com o Grupo não tratado (GNT) e ^{ns}p > 0.05 não apresenta diferencia estatística 182

Figura 0 8: Mostra o doseamento da malonaldeído em camundongos diabéticos após 7 semanas de tratamento com MPP e nanocápsula com MPP. Os valores foram expressos em média ± DP para (n = 6). One way ANOVA os grupos foram comparados com o grupo diabético não tratado (GD) com teste Dunnett de foi aplicado. Onde: p < 0.05 **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001 mostram diferencia estatística quando comparado com o Grupo não tratado (GN) e ^{ns}p > 0.05 não apresenta diferencia estatística. 183

Figura 09: Efeito do tratamento em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ), histopatológica do fígado determinado via coloração H & E (aumento de 40x, 50 µm na escala de bar). GN (a), GD (d), MPP200 (b), MPP100 (e), NC10 (c), NC5 (f) e MET 200 (g). h: hepatócito; bh: hepatócito bilateral; s: sinusóide capilar; ds: sinusóide dilatada; gc: conteúdo de glicogênio; Kp: célula de Kupffer; hap: hepatócito em apoptose; hst: hepatócito na esteatose microvesicular; inf: infiltrado inflamatório; seta amarela: esteatose macrovesicular 184

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1:

Tabela 1: Validação de Proteínas.....	138
---------------------------------------	-----

ARTIGO 2:

Tabela 0 1: A composição das nanocápsulas de MPP, compreende as seguintes substâncias e quantidades:	169
Tabela 0 2: Resultados bioquímicos dos camundongos tratados por 7 semanas	181

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,3 BPG	=	1,3 bisfosfoglicerato
4-NPGP	=	4-nitrofenil-D-glucopiranósido
Acarbose100	=	Grupo Acarbose 100 mg kg-1 peso corporal
AGEs	=	Produtos finais da glicação avançada
AGL	=	Ácidos graxos livres
ALT	=	Alanina Aminotransferase
AS	=	Albumina sérica
AST	=	Aspartato aminotransferase
A β	=	Proteína Beta amiloide
CCL ₂	=	Ligante 2 de CC quimiocina/proteína quimiotática de monócitos 1
Cl ₅₀	=	Concentração inibitória do 50 %
CL _T	=	Clearence plasmático
CML	=	Carboximetilisina.
CPA	=	Célula apresentadora de antígeno profissional
CYP3A	=	Citocromo P450 3A4
DAG	=	Diacilglicerol
DAMPS	=	Molécula Padrão Associada a Dano Molecular
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High Glucose
DMSO	=	Dimetilsulfóxido
DPP-4	=	Enzima dipeptidil peptidase 4
DPPH	=	2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo
DPP-IV	=	Dipeptidil peptidase-IV
eNOS	=	Óxido nítrico sintase
ET-1	=	Endotelina 1
F-1,3-P	=	Frutose 1,3 bifostato
FBS	=	Soro bovino fetal
GAPDH	=	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
GC	=	Grupo controle
GC	=	Cromatografia gasosa
GDN	=	Grupo diabetico não Tratado
GLUT	=	Transportadores de glicose.
GND	=	Grupo não diabetico
GNT	=	Grrupo saudavel não tratado
GP	=	Grupo Padrão
GS	=	Glicogênio sintase
GSK3	=	Glicogênio sintase cinase-3
HbA1c	=	Hemoglobina glicada
HMGB1	=	Proteína caixa 1 do grupo de alta mobilidade
HSA	=	Albumina humana sérica
HSK	=	Hormônio sensível a lipase

HSL	=	Hormônio sensível a lipase
I κ B- α	=	Inibidor de kappa B-alfa
IL-1 β	=	Interleucina 1 β
IRS-1	=	Substrato do receptor de insulina 1
IRS-2	=	Substrato do receptor de insulina 2
K _{el}	=	Constante de velocidade.
K _m	=	Constante de Michaelis-Menten
LPL	=	Enzima lipoproteína lipase
LPS	=	Lipopolissacarídeo
MAO B	=	Monoamino Oxidase B
MDA	=	Malonaldeído
Metformina200	=	Grupo Metformina 200 mg kg ⁻¹ peso corporal
MHC	=	Complexo principal de histocompatibilidade
MPP	=	4-metoxichalcona
MPP100	=	Grupo MPP 100 mg kg ⁻¹ peso corporal
MPP200	=	Grupo MPP 200 mg kg ⁻¹ peso corporal
MRC-5	=	Linhagem celular de Fibroblasto de pulmão
MRPs	=	Produto inicial da reação de Maillard
NAD	=	Nicotinamida adenina dinucleótido reduzida
NADH	=	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
NADPH+H ⁺	=	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NAPD	=	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
NC10	=	Grupo Nanocápsula contendo MPP10 mg kg ⁻¹ peso corporal
NC5	=	Grupo Nanocápsula contendo MPP 5 mg kg ⁻¹ peso corporal
NK-kB	=	Factor nuclear kappa B
NPe	=	1-nitro-2-feniletano
OVLT	=	Órgão vascular da Lâmina Terminal
PAI-1	=	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PCR	=	Reação em cadeia da polimerase
P-gp	=	Glicoproteína P
PI3-kinase	=	Enzima fosfatidilinositol-3-quinase
PIP ₂	=	Fosfatidilinositol-2-fosfato
PIP ₃	=	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PKB/Akt	=	Proteína quinase B
PKC	=	Proteína quinase C
PPAR γ	=	Proliferadores de peroxissoma gama
PTK	=	Proteínas tirosinas cinases
PTP	=	Proteínas tirosinas fosfatases
PTP1B	=	Proteína tirosina fosfatase 1B
RAGE	=	Receptor de AGE
RI	=	Receptor de insulina.
RIS -1	=	Receptor de insulina 1
RMN	=	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	=	Espécies reativas ao oxigênio

S100A8/A9	=	Calprotectina.
S100B	=	Calgranulina B
SE	=	Suspensão de eritrócitos
SFO	=	Osmorreceptores do hipotálamo como o órgão subfornical
SNC	=	Sistema nervoso central
SNP	=	Sistema nervoso periférico
TBARS	=	Ácido tiobarbitúrico
TD	=	Tereftalato de dimetila
TEER	=	Resistência transepitelial
TGF- β	=	Fator de transformação de crescimento beta
TGO	=	Enzima transaminase glutâmico oxalacética
TGP	=	Enzima transaminase glutâmico pirúvica
TNF- α	=	Fator de necrose tumoral
TPI	=	Triose fosfato isomerase
TTOG	=	Teste de tolerância oral a glicose
TTOS	=	Teste de tolerância oral a sacarose.
Vd	=	Volume de distribuição.
VEGF	=	Fator de crescimento endotelial vascular
VLDL	=	Lipoproteínas de muito baixa densidade

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
h	Horas
s	Segundo
~	Sinal til
>	Sinal maior
M	Molar
T	Tonelada
cm	Centímetro
km	Quilômetro
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
µg	Micrograma
nm	Nanômetro
mM	Milimol
mg	Milígrama
kg	Quilograma
ng	Nanograma
mm ³	Milímetros cúbicos
mmol	Milimol
min	Minuto
kV	Quilovolt
eV	Elétron-volt
UI	Unidade internacional
Cl _{50%}	Concentração Inibitória de 50%
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso por volume
v/v	Volume por volume

Sumário

1. INTRODUÇÃO	41
2. REVISÃO LITERÁRIA	43
2.1. Diabetes	43
2.2. Diabetes tipo I	46
2.3. Diabetes tipo II	47
2.4 Fisiopatologia	48
2.4.1 Estado hiperosmolar cetônico:.....	48
2.4.2 Estado hiperosmolar não cetônico	50
2.5. Glicotoxicidade:	51
2.5.1. via do poliol:	51
2.5.2 Via do sorbitol:	52
2.5.3 Via da PKC.....	102
2.5.4 Glicação:.....	104
• Mecanismo de toxicidade dos AGEs.....	106
2.6 Tirosina fosfatase: Novo alvo para o tratamento do diabetes	108
2.7. Chalconas e suas propriedades antidiabéticas	111
2.7.1 Inibidores da α -glicosidase	112
2.7.2 Inibidores da PTP1B.....	113
2.7.3. Inibidores da glicação.....	113
2.7.4. Inibidores da DPP-IV	114
2.8. 4-Metoxichalcona (MPP).....	114
3. OBJETIVOS	115
3.1. Objetivo Geral	115
3.2. Objetivos específicos:.....	115
4. MATERIAIS E MÉTODOS	116
4.1 Organograma Experimental	116
4.2. Sínteses da 4-metoxichalcona.....	117
4.3. Caracterização química.....	117
4.3.1. Ensaios de elucidação estrutural e pureza por qNMR ^1H	117
4.3.2. Ensaios de Elucidação Estrutural por Espectroscopia de Massas....	118
4.4. Doking Molecular	119
4.4.1 Farmacocinética: Distribuição. - Albumina.....	119
4.4.2 Atividade sob a DPP-IV e PTP1B.....	119
4.5. Atividade antiglicante: Via oxidativa	120
4.6. Atividade antiglicante: Via não oxidativa	121
4.7. Inibição da α-glicosidase de murino	121

4.8. Inibição da α-glicosidase de <i>Saccharomyce</i>.....	121
4.9. Teste de Hemólise	121
4.10. Teste de viabilidade celular:	122
4.11. Preparação do Nanoencapsulado.	122
4.12. Tamanho e morfologia da gota.....	123
4.13. Potencial Zeta e condutividade	123
4.14. Efeito do pH	123
4.15. Efeito térmico	124
4.16. Testes <i>in vivo</i>	124
4.16.1 <i>Animals</i>	124
4.16.2 <i>Teste de tolerância oral a sacarose (TTOS)</i>	125
4.16.3 <i>Teste de tolerância oral a glicose (TTOG)</i>	125
4.16.4 <i>Teste de tolerância oral a glicose (TTOG) com camundongos diabéticos.</i>	125
4.16.5 <i>Teste de Atividade Hipoglicemiante Crônico DM2</i>	125
4.16.6 <i>Coleta de sangue e órgãos do teste crônico.</i>	126
4.16.7 <i>Analises Bioquímicas</i>	126
4.16.9 <i>Análise Histológica</i>	127
4.17 Análises estatísticas.....	128
5 RESULTADOS.....	129
ARTIGO 1.....	130
Síntese, caracterização química e atividade antidiabética da 4-metoxicalcona.....	130
1. Introdução	132
2. Resultado e Discussão:.....	134
2.1 <i>Analises químico</i>	134
2.2 <i>Docking molecular: distribuição pela albumina.</i>	135
2.3 <i>Doking Molecular: Validação das proteínas.</i>	137
2.4 <i>Doking: Enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-4, PDB: 4A5S) PMID: 22177783.</i>	138
2.5 <i>Proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B, PDB: 1C83) PMID: 19032093</i>	140
2.6 <i>Atividade antiglicante</i>	141
2.7 <i>Atividade hemolítica e efeito citotóxico em células MRC-5 cell</i>	142
2.8 <i>Inibição da α-Glicosidase</i>	143
2.9 <i>Teste de toxicidade aguda:</i>	145
2.10 <i>Efeito hipoglicemiante</i>	145

3	Desenho
experimental.....	148
3.1 Materiais.....	148
3.2 Sínteses	148
3.3 Caraterização por NMR e ESI-MS/MS.....	149
3.4 Determinação de pureza por qNMR ¹ H.....	150
3.5 Docking Molecular:.....	151
3.5.1 Farmacocinética: distribuição.....	151
3.5.2 Atividade sob a DPP-IV e PTP1B.....	152
3.6 Ensaio In vitro	152
3.6.1 Ensaio glicação Albumina Bobina Sérica (BSA).....	152
3.6.2 Ensaio inibição in vitro α -glucosidase.....	153
3.6.3 Teste hemolítico	154
3.6.4 Teste de viabilidade celular	154
3.7 Ensaios in vivo	155
3.7.1 Animals	155
3.7.2 Teste de tolerância oral a sacarose (TTOS).....	155
3.7.3 Teste de tolerância oral a glicose (TTOG).....	156
3.7.4 Teste de tolerância oral a glicose (TTOG) em camundongos diabéticos	156
3.8 Análises estatística.....	157
4 Conclusão.....	157
ARTIGO 2.....	164
Efeito anti-diabético de um sistema polimerico nanodisperso contendo 4-metoxichalcona	164
1. Introdução.....	167
2. Material e métodos	168
2.1 Produtos químicos.	168
2.2 Síntese da MPP.....	169
2.3 Preparação do Nanoencapsulado.	169
2.4 Tamanho e morfologia da gota	170
2.5 Potencial Zeta e condutividade.....	170
2.6 Efeito do pH	170
2.7 Efeito térmico	171
2.8 Animais	171
2.9 Indução do diabetes:	171
2.10 Teste de Atividade Hipoglicemiante Crônico DM2.....	172
2.11 Coleta de sangue e fígado do teste crônico.....	172

2.12	<i>Análises Bioquímicas</i>	173
2.13	<i>Dosagem de malonaldeído (MDA)</i>	173
2.14	<i>Análise Histológica</i>	173
2.15	<i>Análises estatísticas</i>	174
3	Resultados e Discussão	174
3.1	<i>Tamanho de partícula</i>	174
3.2	<i>Potencial Zeta e condutividade</i>	175
3.3	<i>Efeito do pH</i>	176
3.4	<i>Efeito térmico</i>	177
3.5	<i>Teste de Atividade Hipoglicemiante</i>	178
4	Conclusão	185
6.	CONCLUSÕES GERAIS	190
7.	APÊNDICE I: MINI CURRICULUM	205
8.	APÊNDICE II: Certificado do CEUA	209

1. INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos têm proporcionado inúmeras facilidades em nossas vidas, desde atender necessidades básicas como saúde, educação e alimentação até aspectos mais complexos, como trabalho e lazer. No entanto, infelizmente, esse estilo de vida moderno tem levado a um aumento do sedentarismo, gerando um sério problema de saúde pública. Atualmente, cerca de 537 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos são diagnosticadas com diabetes em todo o mundo. No Brasil, dados da Federação Internacional de Diabetes (IFD) mostram um aumento de 26,6% no número de pacientes diabéticos nos últimos 10 anos, afetando 10 de cada 100 brasileiros.(DIABETES, 2021; MALTA *et al.*, 2019).

O diabetes afeta diretamente a qualidade de vida das famílias, pois a hiperglicemia crônica desencadeia várias comorbidades ou complicações ligadas diretamente como o diabetes. Entre elas, destacam-se a glicotoxicidade que aumenta a liberação de radicais livres (CRUZ H. J., *et al.*, 2011; DARIEL, 2006) e produtos finais da glicação avançada (AGEs) (HARTOG; VOORS; BAKKER; SMIT *et al.*, 2007);(VISTOLI; DE MADDIS; CIPAK; ZARKOVIC *et al.*, 2013), a nefrotoxicidade que vai levar ao aumento da pressão arterial (PAVLOU, *et al.*, 2018; SMULYAN; LIEBER; SAFAR, 2016) e insuficiência cardíaca (GIACCO; BROWNLEE, 2010; LEHRKE; MARX, 2017; SHAH; BROWNLEE, 2016), neurotoxicidade que afeta a 50% dos diabéticos¹¹, genotoxicidade causando mudanças do material genético podendo levar ao desenvolvimento de câncer (CAMPBELL *et al.*, 2016; CHISTÉ; *et al.*, 2019; NEELOFAR *et al.*, 2016), redução do sistema imunológico que vai aumentar a predisposição a infecções (DAGOGO, 2016; JURANEK *et al.*, 2015).

Essas complicações estão diretamente associadas ao diabetes e impactam significativamente a saúde e o bem-estar das pessoas afetadas.

Diante da magnitude do problema causado pelo diabetes, é crucial buscar alternativas farmacológicas mais eficazes, com custo e efeitos colaterais reduzidos (ELEFTHERIOU *et al.*, 2019). Na procura de novos fármacos, as chalconas chamam fortemente nossa atenção por possuir no seu repertório uma ampla gama de atividades farmacológicas (CHEN *et al.*, 2018; HSIEH *et al.*, 2012). Onde a 4-metoxichalcona (MPP) mostrou *in vitro* um histórico de atividades interessantes para a medicina, como anti-inflamatório (SHIH *et al.*, 2018), antitumoral em várias linhagens celulares (CABRERA *et al.*, 2007; NETO *et al.*, 2022) e hipoglicemiante ao estimular a captação de glicose em adipócitos 3T3-L1 (HSIEH *et al.*, 2012).

No entanto, o desenvolvimento em escala industrial do MPP tem enfrentado limitações, pois a insolubilidade do MPP em água restringe sua utilidade por via oral, uma vez que sua absorção é limitada. Isso exigiria o uso de doses elevadas para alcançar o efeito desejado. Portanto, os objetivos deste trabalho foi avaliar o efeito antiglicante e antidiabético do MPP, além de desenvolver uma nanoformulação gastroprotetora contendo MPP, afim de aumentar sua solubilidade em água, melhorar e permitir o uso de doses mais baixas para o tratamento do diabetes, evitando toxicidade.

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1. Diabetes

O diabetes é uma condição que afeta o metabolismo da glicose devido a um defeito no receptor de insulina (GLUT-4), presente no tecido muscular e adiposo. Além disso, pode ser causado pela redução ou falta total de insulina devido a problemas na produção desse hormônio. Em ambas as situações, a entrada de glicose na célula é comprometida, levando à hiperglicemia crônica, característica principal dessa doença (MOTTA, 2011).

O pâncreas é um órgão localizado no abdômen, atrás do estômago, próximo ao duodeno, e desempenha importantes funções endócrinas e exócrinas no organismo. Na sua função endócrina, é responsável pela produção e secreção de hormônios, como a insulina, sintetizada pelas células beta (β) e o glucagon, produzido pelas células alfa (α) das ilhotas de Langerhans, que regulam os níveis de glicose no sangue. Como glândula exócrina, o pâncreas produz enzimas digestivas transportadas até o intestino delgado para auxiliar na digestão dos alimentos (BISHOP M. L. e FODY E. P., 2007).

A insulina desempenha um papel fundamental no controle da entrada de glicose nas células do corpo, permitindo que seja utilizada como fonte de energia. Por outro lado, o glucagon possui uma ação oposta à insulina, estimulando a liberação de glicose armazenada no fígado e nos músculos quando os níveis de glicose no sangue estão baixos (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006; KAWAMORI *et al.*, 2011). A entrada de glicose nas células é mediada pela família de transportadores de glicose, que inclui GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3 e GLUT-4, distribuídos por todo o corpo, os transportadores GLUT-1 e GLUT-3 captam a glicose a baixas concentrações, devido à alta afinidade que têm por essa molécula. Por outro lado, o

GLUT-2 tem baixa afinidade e só consegue captar a glicose em altas concentrações. Já o GLUT-4 é dependente da presença de insulina para a sua atividade (BISHOP M. L. e FODY E. P., 2007).

Os transportadores GLUT-1 estão amplamente distribuídos em todos os tecidos corporais, mas são encontrados em maior número no tecido fetal, eritrócitos, rins, células endoteliais da barreira hematoencefálica. Níveis moderados são expressos no fígado, tecido muscular e adiposo, um parâmetro importante a ter em conta é a constante de Michaelis-Menten (K_m) sendo a concentração necessária de glicose para atingir a metade da velocidade máxima de captação pelo GLUT. O GLUT-1 apresenta um K_m baixo de 1 mM, indicando alta afinidade pela glicose (BAYNES J., 2010; TRAYHURN W., 2003).

O GLUT-3 possui um K_m de 1,8 mM e é expresso principalmente na placenta, testículos e especialmente no cérebro, onde transportar glicose dos astrócitos para os neurônios. Os GLUT-2 são encontrados no intestino delgado, túbulos renais e células beta do pâncreas, tem um K_m alto de 15 mM ajudando com a regulação da hiperglicemia, ativando-se em altas concentrações de glicose, estimulando a liberação de insulina e o armazenamento da glicose na forma de glicogênio pelo fígado (BAYNES J., 2010; TRAYHURN W., 2003).

Os transportadores GLUT-4 são dependentes de insulina e encontram-se em vesículas citoplasmáticas em células do tecido muscular e adiposo. Quando a insulina se liga aos receptores de insulina (RI) na membrana dessas células, ocorre uma cascata de reações que mobiliza os receptores GLUT-4 para a membrana celular, permitindo a entrada de glicose no interior da célula e aumentando em até 15 vezes a sua captação. O tecido muscular e tecido adiposo formam a maior massa seca em um indivíduo normal, porém quando estes tecidos não conseguem

interiorizar a glicose devido a falhas nos receptores de insulina, diminuição ou ausência da insulina, provoca um acúmulo de glicose no sangue elevando a glicemia que vai levar ao desenvolvimento do diabetes (CABRERA-CRUZ *et al.*, 2020; CHARRON *et al.*, 2005).

Os principais sintomas encontrados em um paciente diabético são: polidipsia (muita sede), poliúria (aumento da urina) e polifagia (muita fome). A polifagia acontece porque a glicose não consegue ingressar na célula para suprir suas necessidades energéticas, isso faz com que a célula comece a sinalizar ao cérebro para procurar fontes energéticas estimulando assim a sensação de fome, o ciclo se repete várias vezes e o resultado será o mesmo porque a célula não vai conseguir usar a glicose presente no exterior, causando assim um estado de fome constante chamado polifagia (BAYNES J, 2010; NISKANEN; SIITONEN *et al.*, 1992).

Os sintomas de poliúria e polidipsia são causados pelo grande acúmulo excessivo de glicose, o que aumenta a osmolaridade sanguínea e ativa osmorreceptores no hipotálamo, como o órgão subfornical (SFO) e órgão vascular da Lâmina Terminal (OVLT). Quando o sangue alcança o hipotálamo, as células do OVLT e SFO sofrem desidratação ao perder água por osmose, resultado de um meio extracelular mais concentrado devido à presença de glicose. O OVLT e SFO podem detectar níveis de angiotensina II, o OVLT não possui barreira hematoencefálica facilitando assim a detecção da osmolaridade do sangue. Por sua vez, o SFO possui receptores a vasopressina, que estão relacionados com a sensação de sede (ANDERSSON; MCCANN, 1956; BOURQUE; OLIET; RICHARD, 1994).

Este processo visa aumentar a ingestão de água para reduzir a hiperosmolaridade, eliminando o excesso de glicose através da urina e resultando

em aumento da diurese. Inicialmente, os rins conseguem lidar com o aumento da carga de trabalho. No entanto, se essa condição persistir por um período prolongado, pode levar à falência renal (NISKANEN *et al.*, 1992).

A associação americana de diabetes caracteriza um indivíduo como não diabético quando, após um jejum de 8 horas apresenta uma glicemia menor de 100 mg/dl. No teste de tolerância oral a glicose (TTOG), mediante a administração de 75g de glicose, o valor deve ser menor que 140 mg/dl após 2 horas ou menor que 200 mg/dl em uma coleta casual de sangue a qualquer hora do dia. Para o diagnóstico de pré-diabetes, os valores são: glicemia entre 100 mg/dl e 125 mg/dl após jejum de 8 horas, e no TTOG, um valor entre 140 mg/dl e 199 mg/dl. Um indivíduo é considerado com diabetes mellitus quando, após jejum de 8 horas, a glicemia é maior ou igual a 126 mg/dl. No TTOG e na coleta casual, um valor maior ou igual a 200 mg/dl também é indicativo de diabetes (KERNER; BRÜCKEL; ASSOCIATION, 2014; MICHAEL L. BISHOP M; FODY E., 2007).

2.2. Diabetes tipo I

Ocorre nos primeiros anos de vida, é uma doença autoimune com uma ligação genética muito importante com as células e receptores do sistema imunológico, principalmente genes que trabalham com a região do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) classe II do cromossomo 6 expresso nas células apresentadoras de antígenos. um erro genético nesse nível pode levar a uma célula apresentadora de antígeno profissional (CPA) a fagocitar e processar o antígeno erroneamente, apresentando os antígenos das células pancreáticas aos linfócitos T helper. Isso estimula a formação de macrófagos e células T diabetogênicas, como os linfócitos T killer, que atacam parcial ou totalmente as células beta das ilhotas de Langerhans no pâncreas, resultando na diminuição ou ausência total da produção

de insulina(BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010; CHAMPE.; HARVEY.; DENISE R. FERRIER, 2006; SCHERBAUM, 2021).

Na ausência abrupta e progressiva de insulina, característica do diabetes tipo I, ocorre uma prevalência de hormônios contrarreguladores, como o glucagon, cortisol e glicocorticoides. Esses hormônios estimulam o aumento dos níveis de glicose sanguínea, levando a um ambiente altamente catabólico, com a rápida degradação de glicogênio, carboidratos, lipídios e proteínas. Por esse motivo, os indivíduos com diabetes tipo I apresentam uma postura magra e com uma sensação de cansaço constante (LI; HUANG; GAO, 2017).

O único tratamento para o diabetes tipo I é a administração de insulina exógena, cujo principal efeito adverso é a hipoglicemia. Para evitar essa reação indesejada, é necessário um acompanhamento rigoroso dos níveis de glicemia, a fim de calcular a dose de insulina a ser administrada. No pior dos casos que a hipoglicemia aconteça pela insulina exógena, o paciente tem que ter na mão uma fonte externa de glicose (MATHIEU; GILLARD; BENHALIMA, 2017; SIMS *et al.*, 2021).

2.3. Diabetes tipo II

O diabetes tipo 2, também chamado de insulino não dependente, constitui a maioria de casos de diabetes representando 90% da população total de diabéticos. Esse tipo de diabetes está associado ao estilo de vida sedentário, ao aumento da ingestão de comida e bebidas hiper calóricas com uma forte predisposição genética. Ao contrário do diabetes tipo I, o tipo II requer vários anos para se desenvolver e é mais comum entre as idades de 35 e 45 anos, Ocorrendo geralmente na vida adulta em vez dos primeiros anos de vida (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006; BAYNES J., 2010).

No início da doença, ocorre um aumento na concentração de insulina plasmática devido ao desenvolvimento de resistência à insulina nas células. Essa resistência faz com que as células precisem mais deste hormônio para poder captar glicose, resultando em hiperinsulinemia em conjunto com normoglicemia. Essa resposta mostra como o corpo humano luta para manter a homeostase inicialmente. Porém, após um longo período, a resistência à insulina se estabelece, levando ao aparecimento de sintomas, uma vez que as células do tecido muscular e adiposo não conseguem mais captar a glicose extracelular. Nesse cenário hiperglicêmico, as células beta do pâncreas são estimuladas a liberar cada vez mais insulina, o que leva gradualmente à falência desse órgão. Eventualmente, torna-se necessário administrar insulina exógena como parte do tratamento do paciente (CHAMPE.; HARVEY.; FERRIER, 2006; BAYNES J., 2010).

2.4 Fisiopatologia

A fim de entender melhor a fisiopatologia do diabetes, é importante dividi-lo em duas categorias: o estado hiperosmolar cetônico e o não cetônico.

2.4.1 Estado hiperosmolar cetônico:

Acontece devido à ausência da insulina, o que reduz a captação de glicose pelos tecidos muscular e adiposo. Isso leva o cérebro a interpretar como falta de glicose e ativa a ação catabólica no fígado e nos adipócitos através do glucagon. No fígado, este hormônio estimula formação e liberação de glicose a partir do lactato, glicerol e aminoácidos, através da gliconeogênese e a quebra do glicogênio por glicogenólises, acentuando ainda mais a hiperglicemia já estabelecida. Esta hiperglicemia causa hiperosmolaridade que os rins tentam ajustar através da diurese osmótica, resultando em glicosúria, desidratação e posteriormente a falência deste órgão causando disfunção renal (BAYNES J., 2010), como mostrado na figura 01.

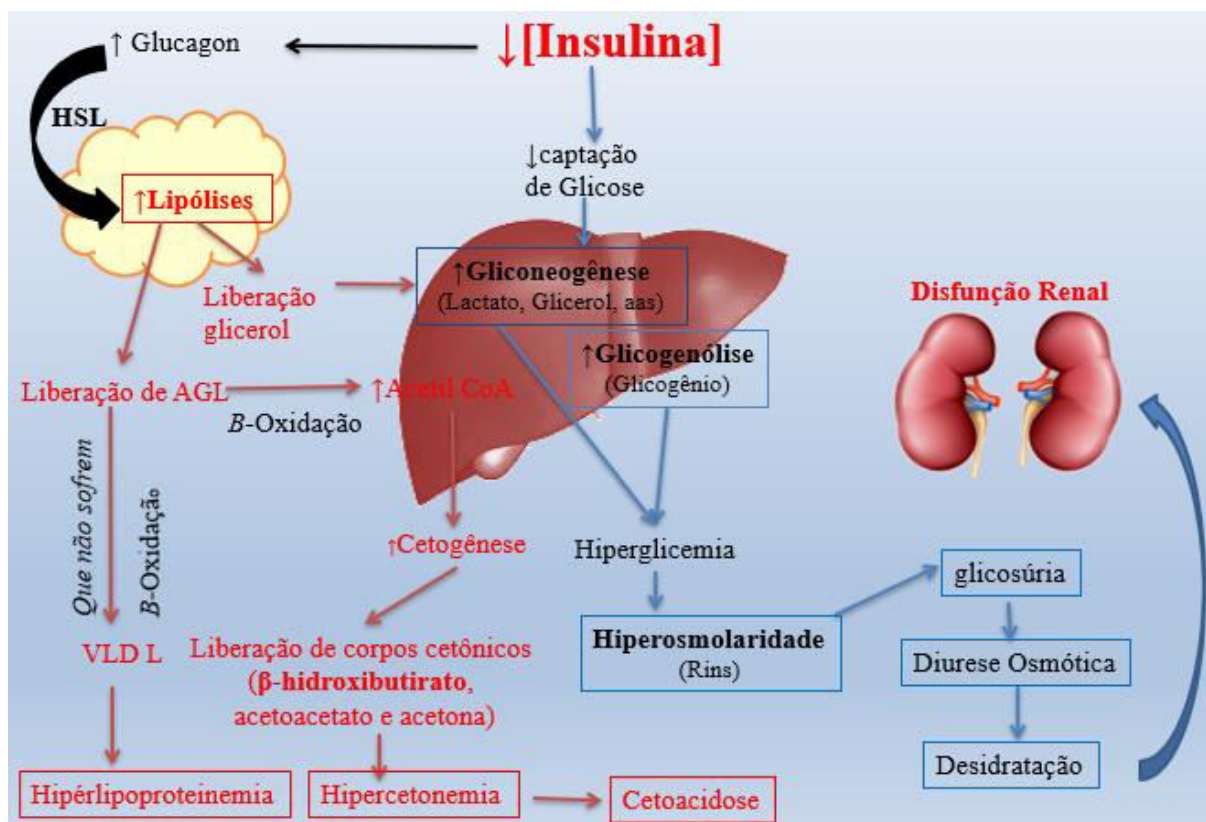


Figura 1: Fisiopatologia diabética, estado hiperosmolar cetônico. Fonte adaptado do Baynes, 2011

O glucagon também aumenta a lipólise principalmente pelo estímulo do hormônio sensível a lipase (HSL) liberando assim glicerol que vai ingressar na gliconeogênese no fígado e ácidos graxos livres (AGL) que vão sofrer β -oxidação aumentando assim a concentração de acetil CoA que depleta o nível de NAD e aumenta o NADH que afeta o ciclo do ácido cítrico forçando que o excesso de acetil-CoA sejam usados na cetogênese para a liberação de corpos cetônicos como β -hidroxibutirato, acetoacetato e acetona, isto causa hipercetonemia que leva a cetoacidose diabética. Os AGL que não são oxidados são usados para formar as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) que vão causar hiperlipoproteinemia como mostrado na figura 01. O aumento de corpos cetônicos no plasma e na urina chegam a ser de até 90 mg/100 ml e de 125 mg/24 horas, sendo absurdamente

maior quando comparados com uma pessoa saudável com 3 mg/100 ml e de 5g/24 horas (CHAMPE; HARVEY.; FERRIER, 2006; IMBALZANO *et al.*, 2017).

2.4.2 Estado hiperosmolar não cetônico

Na presença de insulina, ocorre a ativação da enzima lipoproteína lipase (LPL) devido à hiperinsulinemia. Essa enzima reduz a sensibilidade dos receptores de insulina (RI) por acúmulo de AGL causando a resistência insulínica no tecido muscular e adiposo, este evento diminui a captação de glicose plasmática por estes tecidos causando assim a hiperglicemia. O LPL é responsável pela hidrólise dos ácidos graxos transportados pela VLDL. A hiperinsulinemia inibe a ação do glucagon, impedindo a cetogênese. Isso explica por que o estado hiperosmolar não cetônico não apresenta cetoacidose diabética (CHAMPE.; HARVEY.; FERRIER D., 2006; CLOETE, 2022; W. H., 2011), como mostrado na figura 02.

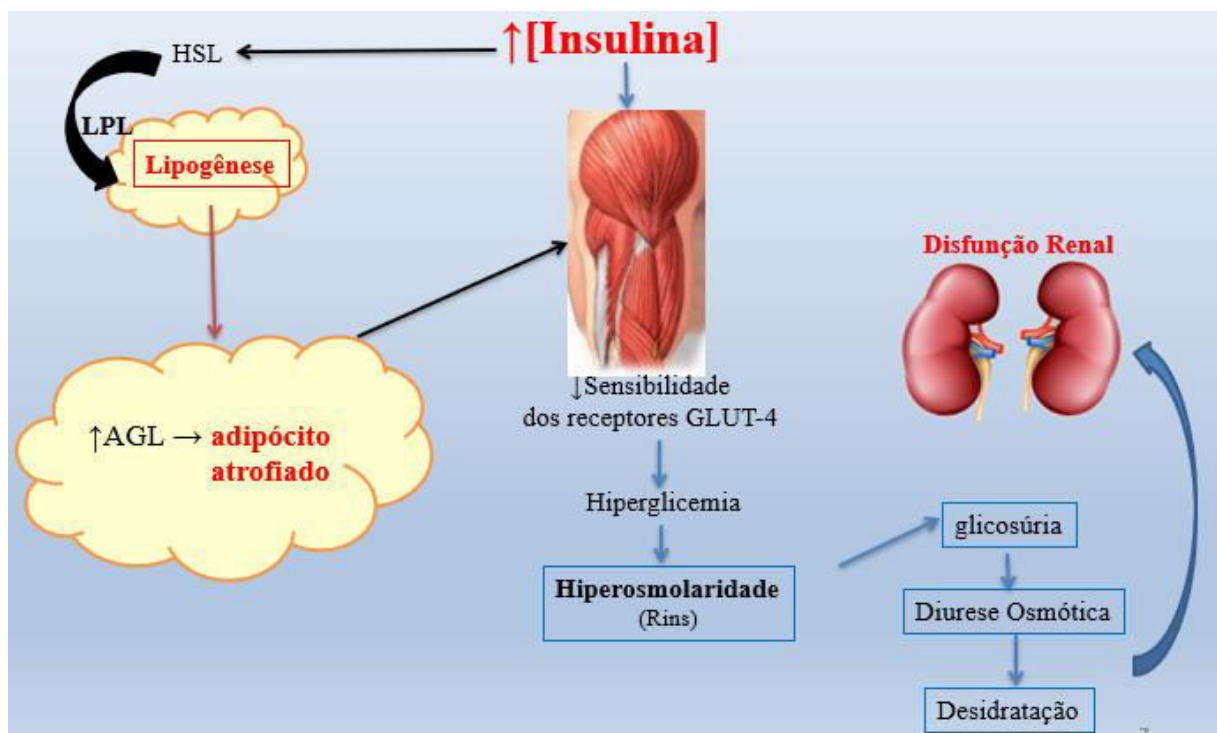


Figura 2: Fisiopatologia diabética, estado hiperosmolar não cetônico. Fonte adaptado do Baynes, 2011.

A obesidade é o principal causante da resistência insulínica, mas, por si só, a resistência à insulina não causa o diabetes. É necessário ocorrer uma falha na função das células β do pâncreas para o desenvolvimento da doença. A insulina é capaz de manter a glicemia em valores normais através da hiperinsulinemia, mas se esse estado se manter por vários anos o pâncreas vai sofrer uma grande sobrecarga de trabalho e as células β vão começar a se deteriorar (CHAMPE.; HARVEY.; FERRIER D., 2006).

2.5. Glicotoxicidade:

Existem 5 vias que causam a glicotoxicidade e estas são: via do poliol, via do sorbitol, via da proteína quinase C (PKC) e glicação.

2.5.1. via do poliol:

É uma rota alterna à glicólise. Normalmente, a atividade dessa via é baixa, devido à alta K_m da enzima aldose redutase, o que indica baixa afinidade pela glicose. No entanto, em condição de hiperglicemia, a atividade dessa rota aumenta. Nesse processo, a glicose é metabolizada em sorbitol com ajuda da aldose redutase, levando a depleção do $NADPH+H^+$. Esse cofator também é usado por enzimas antioxidantes, que aumenta o estresse oxidativo no interior celular, além de disso, o sorbitol é convertido em frutose pela sorbitol desidrogenase, usando o NAD^+ como cofator, essa conversão afeta a glicose, pois inibe a gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH), que precisa do NAD^+ para converter o gliceraldeído 3 fosfato em 1,3 bisfosfoglicerato (1,3BPG). Esse cenário estimula a via do PKC e a formação de AGEs (BROWNLEE, 2001; KRAUSE; WEGNER, 2020), como mostrado na figura 03

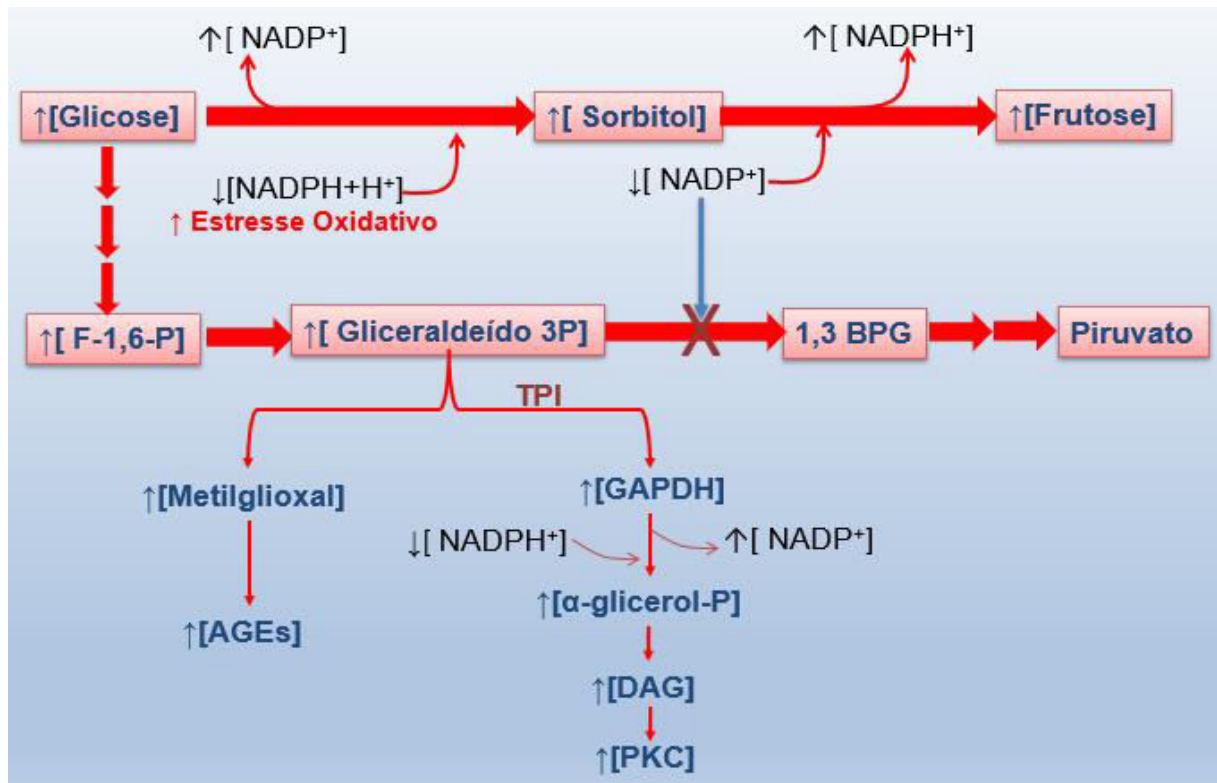


Figura 3: Glicotoxicidade por via alternativa do poliol. Fonte: adaptado de Brownlee, 2001

Frutose 1,3 bifostato (F-1,3-P),
triose fosfato isomerase (TPI),
diacilglicerol (DAG)
1,3 bisfosfoglicerato (1,3 BPG)
gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH)
diacilglicerol (DAG)
Proteína cinase C (PKC)
produtos finais da glicação avançada (AGEs)

2.5.2 Via do sorbitol:

A diferença entre o sorbitol e a frutose, é que o sorbitol tem dificuldade em atravessar a membrana celular, ao contrario da frutose que pode fazê-lo facilmente. A enzima sorbitol desidrogenase é a encarregada de metabolizar o sorbitol para frutose, evitando assim seu acúmulo celular. No entanto, o problema ocorre nas células que carecem desta enzima e não dependem de insulina para interiorizar a glicose. Essa situação causa inchaço e tumefação, principalmente nas células do rim, eritrócito, placenta, células do sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso

periférico (SNP), ovário, célula do cristalino e a retina do olho (CRUZ *et al.*, 2011)(CHAMPE.; HARVEY.; FERRIER, 2006; DARIEL, 2006), como mostra a figura 04.

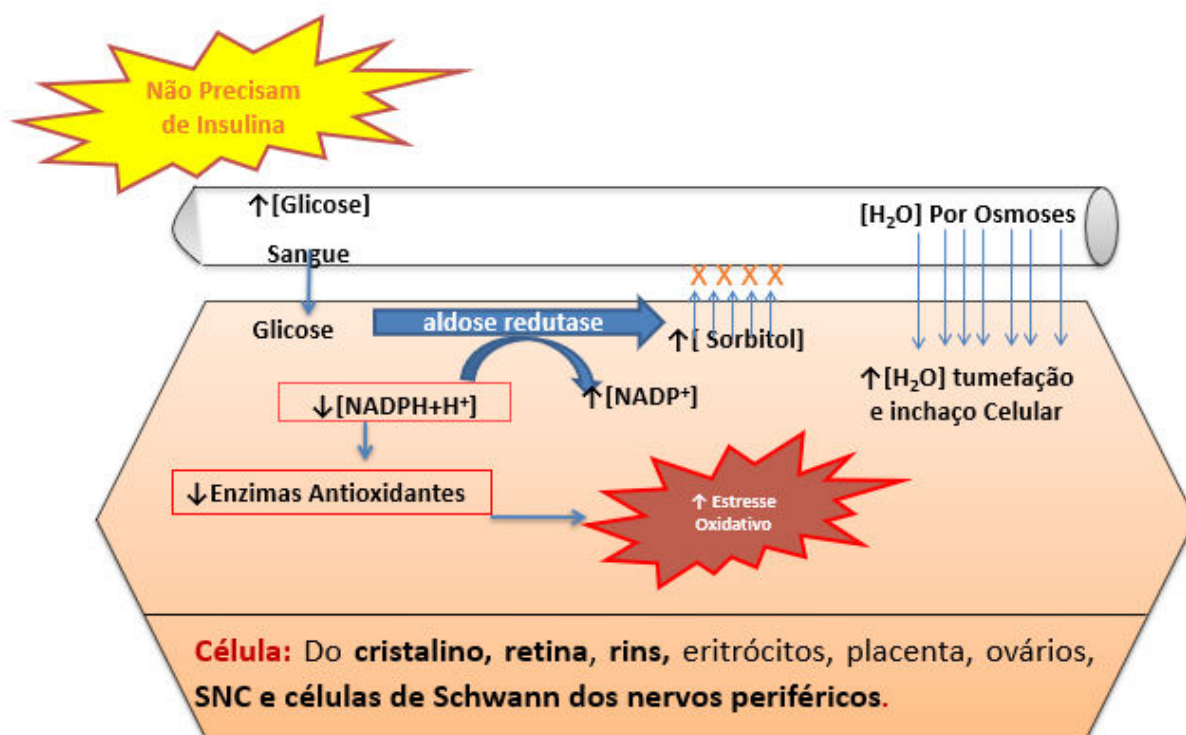


Figura 4: Fisiopatologia celular por acumulo de sorbitol. Fonte: Adaptado de Champe., P. C. 2006.

2.5.3 Via da PKC

O aumento da glicemia aumenta a concentração de diacilglicerol (DAG) como mencionado anteriormente, além disso, esse aumento é particularmente observado nas isoformas β e δ , o que resulta em maior expressão de endotelina 1 (ET-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), fator nuclear kappa B (NK-kB), NAD(P)H oxidase. Ao mesmo tempo, a expressão do óxido nítrico sintase (eNOS) é reduzida. Essas alterações moleculares podem levar ao

desenvolvimento de várias patologias no paciente diabético (BROWNLEE, 2001), como mostrado na figura 05.

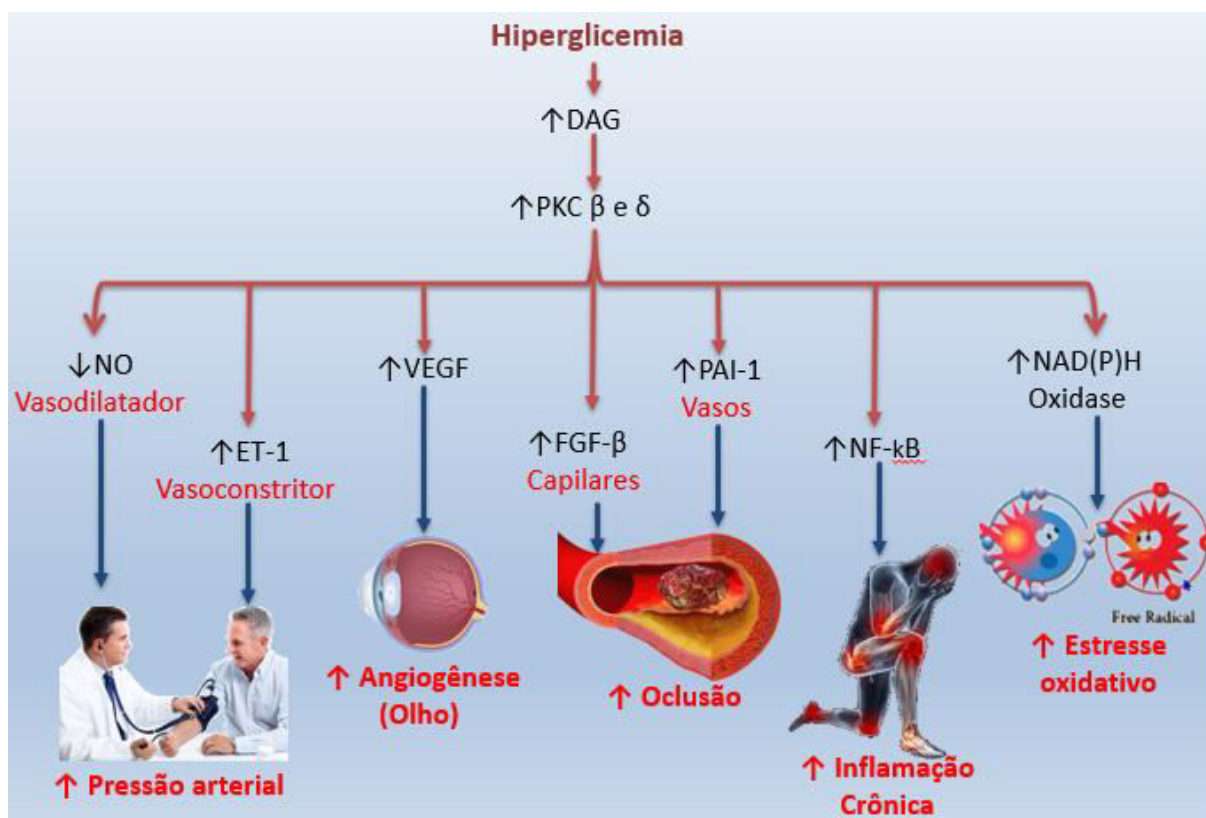


Figura 5: Efeito do diacilglicerol em um estado de hiperglicemia. Fonte adaptado de Brownlee, 2001.

O aumento do PKC afeta o tecido vascular, resultando em um aumento da pressão arterial devido à redução na produção de vasodilatadores como o óxido nítrico e ao predomínio de vasoconstritores, como a endotelina-1 (ET-1), nos músculos lisos das artérias. Além de isso, o PKC também estimula a ativação do VEGF que estimula a angiogênese por meio do aumento da permeabilidade do tecido microvascular ao macrovascular, essa resposta possibilita a formação de novos vasos sanguíneos no endotélio de capilares venosos e as vênulas terminais de baixo calibre. Em pacientes diabéticos o VEGF encontrasse em concentrações maiores no humor aquoso do olho em comparação ao plasma, o que resulta no

edema ocular característico observado na retinopatia diabética (FUNATSU *et al.*, 2002; NOMA; *et al.*, 2002; STANKEVICIUS *et al.*, 2003; THIJSSSEN *et al.*, 2007; VIRDIS; GHIADONI; TADDEI, 2011).

O aumento do PKC tem várias consequências no organismo, incluindo o aumento da liberação do fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), que estimula a produção de colágeno e fibras elásticas na matriz extracelular, esse acúmulo de componentes na matriz pode obstruir pequenos vasos sanguíneos, dificultando a chegada de nutrientes, oxigênio e células do sistema imunológico, prejudicando a cicatrização e criando um ambiente propício para o desenvolvimento do pé diabético. O aumento do PKC também causa a sobre expressão do PAI-1, que reduz a fibrinólise e pode levar à oclusão de vasos por coágulos de fibrina, essa condição pode resultar em acidentes vasculares, embolia pulmonar e infarto ao miocárdio. Outros efeitos do PKC incluem o estímulo da enzima NAD(P)H oxidase e fator NF-kB, o primeiro aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando estresse oxidativo, o segundo estimula a expressão de genes pró inflamatórios criando um ambiente altamente oxidante com processo inflamatório crônico (BROWNLEE, 2001; DU *et al.*, 2000; KOLM-LITTY *et al.*, 1998; PIEPER; RIAZ-UL-HAQ, 1997).

2.5.4 Glicação:

Processo não enzimático, porém demorado, que resulta na formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs), esses AGEs são produzidos em abundância no diabetes e forte associação com diversas patologias, porque interferem na sinalização celular ao alterar a estrutura da membrana celular e as estruturas intracelulares, também se ligam a seu receptor (RAGE) ativando as cascatas pró inflamatórias e pró coagulativas (KIERDORF; FRITZ, 2013; THORNALLEY, 2003).

Os AGEs são formados por 2 vias: a via oxidativa e não oxidativa. Na glicação por via oxidativa, ocorre a oxidação da glicose, lipídeos, carboidratos e proteínas, levando à formação de compostos altamente reativos, como glioxal e metilglioxal, os quais são cerca de 20 vezes mais reativos que a glicose. Vale ressaltar que esse processo, embora seja fisiológico e normal, ocorre quando o grupo aldeído interage com o grupo amino de uma proteína, resultando na formação do AGE (GILLERY, 2001; HUEBSCHMANN *et al.* 2006).

A glicação por via não oxidativa é a mais comum em pacientes diabéticos, devido aos níveis elevados e constantes de glicose no sangue, criando um ambiente propício para a glicação acontecer. Na glicação, o grupo carbonila de um açúcar redutor, como a glicose, condensa-se com o grupo carbonila de proteínas ou ácidos nucleicos, resultando na formação das “Bases de Schiff”, esses produtos são pouco estáveis e podem ser facilmente desfeitos, mas, devido à constante elevação da glicose, eles passam por rearranjos, formando um produto mais estável chamando de “Produto de Amadori” ou “produto inicial da reação de Maillard” (MRPs). Posteriormente esses produtos passam por enolização para, finalmente se converterem nos AGEs (HARTOG *et al.*, 2007; VISTOLI *et al.*, 2013), conforme ilustrado na figura 06.

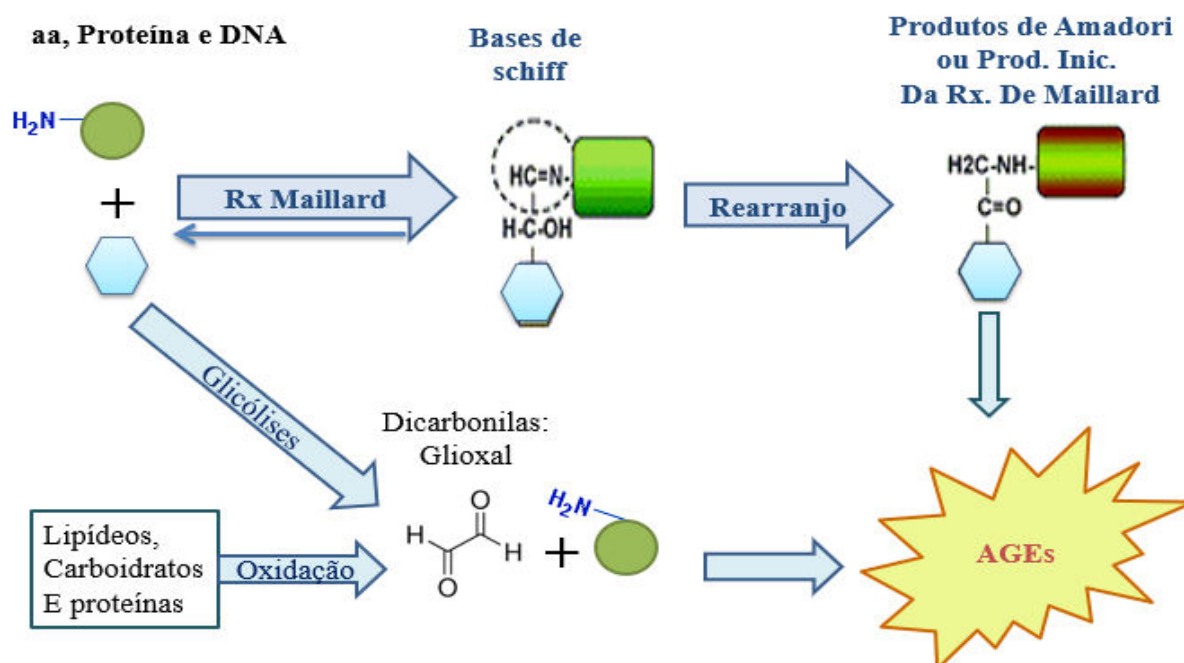


Figura 6: Rotas de formação dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs). Fonte: Adaptado de Vistoli et al., 2013

- *Mecanismo de toxicidade dos AGEs*

Os RAGEs são receptores não específicos que podem ser ativados por várias substâncias, como A β , HMGB1 e DAMPS, incluindo S100A8/A9 e S100B. Ao ligarem-se aos AGEs, os RAGEs ativam a via NF- κ B, estimulando a síntese de genes pró inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , e CCL₂. Esse processo ocorre no núcleo e também leva a expressão aumentada de RAGEs, tornando as células mais sensíveis aos estímulos inflamatórios. Esse estado inflamatório contínuo estimula a migração de leucócitos para as paredes endoteliais dos vasos, levando a formação de placas de ateromas, o que reduz o rádio dos vasos e aumenta a resistência vascular periférica, contribuindo para o desenvolvimento da hipertensão (DANILO; ANTÔNIO; WILSON, 2014; KIERDORF; FRITZ, 2013) como mostrado na figura 07.

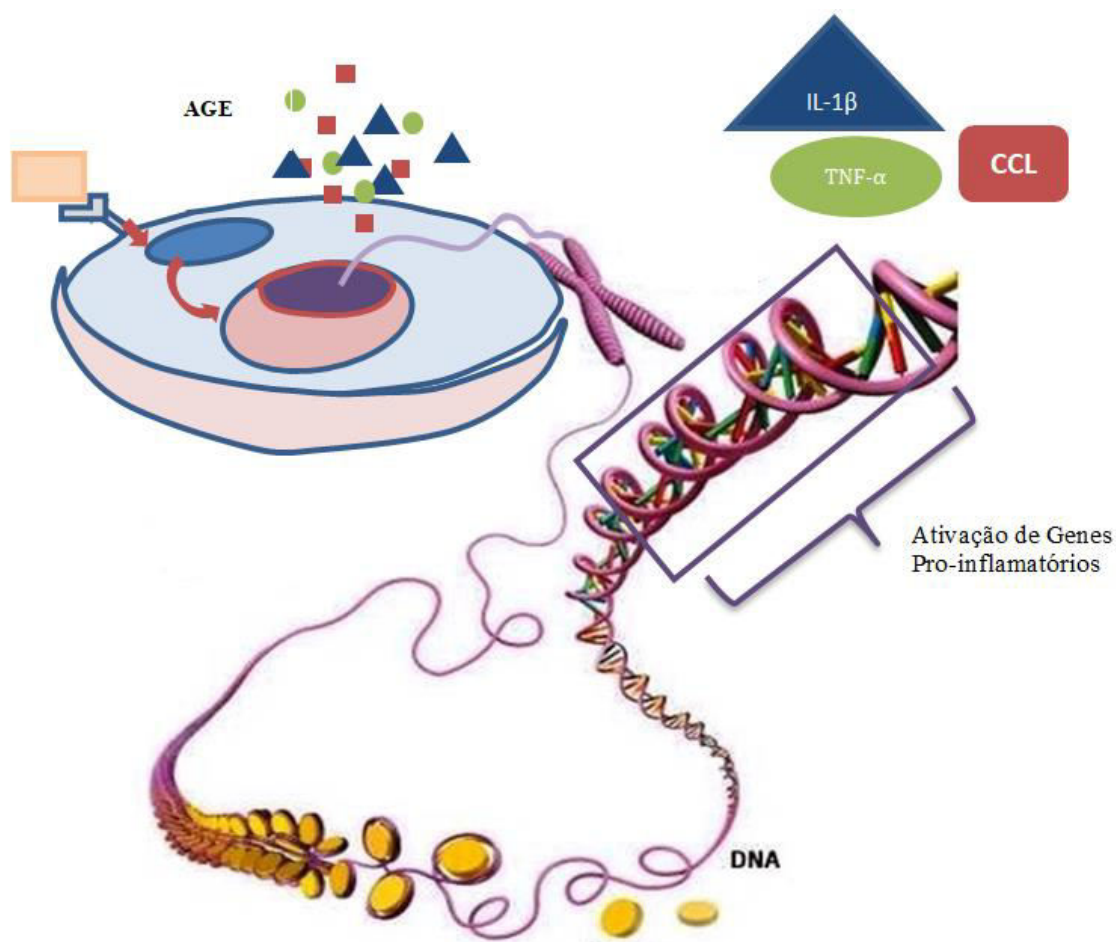


Figura 7: Ativação dos Receptores AGEs (RAGEs) por Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs). Fonte: Adaptado de Mesquita, 2014.

A estrutura tridimensional das proteínas é fundamental para o desenvolvimento da sua atividade biológica, e o AGE têm a capacidade de alterar a estrutura primária, secundária e terciária das proteínas. Estas mudanças são as principais causadoras das patologias encontradas nos pacientes diabéticos, pois afetam as funções de órgãos e tecidos. O colágeno, albumina e Hemoglobina são as proteínas mais abundantes do corpo. No caso do colágeno glicado, foram encontradas alterações na estrutura primária que afeta a agregação plaquetária na coagulação, além de diminuir a função de resistência e elasticidade dos tecidos conjuntivos (ASHRAF *et al.*, 2015; CAMPBELL *et al.*, 2016).

Os resíduos de lisina presentes na albumina humana sérica (HSA) de pacientes diabéticos são altamente susceptíveis a glicação, o que leva à alteração da estrutura secundária e terciária da proteína, formando assim a albumina de Amadori. Essa albumina possui propriedades autoimunes, levando o próprio sistema imunológico a produzir anticorpos contra a HSA glicada. Por outro lado, a hemoglobina é uma proteína encontrada em abundância no eritrócito e está em constante interação com a glicose durante seu período de vida, que são aproximadamente 120 dias, por essa razão, a hemoglobina glicada (HbA1c) é utilizada como parâmetro para acompanhar e controlar a glicemia dos últimos 2 meses (LEE *et al.*, 2014; NEELOFAR *et al.*, 2016).

A pesquisa realizada nos anos 2013 e 2014 no hospital Istanbul Zeynep Kimil, na Turquia, revelou que a HbA1c é um marcador essencial tanto para o controle glicêmico quanto para a avaliação do estresse oxidativo ao longo da vida útil das hemácias. Além disso, observou-se uma relação direta entre a HbA1c elevada e os danos genômicos evidenciados nos testes de cometa e micronúcleos em 52 pacientes com síndrome metabólica (KARAMAN *et al.*, 2015; SZEREMETA; KEMONA-CHETNIK *et al.*, 2009).

2.6 Tirosina fosfatase: Novo alvo para o tratamento do diabetes

A proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), representa uma nova e promissória perspectiva terapêutica para o tratamento do diabetes, abrindo caminho para o desenvolvimento medicamentos inovadores. Até o momento, não há no medicamento no mercado nenhum medicamento que atue como inibidor da PTP1B, que exerce uma ação direta sobre o receptor da insulina causando resistência à insulina. Para compreender a relevância dessa via, é fundamental compreender toda a cascata de sinalização celular desde a ativação do receptor da insulina até a

liberação dos receptores GLUT-4. Estudos apontam para a importância da PTP1B como um alvo terapêutico promissor, abrindo novas possibilidades no tratamento do diabetes (CHO, 2013; ELEFThERIOU; GERONIKAKI; PETROU, 2019; TEIMOURI *et al.*, 2022).

O receptor de insulina, constituído por 4 subunidades (2 alfas e 2 betas), desempenha um papel crucial na sinalização celular. As subunidades alfas (α), localizada na parte externa da membrana celular, interagem com a insulina. Enquanto isso, as subunidades betas (β), com sítios ativos enzimáticos projetam-se para o citosol. O domínio enzimático das subunidades β possui atividade tirosina-quinase, que fosforila 3 resíduos tirosina da mesma subunidade. Esses sítios catalíticos ativam o receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1, IRS-2), estimulando a enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-kinase). A PI3-kinase, por sua vez, converte fosfatidilinositol-2-fosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP3). Esse último transfere o grupo fosfato para a proteína quinase B (PKB), também conhecida como Akt, que estimula a translocação das vesículas contendo os transportadores de glicose GLUT-4 para a membrana plasmática. Além disso, o PKB/Akt também fosforila a glicogênio sintase cinase-3 (GSK3), inativando a glicogênio sintase (GS) e, portanto, estimulando a síntese de glicogênio. Essa intrincada via de sinalização é fundamental para a regulação da captação de glicose pelas células em resposta à insulina (NELSON; BALLOU; LIN, 2015; WHITE, 1997; ZHANG; LIU, 2014), como mostrado na figura 08.

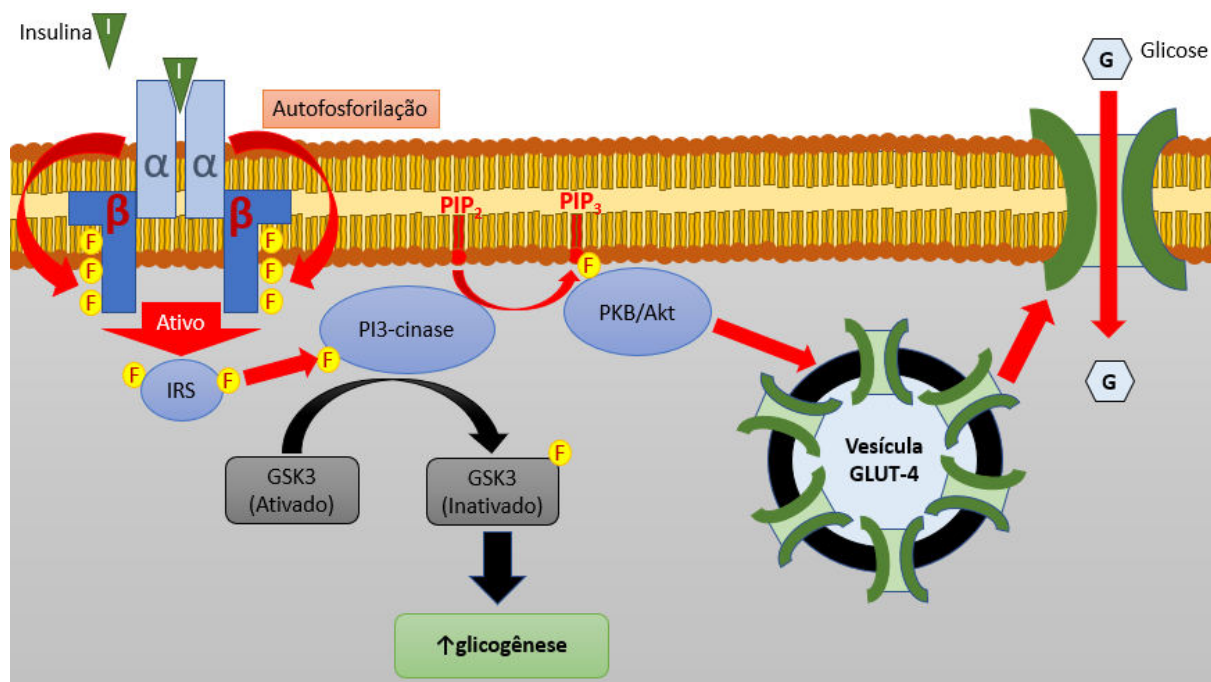


Figura 8: sistema de sinalização intracelular do receptor de insulina ativado. Fonte: adaptado de White, 1997.

Quando os níveis de ácidos graxos ultrapassam os níveis fisiológicos no tecido adiposo, a leptina é liberada (WANG; WANG; YANG, 2004), o que por sua vez ativa o hormônio sensível a lipase (HSL), estimulando a lipólise nos adipócitos. Os ácidos graxos resultantes são transportados para outras partes do corpo através da albumina, quilomícrons e por lipoproteínas como VLDL e LDL. Uma vez dentro das células, o aumento da concentração de ácidos graxos livres estimula a β -oxidação, resultando na produção de ceramida e diacilglicerol como produtos secundários. Estes compostos ativam a PTP1B, que remove grupos fosfato dos resíduos de tirosina no receptor de insulina, impedindo sua autofosforilação e, consequentemente, a ativação do receptor de insulina (FELDHAMMER *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2007), como mostrado na figura 9.

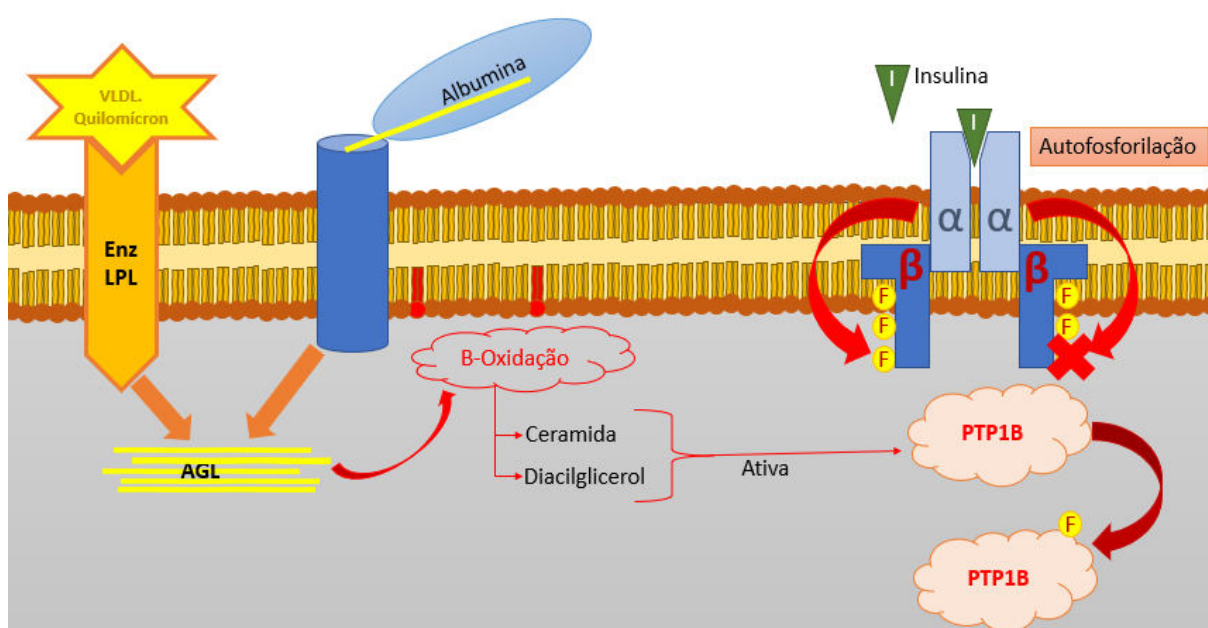


Figura 9: Mecanismo de resistência insulina por PTP1B. Fonte: adapto de FELDHAMMER, 2013

2.7. Chalconas e suas propriedades antidiabéticas

As chalconas são compostos orgânicos que possuem um esqueleto básico de fenileno-1,3-diona com uma ligação dupla conjugada no carbono 2 e 3, esses compostos são formados pela condensação de um grupo acetilacetato com um grupo benzaldeído. As chalconas encontram-se amplamente distribuídas na natureza, encontradas em plantas como açafrão, chá verde, gengibre e vinho tinto. Sua versatilidade permite modificações químicas para obter novos derivados com atividades biológicas específicas. Devido a estas características, as chalconas têm sido objeto de grande interesse na pesquisa farmacêutica e podem ter potencial terapêutico em diversas áreas da medicina (APONTE *et al.*, 2008; MASTACHI-LOZA *et al.*, 2022; ZHUANG *et al.*, 2017).

As chalconas tem sido amplamente estudada devido a sua notável atividade antitumoral. Estudos pré-clínicos têm demonstrado que esses compostos são capazes de inibir o crescimento de células tumorais e induzir a apoptose das células

neoplásicas (BOUMENDJEL; RONOT; BOUTONNAT, 2009; CONSTANTINESCU; LUNGU, 2021; NETO *et al.*, 2022);(DANDAWATE *et al.*, 2021). Além disso, as chalconas também exibem atividades anti-inflamatórias. Pesquisas mostram que esses compostos reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, proporcionando alívio dos sintomas associados a diversas doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide (ADELUSI *et al.*, 2021; GUAZELLI *et al.*, 2021; HSIEH *et al.*, 2000; RÜCKER *et al.*, 2015; UR RASHID *et al.*, 2019),

Outra área de interesse é a atividade antimicrobiana das chalconas. Estudos têm evidenciado sua eficácia na inibição do crescimento de diversos tipos de microrganismos, incluindo bactérias (GUNASEKHARAN *et al.*, 2021; HELLEWELL; BHAKTA, 2020; SIQUEIRA *et al.*, 2021) e fungos(GUPTA; JAIN, 2015; PRESCOTT *et al.*, 2022), o que pode abrir portas para novas abordagens terapêuticas no controle da infecção. Adicionalmente, as chalconas estão ganhando destaque por suas atividades antidiabéticas, tais como a inibição da α -glicosidase, inibição da PTP1B, antiglicante e inibição da enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV).

2.7.1 Inibidores da α -glicosidase.

A enzima α -glicosidase desempenha um papel de suma importância na absorção da glicose no intestino delgado (BURMAOGLU *et al.*, 2021), reduzindo assim a glicemia pós-prandial sem a liberação da insulina. Acarbose, um fármaco encontrado no mercado que inibe de forma competitiva esta enzima e usada como referência nos estudos *in vitro*, *in silico* e *in vivo* (JABEEN *et al.*, 2014). O Xanthohumol (XN), chalcona de origem natural que inibe a α -glicosidase ao ligar-se com esta enzima causando mudanças conformacionais que alteram a sua estrutura e a sua atividade, derivados sintéticos das chalconas podem inibir a enzima por competição pelo sítio ativo (BURMAOGLU *et al.*, 2019; SALEEM *et al.*, 2021). De

fato, chalconas sintéticas têm se mostrado promissórias na inibição desta enzima (HE *et al.*, 2021; ROCHA *et al.*, 2019).

2.7.2 Inibidores da PTP1B.

O extrato etanolico de *Alpinia katsumadai* Hayata, pertencente à família Zingiberaceae encontrada na China, apresentou efeito hipoglicemiante em camundongos diabéticos, e os principais responsáveis por esse efeito foram as chalconas isoladas deste extrato, que evidenciaram inibir as enzimas PTP1B e α -glicosidase (HE *et al.*, 2021). Derivados de chalconas como: xanthoangelols, dentichalcones, 2,4-dihidroxichalcona e 2,4,6-trihidroxichalcona mostraram alta atividade inibitória *in vitro* da PTP1B (LI *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2016).

2.7.3. Inibidores da glicação

A glicação é um processo prejudicial com efeitos graves na saúde a longo prazo, no qual as moléculas de açúcar se ligam a proteínas, lipídios e outros compostos, formando os produtos finais de glicação avançada (AGEs). Esses produtos são tóxicos por modificar a estrutura proteica, deixando os tecidos e órgãos menos eficientes nas suas funções biológicas e podem se acumular nos tecidos, causando inflamação e danos celulares. Neste contexto, as chalconas têm se destacado como potenciais aliadas na prevenção e combate aos danos causados pelos AGEs. A Licochalcona D, por exemplo, demonstrou reduzir a expressão dos receptores dos produtos finais da glicação avançada (RAGE) no hipocampo de camundongos tratados com D-Galactose.(MAHARAJAN *et al.*, 2021), proporcionando um efeito neuroprotetor. As dihidrocalconas apresentam efeito nefroprotetor por inibição da glicação e redução do estresse oxidativo (PÉREZ GUTIERREZ *et al.*, 2019) tanto *in vitro* como em camundongos diabéticos (DUGÉ DE BERNONVILLE *et al.*, 2010).

2.7.4. Inibidores da DPP-IV

A enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) é responsável por inativar uma série de hormônios intestinais, incluindo o hormônio peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1), e sua inibição aumenta a concentração de GLP-1 circulantes, que por sua vez, estimulam a secreção de insulina pelo pâncreas e reduzem a produção de glicose pelo fígado. Esses efeitos combinados levam a uma redução na glicemia e melhora do controle glicêmico em pacientes com diabetes tipo 2 (GILBERT; PRATLEY, 2020). Foi comprovada que chalconaringenina 2'-O- β -D-glucopiranosídeo encontrada no extrato de *Helichrysum arenarium* L. Moench (Asteraceae), é responsável pelas propriedades hipoglicemiantes em camundongos no teste de tolerância oral a glicose (TTOG) por inibição da DPP-IV (MORIKAWA *et al.*, 2015).

2.8. 4-Metoxichalcona (MPP)

A MPP, apesar de ser uma chalcona simples, apresenta diversas propriedades terapêuticas muito interessantes. Entre os efeitos notáveis, destaca-se a sua capacidade de reduzir a expressão do fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2 (Nrf2), que é normalmente ativado como um mecanismo de defesa contra tratamentos com fármacos anticancerígenos. Ao aplicar a MPP como tratamento complementar, observou-se que as células de câncer de pulmão A549 ficaram mais sensíveis ao tratamento com cisplatina.(LIM *et al.*, 2013). Além disso, a MPP demonstra ação estimulante no Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), resultando na redução dos níveis de leptina e lipólises, bem como do fator de necrose tumoral (TNF- α). Por outro lado, aumenta a concentração de adiponectina, uma proteína que inibe a resistência à insulina no tecido adiposo e muscular, sendo benéfica para pacientes com diabetes (HAN, 2017; MUELLER; BECK; JUNGBAUER, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar atividade antidiabética da 4 Metoxichalcona Isolada e Nanoencapsulada *in sílico*, *in vitro* e *in vivo*.

3.2. Objetivos específicos:

- Caracterizar as atividades antiglicante e inibitória da MPP sobre a enzima digestiva α -glicosidase, PTP1B e DPP-IV por meio de ensaios *in sílico*, *in vitro* e *in vivo*.
- Formular e caracterizar uma nanoformulação contendo MPP.
- Avaliar a toxicidade da MPP e da nanoformulação.
- Comparar os efeitos hipoglicemiante e antiglicação do MPP e da nanocápsula contendo MPP em modelos experimentais *in vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Organograma Experimental

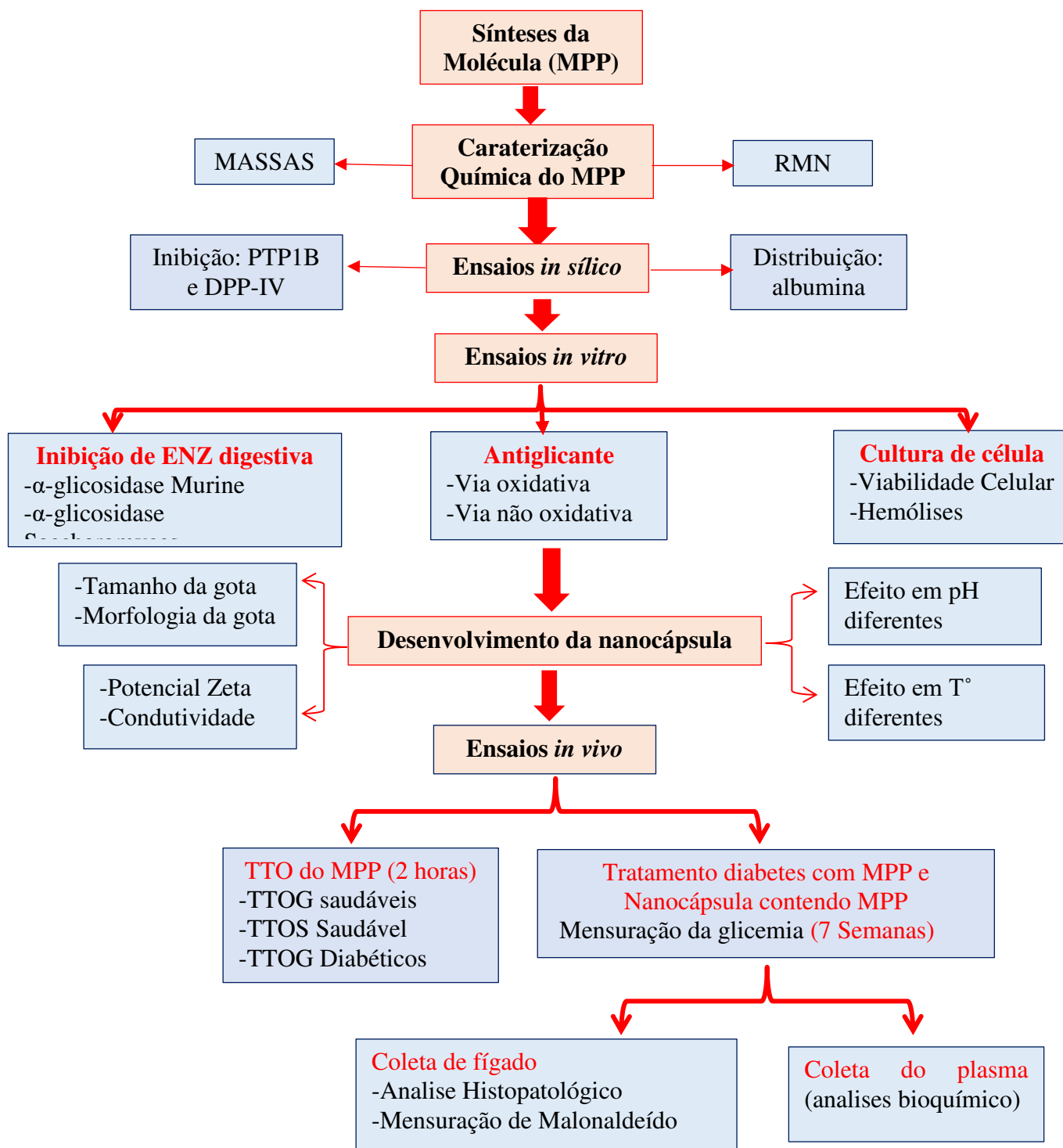


Figura 10: Organograma de planejamento e elaboração dos ensaios realizados.

4.2. Sínteses da 4-metoxichalcona

A síntese da 4-metoxichalcona (MPP) foi realizada pela reação de condensação de Claisen-Schmith de acordo com a metodologia descrita por Iftikhar et al. 2017 usando *p*-metoxi-benzaldeído (A) e acetofenona (B) como reagentes (0.12 e 0.1 eq., respectivamente), segundo o esquema abaixo (Figura 11). O aldeído aromático foi convertido na correspondente chalcona (MPP) por tratamento com 0.05 eq. de NaOH em etanol e água, mantendo a temperatura abaixo de 10° C. O composto é purificado por recristalização e identificado por análise de espectros de massas e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono.

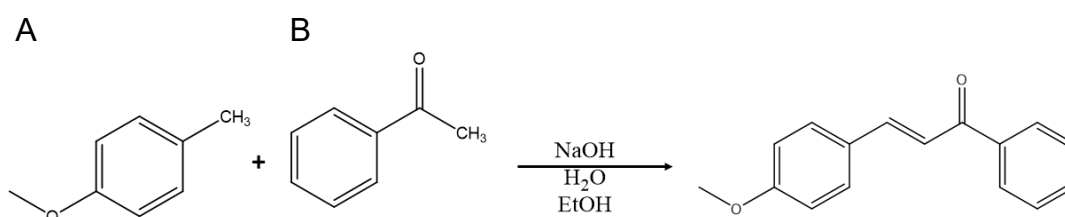


Figura 11: Síntese da 4-metoxichalcona: *p*-metoxi-benzaldeído (A), acetofenona (B)

4.3. Caracterização química

4.3.1. Ensaios de elucidação estrutural e pureza por qNMR ^1H

O MPP foi analisado por RMN 1D (^1H e ^{13}C) e 2D (COSY, HSQC e HMBC) utilizando um espectrômetro Bruker® Avance III HD 500.13 MHz para ^1H e 125.8 MHz para ^{13}C .

O preparo de MPP foi realizado em triplicata (4.80 ± 0.02 mg) com 530.0 μL de DMSO- d_6 contendo TMS como referência interna (0.0 ppm). A solução foi submetida ao ultrassom por 5 min (25.0 °C) e, em seguida, transferida para o tubo de RMN de 5 mm de diâmetro. Os parâmetros de aquisição de RMN de ^1H foram padronizados como tempo de aquisição (AQ) de 3.27 s, atraso de relaxamento (D1) de 15 s ($7 \times T_1$) para os prótons de interesse em 7.03 ppm (d, 2 H), digitalização de ponto de dados

no domínio do tempo de 64 K, janela espectral de 19.99 ppm, 4 scans, ganho do receptor de 90.5. Os espectros foram adquiridos utilizando a sequência de pulso zgpr com a supressão do sinal de água residual.

A pureza de MPP por qNMR foi determinada usando o padrão externo tereftalato de dimetila (TD) (pureza certificada, 99.988 ± 0.060 %). Este padrão foi preparado ($n = 3$) em DMSO- d_6 (530.0 μ L), com TMS como referência interna (0.0 ppm). As aquisições medidas do padrão foram de 3,27 s, atraso de relaxamento (d1) de 22 s ($7 \times T_1$) proton em 8.08 (s, 4 H), 64k pontos no Domínio do Tempo e uma janela espectral de 19.99 ppm. Os comprimentos do pulso de 90° foram calibrados para cada aquisição. A constante de relaxação longitudinal (T_1) dos prótons foi determinada pelo experimento Inversão-Recuperação (t1ir1d). Todos os experimentos foram realizados sem rotação de amostra, os ajustes de fase e correção de linha de base foram realizados automaticamente. O software TopSpin™ 4.1.3 foi usado para o processamento dos espectros de RMN. Para o cálculo da pureza foi utilizada a fórmula (SAMUELS; WANG, 2020): $P_{MPP} = (I_{MPP}/I_{TD}) \times (N_{TD}/N_{MPP}) \times (M_{MPP}/M_{TD}) \times (W_{TD}/W_{MPP}) \times P_{TD}$, onde I é a área da integral absoluta, (N) número de núcleos, (M) massa molar, (W) peso, (P_{MPP}) pureza do analito e do padrão (P_{TD}).

4.3.2. Ensaios de Elucidação Estrutural por Espectroscopia de Massas

A MPP foi solubilizada em clorofórmio (1 mg mL^{-1}) e posteriormente foi diluída para 5 mg mL^{-1} . A análise de espectro de massa (MS) foi realizada por injeção direta (5 mL) em um espectrômetro de massa triplo quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access (Thermo Scientific™, San Jose, CA, EUA), operando com fonte de ionização Eletrospray (ESI) em modo positivo para as análises ESI-MS e ESI-MS/MS. As condições analíticas foram as seguintes: faixa de aquisição m/z 100 – 1000,

voltagem do capilar 40 V; voltagem do spray 8 kV; temperatura do capilar 247 ° C; gás de arraste (N₂) fluxo de 11 unidades arbitrárias (arb). A fragmentação foi realizada utilizando energia de colisão entre 35 a 45 eV. O software Xcalibur™ versão 2.2 (Thermo Scientific™) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos espectros.

4.4. Doking Molecular

4.4.1 Farmacocinética: distribuição. - Albumina

O cálculo de doking molecular foi realizado com ajuda do software AutoDock Vina(TROTT; OLSON, 2010) para avaliar a interação do MPP com a albumina sérica bovina (BSA), que foi obtida do banco de proteínas (<http://www.rcsb.org/pdb/>) sobre o código de 4OR0 (BUJACZ; ZIELINSKI; SEKULA, 2014). O protocolo consiste em remover as moléculas e água ligados no naproxeno, atribuindo cargas de Gasteiger e delimitando as dimensões da caixa 'grid boxes' 12Å × 10Å × 10Å centrado no sítio ativo I (x=69.671, y=26.607 z=86.784) e 14Å × 16Å × 14Å centrado no sítio ativo I (x=69.574, y=28.575, z=105.018). Para validar o protocolo do doking, o ligante naproxeno foi removido e recolocado no sítio I e II e comparado com a estrutura cristalizada em cada sítio com cálculo de RMSD. A obtenção do valor de RMSD foi de 1,93 e 0,85 para o sítio I e II respectivamente. Valores até 2 Å serão considerados confiáveis para a validação do doking.

4.4.2 Atividade sob a DPP-IV e PTP1B

Com o objetivo de aprimorar e investigar possíveis atividades biológicas com base nas propriedades químicas e físicas da estrutura do MPP, foi realizado uma simulação de encaixamento dos possíveis sítios ativos utilizando GOLD 5.7.2. Para restringir as distâncias e ângulos de ligação da água, foi usado o algoritmo SETTLE (MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992), enquanto os comprimentos de ligação dentro da

proteína foram limitados com o algoritmo LINC (BERK HESS *et al.*, 1997). As proteínas usadas no estudo foram a dipeptidil peptidase IV (4A5S) e a proteína tirosina fosfatase 1B (1C83), ambas ligadas aos seus respectivos inibidores, que foram obtidas do banco de dados de proteína (PDB, <http://www.rcsb.org/>).

O parâmetro usado para validar estas proteínas foi o “desvio padrão quadrático” (RMSD), que mostra a média das possíveis poses do ligante e para que a ancoragem seja favorável o RMSD tem que ser menor a 2Å, no final a média das 15 poses do RMSD de cada FUNÇÃO (CHEMPLP, GoldScore, ChemScore e ASP) serão comparadas entre si para escolher o menor RMSD e essa FUNÇÃO será validada para essa proteína (TROT; OLSON, 2010).

4.5. Atividade antiglicante: Via oxidativa

A atividade antiglicante foi determinada de acordo com Kiho *et al.* 2004 (KIHO *et al.*, 2004a), com modificações. Foram usadas Albumina (BSA) 8 mg mL⁻¹ e Glioxal 30 mM em tampão fosfato 200 mM contendo azida de sódio 3 mM (pH 7.4), além de 1 mg mL⁻¹ da MPP diluídas em DMSO. O volume final da reação foi de 300 µL compostos por: BSA (135 µL), glioxal (135 µL) e DMSO ou MPP (30 µL) sendo incubados à 37°C durante 24 horas e posteriormente analisados no leitor de microplaca (DTX 800, Beckman Coulter, CA, USA) por fluorescência (emissão λ330 nm e excitação λ420 nm). A quercetina (1mg mL⁻¹) foi utilizada como padrão e o DMSO como controle negativo (MPP e quercetina solubilizados em DMSO). O cálculo foi baseado segundo a equação 1 (E1) onde os valores de R1 e R2 são as leituras inicial e final da reação, a concentração inibitória do 50% (IC₅₀) foi deter

$$\left[\% \text{ inibição} = 100 - \frac{(R_2 \text{ (MPP/padrão)} - R_1 \text{ (MPP/padrão)})}{R_2 \text{ (controle negativo)} - R_1 \text{ (controle negativo)}} \right] \times 100$$

4.6. Atividade antiglicante: Via não oxidativa

A atividade antiglicante foi determinada de acordo à Kiho et al. 2004(KIHO *et al.*, 2004) com modificações. Foram seguidos os passos usados na Atividade antiglicante por via oxidativa, com exceção do glioxal que foi substituído pela frutose (100 mM), tempo de incubação aumentou para 120 horas e o padrão usado foi aminoguanidina (1mg mL^{-1}).

4.7. Inibição da α -glicosidase de murino

Atividade enzimática foi determinada de acordo à Andrade-Cetto et al., 2008 (ANDRADE; BECERRA; CÁRDENAS, 2008) com modificações. A enzima α -glucosidase foi extraída do pó cetônico do intestino de rato da SIGMA. Tanto o substrato 4-nitrofenil-D-glucopiranosídeo (4-NPGP) como a enzima foram diluídos em tampão fosfato 10 mM pH 6.9. Foi plaqueado 30 μL do MPP, padrão e/ou controle (DMSO) na concentração de 1 mg mL^{-1} , 170 μL da enzima ($0.08\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), incubou-se por 5 min a 37°C no escuro, adicionou-se 100 μL do 4-NPGP (5 mg mL^{-1}), incubou-se por 20 min e a leitura foi realizada a 405 nm. Os resultados foram expressos em percentual de inibição segundo a equação 1 (E1). O padrão utilizado foi a Acarbose

4.8. Inibição da α -glicosidase de *Saccharomyce*

Atividade enzimática foi determinada de acordo à Andrade-Cetto et al., 2008, com modificações. Foram seguidos os passos usados na inibição da α -glicosidase extraída de murino, com exceção da enzima que foi substituído pela enzima extraída da *saccharomyces cerevisiae*.

4.9. Teste de Hemólise

O teste de potencial hemolítico foi realizando segundo Jimenez et al. 2003. Para isso, coletou-se sangue por punção cardíaca de um camundongo Swiss, sendo

utilizado para preparar uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Em uma placa de 96 poços foi colocado 100µL em triplicata do MPP na concentração de 2 mg mL⁻¹ e adicionado 100 µL da SE obtendo assim uma concentração final de 250 µg mL⁻¹, posteriormente foi incubado por 1 hora sob agitação constante a 37°. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (1500 rpm / 10 min) e o sobrenadante transferido à outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro (450 nm). Como controle positivo foi utilizado Triton-X (0.5%) e negativo DMSO.

4.10. Teste de viabilidade celular:

A quantidade de células viáveis foi determinada segundo Mosmann., 1983. As Células MRC-5 da linhagem celular de Fibroblasto de pulmão foram plaqueadas (5 x 10³ células/poço) e tratados com 100 µL de diversas concentrações de MPP (0.6 – 20 µM) e incubada durante 72 horas (37°C, 5% de CO₂), após esse período realizou-se a lavagem dos poços com PBS (pH 7.2) e adicionou-se 100 µL PBS (pH 7.2) marcada com MTT (0.5 mg mL⁻¹) e após 4 horas (37°C, 5% de CO₂) no escuro, as células viáveis metabolizam o MTT em cristais de formazan de cor roxo. Adicionou-se em todos os poços 100 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazan e após 5 min a temperatura ambiente os poços foram analisados a 560 nm. A Doxorubicina 20 µM foi usado como controle positivo e PBS como controle negativo de morte celular. O cálculo foi baseado segundo a equação 1 (E2) onde os valores de R1 e R2 são as leituras inicial e final da reação.

E2

$$[\% \text{ inibição} = 100 - (R_2 \text{ (MPP/padrão)} - R_1 \text{ (MPP/padrão)} / R_2 \text{ (controle negativo)} - R_1 \text{ (controle negativo)})] \times 100$$

4.11. Preparação do Nanoencapsulado.

Foram preparados 8 formulações de nanocápsulas contendo MPP seguindo o

método de deslocação de solvente descrito por Fessi, 1989. Sob agitação constante de 400 rpm por 30 min, a temperatura ambiente, duas fases foram preparadas (Tabela 1). A Fase orgânica continha palmitato de isopropila, MPP, SPAN 20, Kollicoat® MAE 100P, etanol 96%, e acetona, enquanto a fase aquosa era composta por água ultrapura e Tween 80. A montagem das nanocápsula contendo MPP consistiu em gotejar a fase orgânica sobre a fase aquosa, mantendo a agitação contínua. Após a conclusão do processo, a agitação foi mantida por 20 min e em seguida, tamanho das partículas foi homogeneizado utilizando um Ultra-turrax® (IKA, Suíça) a 10 000 rpm por 10 min. No final o álcool e a acetona foram eliminados por rota evaporação a vácuo (IKA, Suíça) a 50°C.

4.12. Tamanho e morfologia da gota

O tamanho de partícula e o índice de polidispersidade foram medidos por PCS (espectroscopia de correlação de fótons) usando um Zetasizer Nano (Malvern, Reino Unido), em um comprimento de onda de 633 nm, ângulo de dispersão de 173° e 25°C (RODRIGUEZ A. *et al.*, 2017). Antes das medições, a solução de nanocápsulas foi filtrada usando uma membrana Millipore® (0,45 µm). As medidas foram feitas em triplicata, e a média $\pm$ desvio padrão foi registrada.

4.13. Potencial Zeta e condutividade

O potencial zeta e a condutividade foram medidos em um analisador de tamanho de partículas (Zetasizer, Malvern, Reino Unido), usando uma célula zeta de policarbonato descartável. As medidas de mobilidade eletroforética foram automaticamente convertidas em potencial zeta usando a aproximação de Smoluchowsky. As medições foram feitas a 25 °C, usando uma tensão de 150 V (RODRIGUEZ A. *et al.*, 2017). Cada amostra foi medida em triplicata, e a média $\pm$ desvio padrão foi registrada.

4.14. Efeito do pH

O efeito do pH no tamanho da partícula ANC e no potencial ζ foi determinado usando um titulador MPT-2 (Malvern, Reino Unido) acoplado a um analisador de tamanho de partícula (Zetasizer). Hidróxido de sódio (0,1 mol/L) e ácido clorídrico (0,1 mol/L) foram usados como titulantes. O instrumento foi calibrado com soluções tampão (pH 4, pH 7, pH 10; Alphatec, Brasil). As medições foram realizadas em triplicado a 25°C.

4.15. Efeito térmico

Foi avaliado o efeito da temperatura no tamanho de partícula e índice de polidispersidade das nanocápsulas. A suspensão de nanocápsulas foi aquecida de 20° a 70°C, em intervalos de 5°C. A amostra foi mantida por 5 min em cada temperatura antes da medição. O tamanho de partícula e o índice de polidispersidade foram medidos em triplicata e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4.16. Testes *in vivo*

4.16.1 *Animals*

O protocolo experimental foi baseado segundo as diretrizes da Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) e aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da universidade federal da Amazonia (UFAM) com o protocolo 004/2019. Para este estudo foram usados camundongos Swiss albinos, machos, 6 semanas de idade, pesando 18 - 20 gramas, obtidos do Biotério Central da UFAM; Manaus. Eles serão mantidos sobre condições padrão de laboratório (Ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 21 ± 2 °C e umidade relativa de 35 % a 60 %). Eles serão alimentados com rações e água já padronizados pela instituição.

4.16.2 Teste de tolerância oral a sacarose (TTOS)

Para o TTOS os camundongos não diabéticos foram divididos em cinco grupos de seis animais. Posteriormente, foram mantidos em jejum de 12 horas para a medir a glicemia com auxílio de glicômetro Precision Xtra (Abbott Diabetes Care, Portugal). Em seguida, foi administrado por via oral no grupo não tratado (GNT) o veículo (soro fisiológico-200 μ L), o grupo padrão (MET200) recebeu Metformina 200 mg kg^{-1} de peso, e os grupos testes (MPP200 e MPP100) receberão MPP (em doses 200 e 100 mg kg^{-1}), e após 20 min foi administrado 2 g kg^{-1} de sacarose por via oral (gavagem) em todos os grupos. As amostras de sangue foram recolhidas da cauda e medidas em diferentes tempos (30, 60, 90, e 120 min) após a administração da sacarose (ZULKAWI *et al.*, 2018).

4.16.3 Teste de tolerância oral a glicose (TTOG)

O TTOG foi determinado segundo Zulkawi *et al.*, 2018(ZULKAWI *et al.*, 2018). Foram seguidos os passos usados TTOS, com exceção do dissacarídeo sacarose que foi substituído pelo monossacarídeo glicose.

4.16.4 Teste de tolerância oral a glicose (TTOG) com camundongos diabéticos

A indução do diabetes foi realizada segundo o método descrito por Arya *et al.* 2015 com leves alterações. Os animais receberam Nicotinamida (50 mg kg^{-1} pc; diluída em solução salina) e após 20 min estreptozotocina (150 mg kg^{-1} pc; diluído em tampão citrato 0.1 M – pH 4.5) por via intraperitoneal e após 96 horas os animais com glicemia maior a 200 mg/dl foram considerados diabéticos. A continuação foi realizada o TTOG como descrito anteriormente.

4.16.5 Teste de Atividade Hipoglicemiante Crônico DM2

Os camundongos diabéticos foram divididos aleatoriamente em 7 grupos de 6 animais por grupo. Os grupos foram divididos da seguinte maneira: grupo controle

normoglicêmico não tratado (Normoglicêmico); grupo controle positivo – hiperglicêmico sem tratamento (Controle); grupo padrão (Metformina 200 mg kg⁻¹ pc) e grupos testes (MPP e nanoencapsulado contendo MPP). Foi administrado por via oral no Grupo Controle (GC) o veículo 200μL de soro fisiológico- Kolliphor 3%. o grupo Padrão recebeu 200 mg kg⁻¹ pc de Metformina (GP) e os grupos testes receberam o MPP em doses 200 e 100 mg kg⁻¹ pc (MPP 200 e MPP 100) e nanoencapsulado com MPP de 5 e 10 mg kg⁻¹ pc (NC5 e NC10).

A cada 7 dias foram realizadas dosagens para medição da glicemia e a pesagem dos grupos. A glicose no sangue foi medida usando um glicosímetro Precision Xtra (Abbott Diabetes Care, Portugal), colocando uma pequena gota de sangue em uma nova tira de teste e registrado as medições. O Tratamento foi iniciado a partir da confirmação do diabetes(ARYA *et al.*, 2015).

4.16.6 Coleta de sangue e órgãos do teste crônico.

Ao final do tratamento os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com Cetamina e Xilazina (100:10 mg kg⁻¹ de pc) e coletado o sangue por punção cardíaca para a dosagem dos parâmetros bioquímicos, depois realizou-se a eutanásia por deslocação cervical. Após a eutanásia o fígado foi coletado em uma solução de formol 10% tamponado pH 7 para a análise histológica e para o doseamento de malonaldeído foi separado 1 grama de fígado e congelado a -70 °C em 10 mL de tampão fosfato pH 7.

4.16.7 Analises Bioquímicas

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca no final do tratamento, antes da eutanásia para determinação do perfil glicêmico (Glicose e HbA1c) perfil lipídico (Colesterol e triglicerídeos), perfil hepático (ALT e AST) e perfil renal (Ácido úrico, creatinina e ureia). As dosagens foram determinadas utilizando

um analisador automático Chem WellModel 2910; AWARENESS TECHNOLOGY, INC e Kits Comerciais disponíveis enzimáticos e ELISA.

4.16.8 Dosagem de malonaldeído (MDA)

Para estimar a intensidade de peroxidação lipídica no fígado, medimos o MDA presente no fígado através da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Inicialmente, uma grama do tecido hepático foi homogeneizada em 10 ml de NaCl 150 μ M. Em seguida, adicionamos 100 μ l desse homogenato em 1,5 ml de um complexo reacional (ácido tiobarbitúrico 0,1%, ácido clorídrico 0,25N e ácido tricloroacético 10%), e agitados por 30 segundos no vortex. A mistura foi coberta com bolas de gude e incubada em banho-maria a 100°C por 45 min. Após a incubação, centrifugamos a 3500 rpm por 5 min, e o sobrenadante foi lido no espectrofotômetro T70 UV/VIS PG Instruments Ltda, comprimento de onda de 535 nm. Os resultados foram expressos em μ mol/L de MDA, utilizando a curva com as concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 e 8,0 μ mol do padrão 1,1,3,-tetrahidroxipropano (HIROSHI *et al.*, 1979).

4.16.9 Análise Histológica

Amostras de tecido hepático de cada camundongo foram desidratadas sequencialmente em álcool etílico 70, 80, 96 e 100% depois passou para xilol / álcool (1:1) e finalmente para xilol (100%) ficando imersas por 30 min em cada solução. As amostras foram montadas em blocos de parafina a 60 °C e mantidas sob refrigeração. Posteriormente foram realizados cortes de 3-5 μ m usando um micrótomo (RM 2125rt, Leica Microsystems-Wetlar, Alemanha). Esses cortes foram montados em lâminas de microscopia para serem corados com hematoxilina e eosina (H & E) e fixados com bálsamo do Canadá e cobertos com lamínula para posterior análise. A análise e documentação fotográfica foram realizadas com um

microscópio óptico (DM500, Leica Microsystems-Wetlar, Alemanha) e câmera integrada (ICC50W, Leica Microsystems-Wetlar, Alemanha).

4.17 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como $\text{media} \pm \text{desvio padrão}$ da média e plotados em planilha do software excel (Microsoft). Para mostrar as diferenças entre os grupos analisados foi usado o software GraphPad Prism onde para os resultados univariados foram analisados por One-Way ANOVA e os resultados bivariados foram analisados por Two-Way ANOVA usando o teste de dunnett. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi aceita em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados da presente tese serão apresentados em formato de artigos.

Artigo 1: Síntese, caracterização química e atividade antidiabética da 4-metoxichalcona¹

Artigo 2: Efeito antidiabético de um sistema polimérico nanodisperso contendo 4-metoxichalcona.²

ARTIGO 1

Síntese, caracterização química e atividade antidiabética da 4-metoxicalcona

Synthesis, chemical characterization and antidiabetic activity of 4-methoxychalcone

Leonard D. R. Acho^a, Edinilze S. C. Oliveira^b, Renyer A. Costa^b, Giovana A. Bataglioni^b, Hector H. F. Koolen^c, Marcos B. Machado^b, Rosivaldo S. Borges^d, Emersom S. Lima^{a*}.

^a*Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas Manaus, Amazonas, Brazil.*

^b*Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.*

^c*Grupo de Pesquisas em Metabolômica e Espectrometria de Massas, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil.*

^d*Núcleo de Estudos e Seleção de Moléculas Bioativas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil.*

RESUMO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica caracterizada pela hiperglicemia. Metodologias têm sido desenvolvidas a fim de viabilizar o surgimento de novas classes de medicamentos. As chalconas e seus derivados têm apresentado potencialidades farmacológicas promissoras. Portanto, este trabalho apresenta um estudo sobre o potencial antidiabético da 4-metoxichalcona (MPP), uma molécula que têm mostrado promissoras propriedades farmacológicas. O objetivo do trabalho foi sintetizar o MPP por meio da reação de Claisen-Schmidt e, em seguida, avaliar suas atividades farmacológicas. A caracterização do MPP foi realizada utilizando técnicas de Espectroscopia de Massas (MS/MS) e Ressonância Magnética Nuclear (NMR), sendo sua pureza determinada por NMR quantitativa de ^1H , com um teor médio de pureza de $96,32 \pm 0,73\%$. Por meio de análise de docking molecular, foram observadas interações entre o MPP e a proteína albumina sérica bovina (BSA) em sítios de ligação que sugerem afinidade e potencial transporte pelo organismo, além de alta probabilidade de inibição das enzimas DPP-IV e PTP1B. Em testes *in vitro*, o MPP apresentou atividade antiglicante e mostrou-se seguro ao não causar hemólises nas hemácias e toxicidade em células de fibroblastos de pulmão humano durante um período de até 72 horas. Esse resultado foi corroborado no teste de toxicidade aguda com a dose de $2000 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc.}$. O estudo também investigou a ação do MPP em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ). Os testes de tolerância oral a sacarose e tolerância oral a glicose (TTOG) demonstraram que o MPP, na dose de 200 mg/kg , reduziu significativamente o aumento da glicose sanguínea após a carga de glicose, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo tratado com metformina na mesma dose. Os resultados do estudo mostram o potencial do MPP como um agente antiglicante e anti-hiperglicêmico, possivelmente por inibir as enzimas DPP-IV e PTP1B, que estimulam a captação de glicose extracelular. Esses achados sugerem que o MPP pode ser uma alternativa promissora no tratamento do diabetes mellitus, e seu desenvolvimento pode abrir caminho para novas classes de medicamentos no combate a essa doença metabólica crônica.

Palavras-chave: 4-metoxichalcona, diabetes, antiglicante, anti-hiperglicêmico.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease characterized by hyperglycemia. Methodologies have been developed to enable the emergence of new classes of medications. Chalcones and their derivatives have shown promising pharmacological potential. Therefore, this study presents an investigation into the antidiabetic potential of 4-methoxychalcone (MPP), a molecule that has demonstrated promising pharmacological properties. The aim of the study was to synthesize MPP through the Claisen-Schmidt condensation reaction and subsequently evaluate its pharmacological activities. Characterization of MPP was performed using Mass Spectrometry (MS/MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) techniques, with an average purity content of $96.32 \pm 0.73\%$ determined by quantitative ^1H NMR. Molecular docking analysis revealed interactions between MPP and bovine serum albumin (BSA) at binding sites, indicating affinity and potential transport within the organism, along with a high probability of inhibiting DPP-IV and PTP1B enzymes. *In vitro* tests, MPP exhibited antiglycation activity and proved to be safe, as it did not cause hemolysis in erythrocytes and showed no toxicity in human lung fibroblast cells for up to 72 hours. This result was corroborated by an acute toxicity test at a dose of 2000 mg kg^{-1} body weight. The study also investigated the action of MPP in streptozotocin-induced diabetic mice. Oral sucrose tolerance and oral glucose tolerance tests demonstrated that MPP, at a dose of 200 mg kg^{-1} bw, significantly reduced the increase in blood glucose levels after glucose loading, with no significant difference compared to the group treated with metformin at the same dose. The study's findings highlight the potential of MPP as an antiglycation and anti-hyperglycemic agent, possibly through the inhibition of DPP-IV and PTP1B enzymes that promote extracellular glucose uptake. These findings suggest that MPP may be a promising alternative in the treatment of diabetes mellitus, and its development could pave the way for new classes of medications in combating this chronic metabolic disease.

Keywords: 4-methoxychalcone, diabetes, antiglycant, antihyperglycemic.

^{1,2,3} Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas

*E-mail: eslima@ufam.edu.br

1. Introdução

Diabetes mellitus (DM) é um conjunto de distúrbios metabólicos caracterizado pelo aumento de glicose no sangue e tem sido considerado um dos maiores problemas de saúde do mundo (OGURTSOVA *et al.*, 2017). Em todos os países, ocorreu um aumento significativo do diabetes tanto em regiões urbanas quanto rurais (OGURTSOVA *et al.*, 2017). A prevalência global de DM em adultos aumenta com a idade, e há maior prevalência em homens do que em mulheres (SUN *et al.*, 2022). Somente em 2021, estima-se que 6,7 milhões de adultos entre 20 e 79 anos morreram de consequências do diabetes, excluindo os riscos de mortalidade associados à pandemia de COVID-19 (DIABETES, 2021). Projeções futuras sugerem que 783 milhões de pessoas terão diabetes em 2045 (SUN *et al.*, 2022).

O desenvolvimento do DM tem sido associado ao acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que são proteínas ou lipídios glicadas como resultados da hiperglicemia crônica (VISTOLI *et al.*, 2013; YING *et al.*, 2021). Os AGEs estão relacionados às múltiplas complicações do diabetes, tais como retinopatia, insuficiência renal, amputação (YING *et al.*, 2021). Além da hipertensão (HAESEN *et al.*, 2020), diminuição da massa e desempenho muscular (EGAWA; TSUDA; GOTO; OHNO *et al.*, 2017), diminuição da densidade e resistência óssea (CAMPBELL *et al.*, 2016; ILLIEN-JÜNGER *et al.*, 2018), como também a ativação de citocinas inflamatórias (CAMPBELL *et al.*, 2016). Algumas terapias existentes para o tratamento do DM fazem uso de inibidores da enzima α -glucosidase, tais como acarbose e voglibose, os quais são comumente prescritos para diminuir a glicose pós-prandial. No entanto, isso não impedem as complicações do diabetes a longo prazo, além de poder causar efeitos colaterais indesejados, como náuseas, vômitos

e desconforto abdominal (CAMPBELL *et al.*, 2016; SHORI, 2015). A metformina, um agente hipoglicemiante oral, embora tenha se tornado uma opção para o tratamento do DM tipo 2, alguns pacientes não podem recebê-la devido ao risco de acidose láctica (DEFRONZO *et al.*, 2016). Esses efeitos, somados a baixa adesão ao tratamento diabético, contribuem para o agravamento substancial desta doença, elevando os custos do tratamento e podendo levar à morte (CATHBERT, 2019).

Diante deste contexto, novas alternativas a fim de viabilizar o surgimento de novas classes de medicamentos mais eficazes, com menos efeitos colaterais e de baixo custo têm sido desenvolvidas (ELEFThERIOU; GERONIKAKI; PETROU, 2019). As chalconas, pertencente a classe dos flavonoides, têm despertado a atenção de pesquisadores não só do ponto de vista sintético e biossintético, mas também farmacológico (AFSAR *et al.*, 2021; TAJAMMAL *et al.*, 2017). A condensação de Claisen-Schmidt é normalmente utilizada para sintetizar chalconas na presença de catalisadores básicos (IFTIKHAR *et al.*, 2017; TAJAMMAL *et al.*, 2017). Essas substâncias já revelaram ações biológicas para o tratamento do diabetes (BURMAOGLU *et al.*, 2020; HSIEH *et al.*, 2012; NURSAMSIAR *et al.*, 2022; TAJAMMAL *et al.*, 2017), antimutagênica (LIMA *et al.*, 2017), anti-inflamatória (AHMAD *et al.*, 2006; BUKHARI *et al.*, 2015), antimicrobiana (LAHTCHEV *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2019), antifúngica (LAHTCHEV *et al.*, 2008) e antiproliferativa (BRITO *et al.*, 2022).

Portanto, este estudo aborda a síntese da chalcona (*E*)-3-(4-metoxifenil) -1-fenilprop-2-en-1-one (4-metoxichalcona), determinação de sua pureza, avaliação de sua atividade antiglicante, *in vitro*, e capacidade de interação com albumina sérica bovina, *in silico*. Além disso, foi analisado o seu potencial antidiabético em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

2. Resultado e Discussão:

2.1 Análises químico

A confirmação estrutural da chalcona (*E*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one (MPP) foi feita com base na interpretação dos dados de RMN de ^1H (Fig. 1), ^{13}C , DEPT135, HSQC, HMBC e ESI-MS/MS, os quais estão em conformidade com os descritos na literatura (IFTIKHAR *et al.*, 2017). Para a obtenção do teor da pureza de MPP foi empregada a quantificação absoluta por NMR quantitativa de ^1H , utilizando o método PULCON (GARRIDO; DE CARVALHO, 2015). Visto que é um método de razão primária, e é desnecessária a construção de uma curva de calibração, bem como o emprego de padrões idênticos ao analito de interesse (OLIVEIRA *et al.*, 2021; SAMUELS; WANG, 2020). Neste estudo, a substância tereftalato de dimetila (δ_{H} 8.08, s, 4H) foi empregada como padrão externo para calibrar as medições de NMR, uma vez que o deslocamento está no mesmo ambiente químico do sinal de interesse do analito em δ 7.03 (d, 2H). Com base nos dados espectrais processados, a pureza média calculada foi de 96.32% (RSD of 0.73%, n=3), indicando um alto grau de rendimento do método empregado (SAMUELS; WANG, 2020).

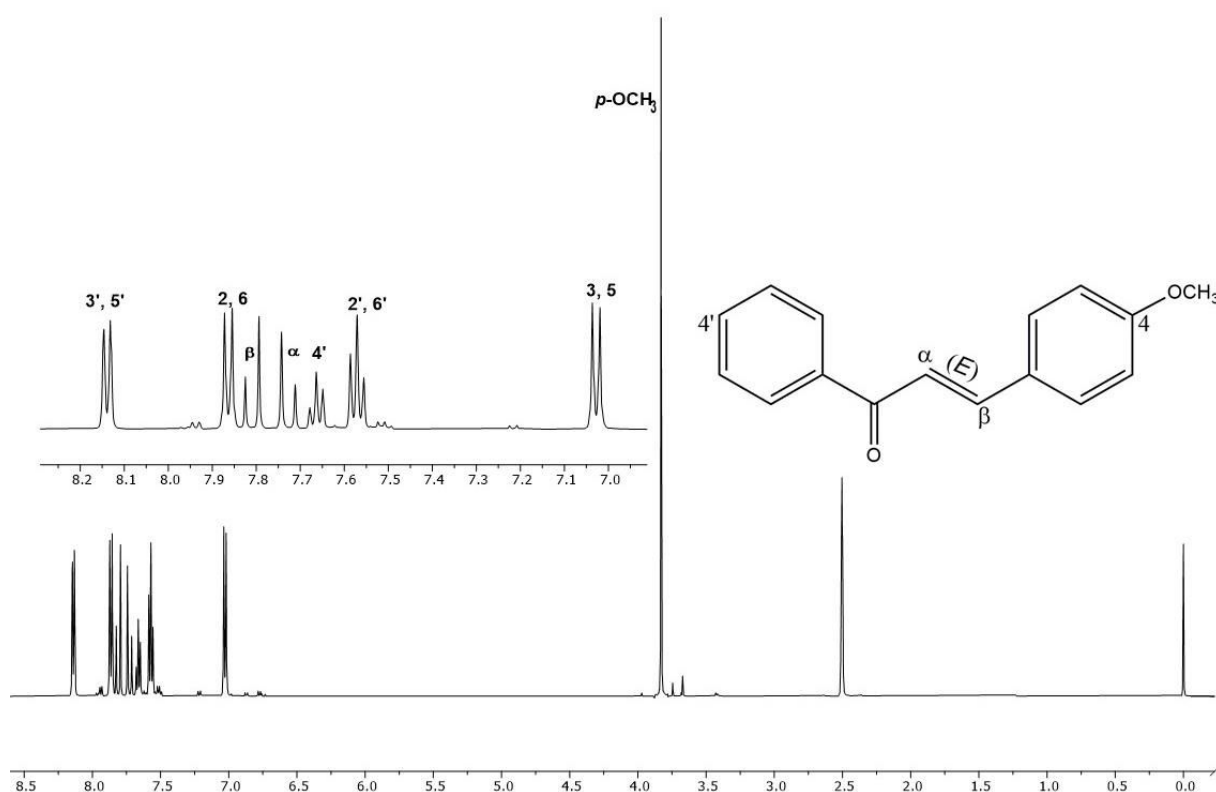


figura 1: ^1H NMR amplificação de espectro e região 7.0 – 8.3 ppm de 4-metoxichalcona (MPP) (DMSO-d_6 , 500 MHz).

2.2 Docking molecular: distribuição pela albumina.

Compreender os aspectos estruturais da ligação do ligante pelas albuminas é importante para a liberação de fármacos, pois a proteína possibilita a solubilização do fármaco, permitindo o transporte pelo sangue. A albumina sérica (SA) mostra uma variedade de locais de ligação, no entanto, de acordo com Sudlow (SUDLOW *et al.*, 1975) duas regiões principais na albumina são responsáveis pela ligação reversível de muitas drogas. O sítio 1, também denominado sítio 1 da droga, é um bolso de ligação localizado no núcleo do subdomínio IIA compreendendo todas as seis hélices dos resíduos do subdomínio 148 –154 do subdomínio IB. O interior da bolsa é predominantemente apolar, mas contém duas regiões de resíduos polares (GHUMAN *et al.*, 2005). Este local liga compostos heterocíclicos volumosos sem um grupo carboxila, por exemplo, varfarina ou fenilbutazona. O sítio 2, denominado sítio 2 da droga, é composto por todas as seis hélices do subdomínio IIIA sendo

semelhante ao sítio 1 (subdomínio IIA), porém menor. Este local é melhor alocado por compostos que possuem um anel aromático e grupos carboxilato que mostram conformação estendida, por exemplo, ibuprofeno e suprofeno (GHUMAN *et al.*, 2005; SUDLOW *et al.*, 1975). Vale ressaltar que tanto a BSA quanto a albumina sérica humana (HSA) são homólogas em estrutura e, devido ao baixo custo de aquisição da BSA, é comum substituir a HSA por BSA para representar as albuminas séricas em estudos experimentais de interação albumina-ligante (AL-MEHIZIA *et al.*, 2019; CAIRNS, 2007). Neste contexto, cálculos de docking da molécula em estudo foram realizados com BSA, focando as interações nos sítios 1 e 2 da droga (Fig. 2), visando apoiar os dados experimentais obtidos.

Para Drug Site 1, o MPP apresentou energia de ligação igual a $-8,5$ kcal/mol para a conformação de maior pontuação, enquanto o naproxeno, o ligante cocrystalizado, apresentou energia de ligação igual a $-9,0$ kcal/mol. A análise do modo de ligação mostrou que o MPP se complexou ao sítio de droga 1 (Fig. 2a) por interação de ligação H com Ser 343, π -sigma com Leu 346, π - π (T-Shaped) com Trp 213 e π -alkyl interações com Arg 194, Val 342, Leu 480 e Ala 209. Quanto ao Drug Site 2, o MPP apresentou energia de ligação igual a $-7,5$ kcal/mol para a conformação de maior pontuação, enquanto o naproxeno apresentou energia de ligação igual a $-8,9$ kcal/mol. A análise do modo de ligação revelou que o MPP complexou com o Drug Site 2 (Fig. 2b) por interação π -cátion com Arg 409, π -sigma com Thr 448 e interações π -alquil com Arg 194, Val 342, Leu 480 e Ala 209. Embora a molécula tenha apresentado valores de ligação negativos para ambos os locais, o Drug Site 1 parece ser melhor acomodar a molécula em estudo, pois as simulações de docking revelaram um valor mais negativo para MPP neste local ($-8,5$ kcal/mol). Além disso, apesar das interações serem predominantemente apolares em ambos

os sítios, no sítio de droga 1 uma forte ligação H é formada seguida por interação π - π (em forma de T), indicando maior estabilidade para o complexo BSA-MPP quando o MPP se liga ao Drug Site 1. Além disso, o tamanho do Drug Site 1 contribui para uma melhor alocação da molécula, pois este site é maior que o Drug Site 2, o que favorece melhores interações.

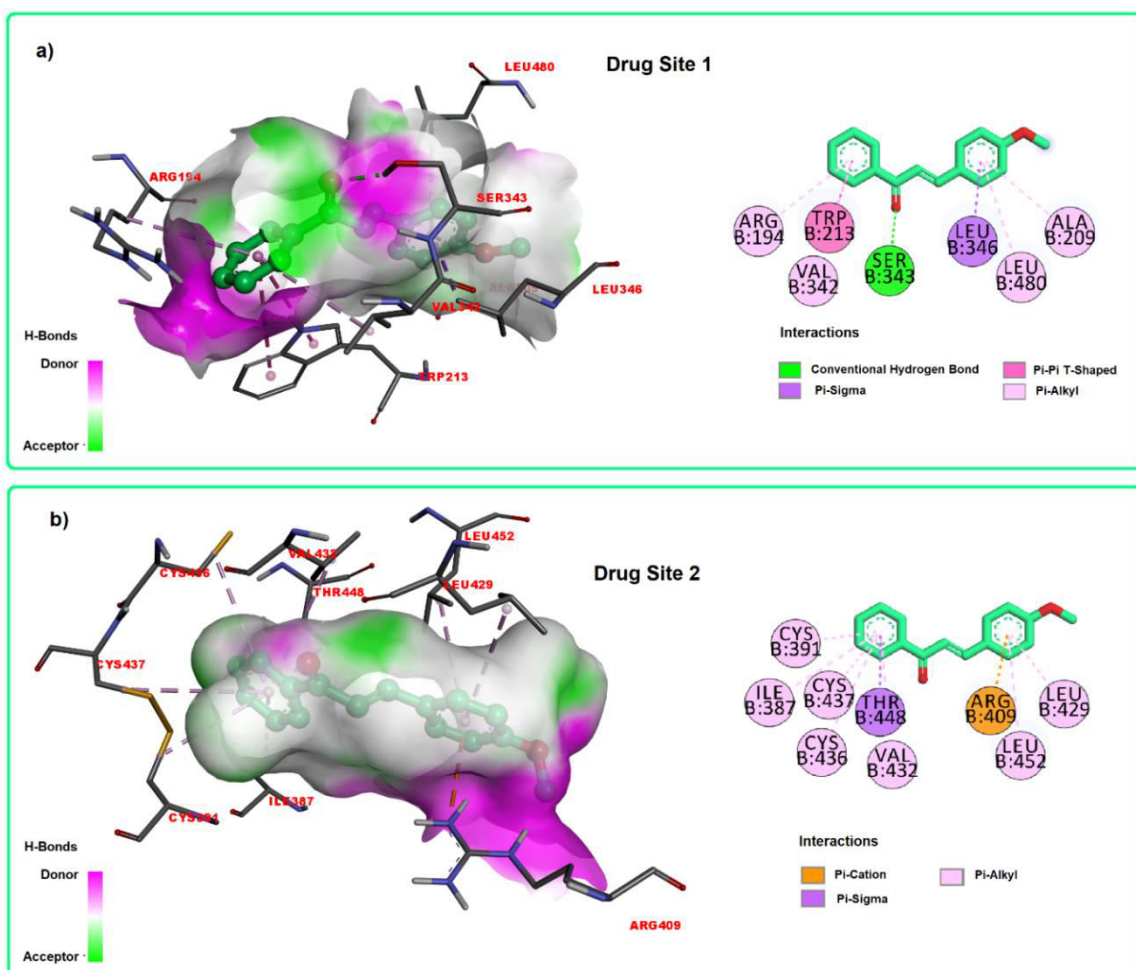


figura 2: Calculo de doking de MPP em sítios ativos da BSA representando interações 3D e 2D no sítio da droga 1 (a) e representando interações 3D e 2D no sitio da droga 2 (b).

2.3 Doking Molecular: Validação das proteínas.

Na validação das proteínas cristalizadas com seus inibidores, os seguintes resultados foram obtidos: A Dipeptidil peptidase IV (4A5S) com um derivado da deazaxantina apresentou RMSDM de 0,7903 (CHEMPLP) e 0,6275 (GoldScore),

enquanto a Proteína tirosina fosfatase 1B (1C83) com o ácido carboxílico 6-(oxalil-anino)-1H-indole-5 mostrou RMSDM de 6,3895 (CHEMPLP) e 1,5438 (GoldScore), conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1: Validação de Proteínas.

Proteína (R) - Inibidor	FUÇÕES DE PONTUAÇÃO DO GOLD					
	CHEMPLP			GoldScore		
	RMSD _M	GMO _(n=15)	FITNESS _(MP)	RMSD _M	GMO _(n=15)	FITNESS _(MP)
DPP-4 (6,5Å) Derivado deazaxantina	0,7903	10	108,4014	0,6275	14	89,1528
PTP _{1B} (7Å) OAI	6,3895	5	51,6167	1,5438	9	51,9845

R= Radio do sitio de ligação em Angstrom (Å).

RMSD_M = Media do desvio padrão Quadrático (Media das poses sobrepostas entre si em 3D).

GMO_(n=15) = Grupo de maior ocorrência, n=15.

FITNESS_(MP) = Pontuação do logaritmo de seleção da melhor pose do GMO (menor RMSD) de cada função (CHEMPLP e GoldScore) que dá o software GOLD.

Baseado nestes resultados a função de pontuação GoldScore foi validado para as proteínas DPP-IV e PTP1B por ter um RMSD $\leq 2\text{\AA}$ e um FITNESS maior de 50. Na validação das proteínas foram usadas as 4 funções de pontuação: CHEMPLP, GoldScore, ChemScore e ASP, mas as dois ultimas não foram apresentados na tabela 1 porque os FITNESS são muito baixos.

2.4 Doking: Enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-4, PDB: 4A5S) PMID: 22177783

A enzima 4A5S é uma hidrolase proveniente do *Homo sapiens* (homem) cujo gene foi expresso em *Escherichia coli*, a estrutura em 3D foi gerada mediante o método de cristalografia de raios X com uma resolução de 1,62 Å (Ångstroms). Esta enzima foi validada com a função de pontuação GoldScore com um rádio de 6,5 Å no sitio de ligação. A molécula padrão usada para comparar o MPP (Fitness: 53,98) foi a Sitagliptina (Fitness: 56,24).

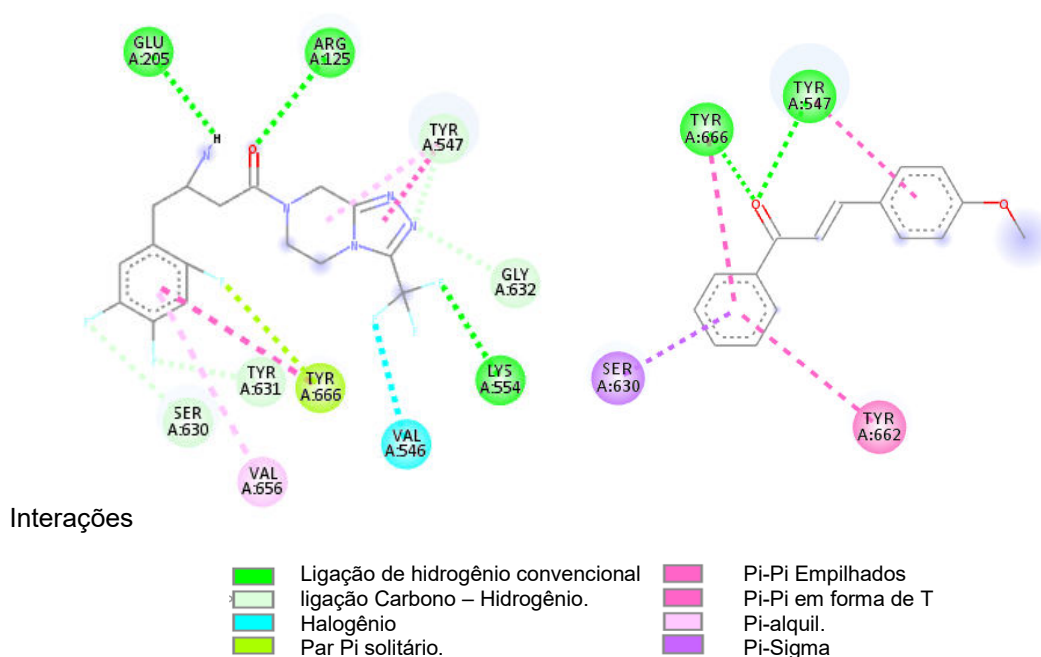


figura 3: Visualização das interações dos ligantes Sitagliptina (A) e MPP (B) no sítio de ligação da enzima DPP-IV.

Na figura 3 podemos observar que o padrão sitagliptina apresenta 13 ligações com o sítio de ligação da enzima onde mostra 3 ligações de hidrogênio com os aminoácidos Arg125, Glu205 e Lys554; 1 ligação halogênio com o aminoácido valina 546; 4 ligações de carbono – hidrogênio com o Tyr547, serina 630, Tyr631 e Ser632; 5 ligações pi com Tyr547 (2 vezes), Tyr666 (2 vezes) e a Val656.

O MPP apresenta 6 ligações com o sítio de ligação da enzima onde mostra 2 ligações de hidrogênio com os aminoácidos Tyr547 e Tyr666; 3 ligações pi com os aminoácidos Ser630, Tyr662 e Tyr 666. Os híbridos da Dihidropirimidina Ftalimida também mostraram ter atividade sob a DPP-IV *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, possivelmente por se ligar com o aminoácido Tyr547 (MOURAD *et al.*, 2021). As chalconas tem afinidade pelos principais resíduos dos aminoácidos chaves da enzima DPP-IV que são o Tyr547, Tyr585, Tyr666 e Tyr662 (RAMMOHAN *et al.*, 2020). Este resultado nos mostra que o MPP tem grande possibilidade de

apresentar atividade inibitória sob a enzima DPP-IV por se ligar nos principais aminoácidos chaves e também por possuir um FITNESS muito similar ao padrão, quanto maior o FITNESS maior a qualidade ou aptidão da interação das moléculas com a proteína alvo.

2.5 Proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B, PDB: 1C83) PMID: 19032093

A enzima 1C83 é uma hidrolase proveniente do *Homo sapiens* (homem) cujo gene foi expresso em *Escherichia coli*, a estrutura em 3D foi gerada mediante o método de cristalografia de raios X com uma resolução de 1,8 Å (Angströms). Esta enzima foi validada com a função de pontuação GoldScore com um rádio de 7 Å no sítio de ligação. A molécula padrão usada para comparar o MPP (Fitness: 49,91) foi o ácido benzóico 2-(oxalilamino) (Fitness: 46,94).

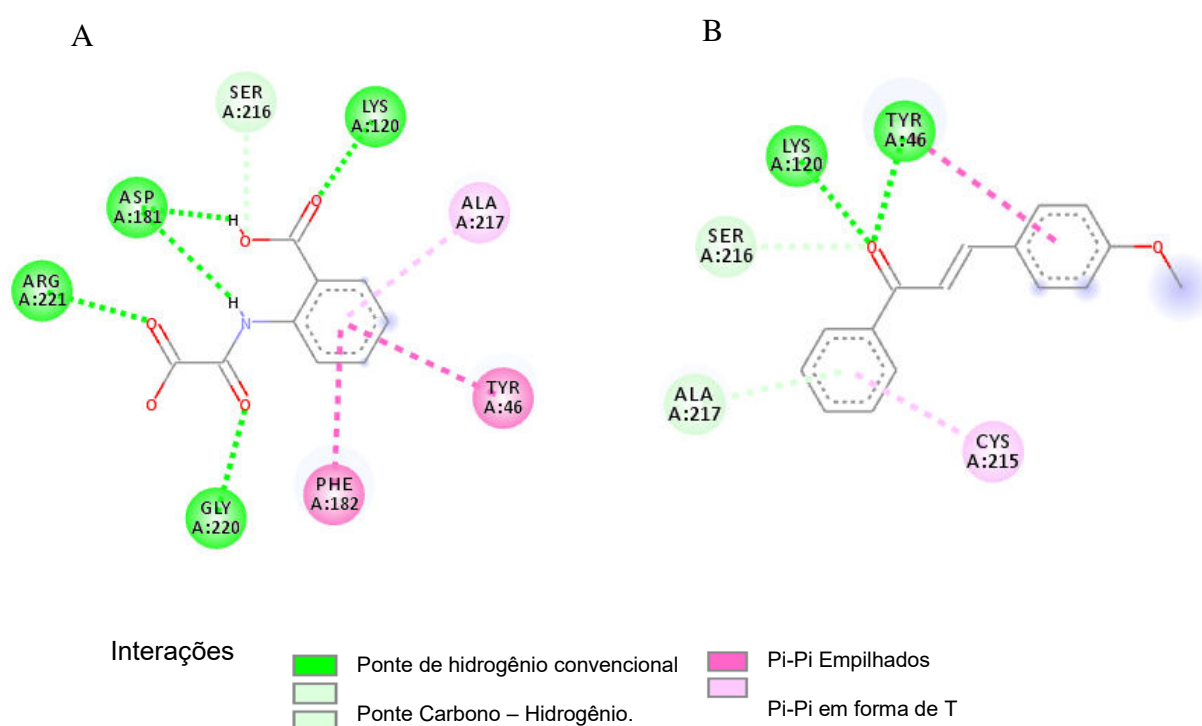


figura 4: Visualização das interações dos ligantes ácido benzóico 2-(oxalilamino) (A) e MPP (B) no sítio de ligação da enzima PTP1B.

Ainda não existem fármacos no mercado que inibiam a PTP1B, mas existem protótipos de fármacos que mostram atividade *in vitro* como o ácido benzóico 2-

(oxalilamino) e seus derivados é importante mencionar que os aminoácidos Tyr46, Asp181 e Lis120 da PTP1B foram nossos principais alvos por desempenhar um papel fundamental na atividade da enzima(ANDERSEN *et al.*, 2000). O ácido benzóico 2-(oxalilamino) interage com esses aminoácidos com 4 ligações de hidrogênio e tem uma pontuação FITNESS de 46,49, o MPP liga-se com Tyr46 e Lis120 por 3 pontes de hidrogênio (Fig. 4) e sua pontuação Fitness é 49,91 mostrando que a interação é energeticamente muito favorável e que o ligante tem grande potencial para ser um inibidor eficiente da PTP1B.

2.6 Atividade antiglicante

O acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs) é acelerado em condições hiperglicêmicas, os quais têm sido associados aos vários distúrbios patológicos das complicações diabéticas(SARMAH; ROY, 2022). Por isso, a literatura tem reportado metodologias de combate à formação de AGEs analisando tanto agentes sintéticos quanto naturais para a prevenção dessas complicações(RAMOS *et al.*, 2019; THORNALLEY, 2003).

Uma vez que a albumina sérica desempenha um papel dominante na sua biodisponibilidade para o transporte de fármacos, a eficiência de compostos como agentes farmacêuticos depende da sua capacidade de interação com essa proteína [36]. Uma vez que não há informações científicas sobre o efeito antiglicante em modelos de albumina sérica de MPP. O presente estudo avaliou o efeito antiglicação de MPP pelas vias oxidativa (BSA/GO) e não oxidativa (BSA/frutose). A análise dos resultados evidencia que MPP inibe a glicação de BSA tanto pela via oxidativa (CI_{50} de $8.8 \pm 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$), quanto pela via não oxidativa ($CI_{50} = 16.2 \pm 0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$). MPP apresentou resposta significativa em relação aos padrões positivos quercetina ($CI_{50} = 35.6 \pm 0.9 \mu\text{g mL}^{-1}$) e aminoguanidina ($CI_{50} = 28.6 \pm 1.4 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente

($p < 0.05$). Portanto, esses dados sugerem que MPP pode ser considerado um potente agente antiglicante, que poderá agir tanto no estágio inicial quanto no estágio de glicação avançada em pacientes diabéticos. (Fig. 5)

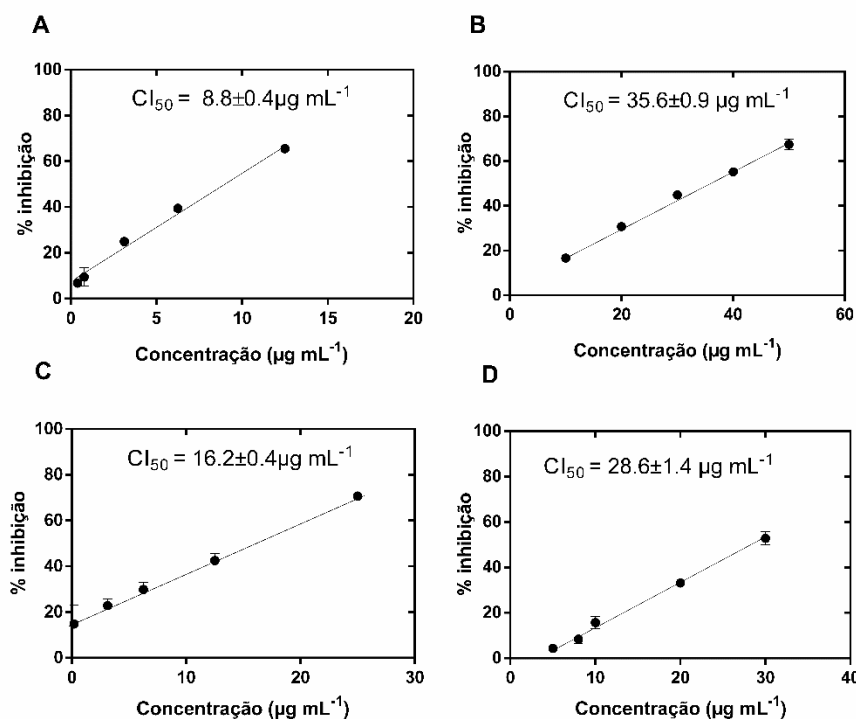


figura 5: O efeito da MPP na formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs). Atividade antiglicante por via oxidativa: CI_{50} do MPP (A) e CI_{50} da Quercetina (B). Atividade antiglicante por via não oxidativa: CI_{50} do MPP (C) e CI_{50} da Aminoguanidina (D).

2.7 Atividade hemolítica e efeito citotóxico em células MRC-5 cell

O efeito citotóxico de MPP foi avaliado em células de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) nas concentrações de 0.6 μM a 20.0 μM em 24h, 48h e 72h de incubação (Fig. 6a). MPP apresentou viabilidade celular de $108.4 \pm 8.1\%$ (24h), $110.3 \pm 9.1\%$ (48h) e $85.5 \pm 1.5\%$ (72h) na concentração de 20 μM . Portanto, a concentração que causa 50% de inibição celular, $\text{CI}_{50} > 20.0 \mu\text{M}$. O controle positivo doxorrubicina (20 μM) reduziu significativamente a viabilidade celular em aproximadamente 90.0% após 72h. Já em comparação ao grupo de controle de células não tratadas, MPP não apresentou diferença significativa tanto nas concentrações testadas quanto nos diferentes tempos de incubação ($p > 0.05$).

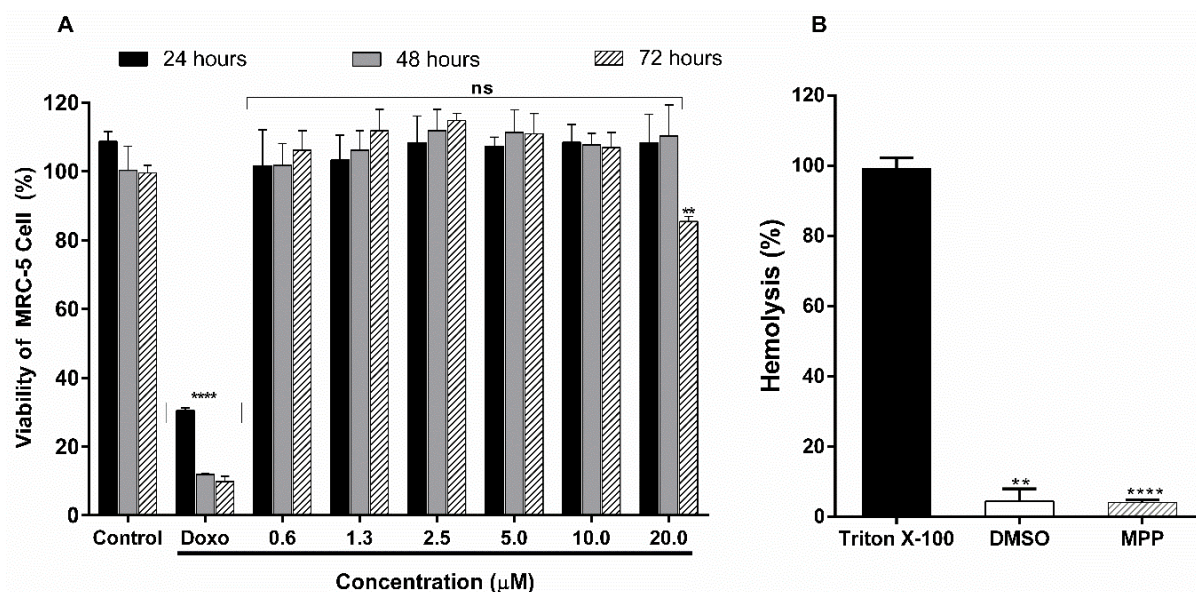


figura 6: Atividade hemolítica de MPP na concentração de 420 μM em comparação com o padrão Triton X-100. Resultados com média ± desvio padrão (n=3). **** $p < 0.0001$. (B) Viabilidade celular do grupo de controle não tratado, controle positivo doxorrubicina a 20 μM (doxo) e MPP em diferentes concentrações por período de 24, 48 e 72 horas em linhagem celular de MRC-5. Resultados foram apresentados em média ± DP (n=3). ns = Não significativa ($p > 0.05$) vs. grupo de controle não tratado; ** $p < 0.01$ (ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett).

Além disso, como apresentado na Figura. 6b, MPP apresentou baixa atividade hemolítica ($4.1 \pm 0.6\%$) (420 μM) em comparação com o padrão triton X-100 ($99.1 \pm 2.9\%$) ($p < 0.005$). Já em comparação com o controle negativo (DMSO) não foi encontrada diferença significativa ($p > 0.05$). Portanto, esses resultados nos revelam que MPP não apresenta toxicidade nas concentrações e modelos experimentais testados.

2.8. Inibição da α-Glicosidase

A inibição da atividade catalítica da enzima α-glucosidase leva ao retardo da absorção da glicose e à redução da glicemia pós-prandial(JABEEN *et al.*, 2014). Diante do potencial antidiabético de derivados de chalcona(ADELUSI *et al.*, 2021; HSIEH *et al.*, 2012), MPP foi inicialmente avaliado quanto ao potencial inibitório da enzima α-glucosidase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* e de pós de acetona intestinal de rato. Esse constituinte exibiu elevada atividade inibitória da enzima de *S. cerevisiae* ($93.2 \pm 1.5\%$) com CI_{50} de $24.5 \pm 0.8 \mu g mL^{-1}$, em comparação ao

padrão acarbose ($24.1 \pm 1.5\%$). Esse resultado diverge de um estudo previamente descrito, em que foi demonstrado a inatividade dessa chalcona frente a α -glucosidase de levedura (JABEEN *et al.*, 2014). O controle positivo quercetina apresentou inibição de $99.6 \pm 0.3\%$ (Fig. 7) com CI_{50} de $5.9 \pm 0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0.05$), corroborando que esse flavonoide é um inibidor do tipo competitivo e que as posições em C=O e 3-OH (anel C) e as conjugações π do anel B desempenham um papel importante na inibição da enzima (FU *et al.*, 2021).

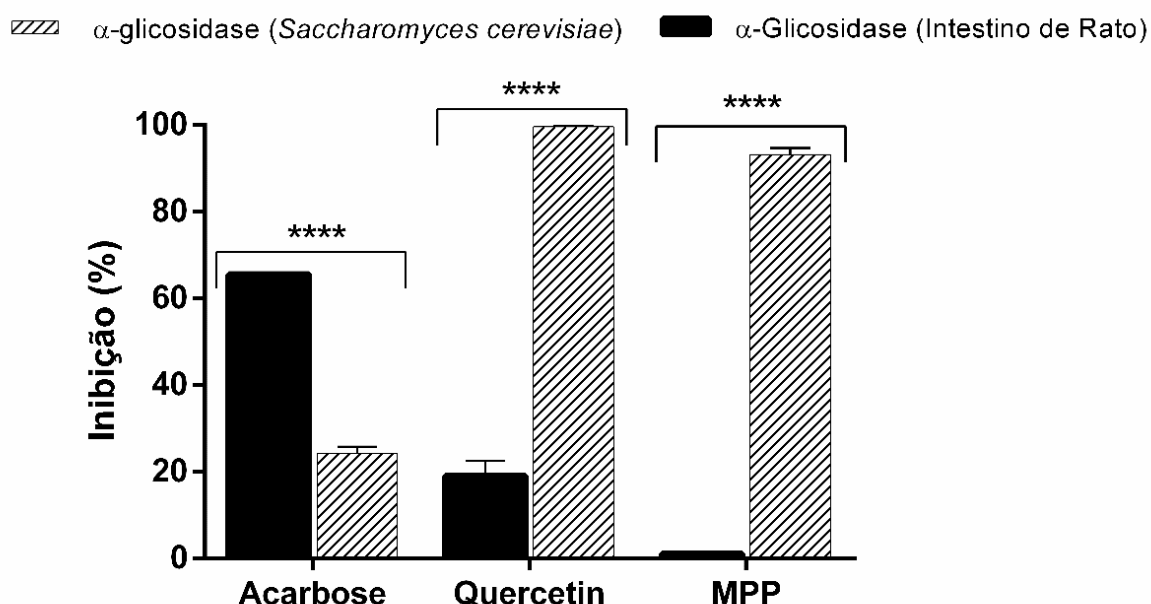


figura 7: Atividade inibitória da acarbose, quercetina e MPP na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ sobre as enzimas α -glucosidase extraída de *Saccharomyces cerevisiae* e α -glucosidase extraída de pós de acetona intestinal de rato. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP, $n=3$. **** $p < 0.0001$ (ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunnett).

Concernente a avaliação inibitória na α -glucosidase de intestino de rato, MPP foi inativo ($1.1 \pm 0.2\%$) em comparação ao padrão acarbose ($65.5 \pm 0.4\%$) ($p < 0.05$). Nossos dados comprovam que o modelo *in vitro* utilizado, com diferentes enzimas, pode comprometer uma comparação confiável entre estudos, o que levou a investigarmos o mecanismo de ação de MPP em modelo experimental *in vivo*.

2.9. Teste de toxicidade aguda:

Na máxima concentração de 2000 mg kg⁻¹ pc não causo óbito nos camundongos, este resultado condiz com o encontrado na viabilidade celular *in vitro* chegando à conclusão que a doses letal 50 (DL₅₀) do MPP é maior de 2000 mg kg⁻¹ p.c.

2.10. Efeito hipoglicemiante

MPP foi avaliado no teste de tolerância oral a sacarose (TTOS) na concentração de 200 mg kg⁻¹ pc. Inicialmente, camundongos saudáveis foram submetidos a sobrecarga de sacarose, ocasionando níveis elevados de glicose no sangue, acima de 200 mg/dl, durante os 120 min de experimento (GNT) (Fig. 8a). A acarbose foi usada como fármaco padrão e administrada na dose de 100 mg kg⁻¹ p.c. (Acarbose100). Nesse grupo foi observada uma redução no nível de glicose de 47.1%, em 90 min, e foi significativamente diferente em relação ao GNT ($p < 0.0001$). Em contrapartida, o grupo tratado com MPP na dose de 200 mg kg⁻¹ p.c. (MPP200) não reduziu os níveis de glicose e não houve diferença significativa em relação a esse grupo ($p > 0.05$). Portanto, esses resultados corroboram com o estudo de inibição enzimática realizado com α -glucosidase de intestino de rato, *in vitro* (previamente descrito), sugerindo que MPP não inibe a enzima α -glucosidase intestinal.

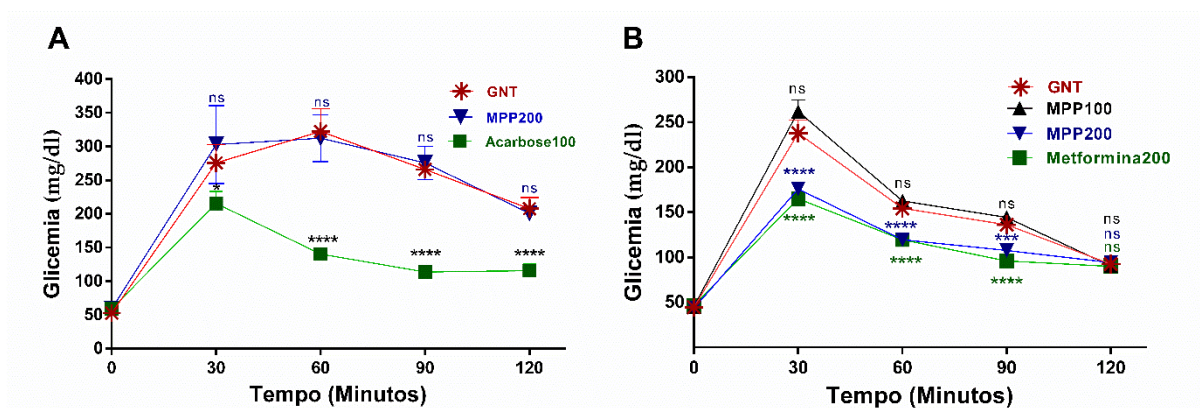


figura 8: (A) Efeito da administração oral do MPP 200 mg kg⁻¹ pc (MPP200) e acarbose 100 mg kg⁻¹ pc (Acarbose100) sob a glicemia em camundongos saudáveis que receberam uma sobrecarga de sacarose. Valores são expressos em média ± desvio padrão, n = 6. **p* = 0.05; *****p* < 0.0001 comparado com grupo saudável não tratado (GNT). (B) Efeito da administração oral do MPP200, MPP100 e metformina 200 mg kg⁻¹ pc (Metformina200) sob a glicemia em camundongos saudáveis que receberam uma sobrecarga de glicose. Valores são expressos em média ± desvio padrão, n = 6. **p* = 0.05; *****p* < 0.0001 comparado com grupo controle não tratado. (ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test).

Diante desse resultado, MPP foi submetido ao teste de tolerância oral a glicose (TTOG) em camundongos saudáveis. Neste experimento, os animais receberam uma sobrecarga de glicose, ocorrendo um aumento induzido nos níveis de glicose (GNT), os quais permaneceram elevados acima de 140 mg/dl durante 90 min de experimento (Fig. 8b). Nos animais hiperglicêmicos tratados com MPP na dosagem de 200 mg kg⁻¹ pc (MPP200) foram observadas reduções significativas no nível de glicose, após 30 min (*p* < 0.0001). Da mesma forma, os níveis de glicose no sangue foram continuamente reduzidos para 61.1% e 53.4%, após 60 min. Enquanto que, o grupo tratado com metformina na dose de 200 mg kg⁻¹ pc (Metformina200) causou redução para 58.0 e 54.4% (90 e 120min, respectivamente) e não houve diferença significativa em relação ao grupo tratado com MPP200 (*p* > 0.05). Para o grupo de animais tratados com MPP na dosagem de 100 mg kg⁻¹ pc (MPP100), não foi observada diferença significativa nos níveis de glicose em comparação ao GNT, durante todo o experimento (*p* > 0.05). Esses dados sugerem que MPP200 evita significativamente o aumento da glicemia.

Para avaliar o potencial hipoglicemiante de MPP, animais com diabetes tipo 2 induzidos por estreptozotocina (STZ) foram tratados com MPP nas dosagens de 100 e 200 mg kg⁻¹ pc. (MPP100 e MPP200, respectivamente). Esses animais com jejum de 12h receberam uma sobrecarga de glicose (TTOG) e os níveis de glicose no sangue elevaram acima de 300 mg/dl (T0 min) (Fig. 9).

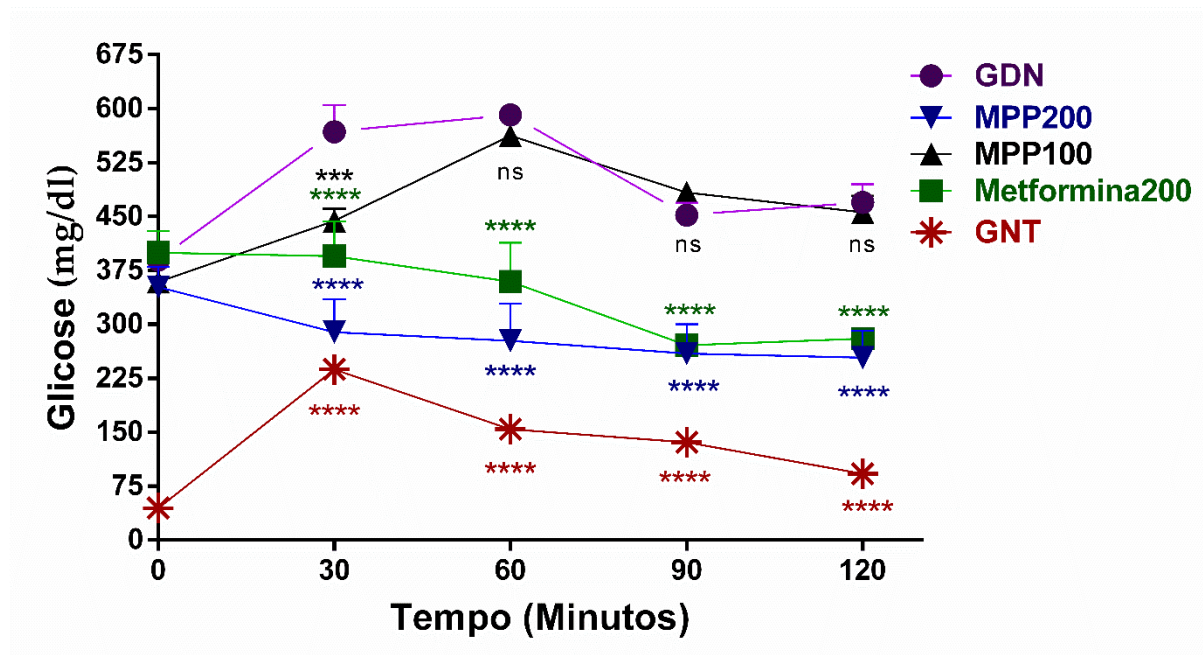


Figura 9: Efeitos da administração oral de MPP e metformina sobre a concentração de glicose no sangue em camundongos diabéticos hiperglicêmicos. Metformina 200: metformina 200 mg kg⁻¹ pc (controle positivo); MPP100 e MPP200: 4-metoxicalcona (100 mg kg⁻¹ e 200 mg kg⁻¹ de peso corporal, respectivamente). GDN: Grupo diabético não tratado. GNT: grupo de camundongos saudáveis não tratados. Os valores são expressos como média ± Desvio padrão, n = 6. ns = não significativo ($p > 0,05$), **** $p < 0,0001$ vs. grupo de controle não tratado (ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett).

A administração de MPP200 reduziu significativamente o estado de hiperglicemia nos animais diabéticos induzidos por STZ, a partir de 30 min. Essa redução nos níveis glicêmicos não foi significativamente diferente em relação ao grupo de animais tratados com metformina na mesma dosagem ($p > 0.05$). No entanto, não houve diferença significativa nos níveis de glicose nos animais tratados com MPP100 em comparação ao grupo de animais diabéticos não tratados (DNTG), a partir de 60 min ($p < 0.05$). Portanto, nosso estudo revelou o potencial hipoglicemiante de MPP (MPP200) através do mecanismo de captação celular de

glicose. Esses dados corroboram um estudo anterior que relata o potencial de MPP na redução de glicose por esse mecanismo, *in vitro* (HSIEH *et al.*, 2012a). Investigações com derivados de chalconas têm relacionado a atividade antidiabética ao seu potencial de ligação ao receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- γ) (HSIEH *et al.*, 2012; JUNG *et al.*, 2006). Presumimos que MPP pode ser usado como agente antidiabético e análises pré-clínicas adicionais já estão em andamento.

2 Desenho experimental

3.1 Materiais

Pó intestinal de acetona de rato, α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, acarbose, 4-nitrofenil α -D-glucopiranosídeo, sal sódico de resazurina, penicilina-estreptomicina, estreptozotocina (STZ), glicoxal, solução salina tamponada com fosfato (PBS), albumina de soro bovino (BSA), aminoguanidina, frutose adquirida da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). A linha celular MRC-5 (cultura de fibroblastos pulmonares humanos) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil). Metanol e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, EUA). O solvente deuterado dimetilsulfóxido com tetrametilsilano (TMS, D, 98,0 %) foi adquirido de Cambridge Isotope Laboratories Inc. (CIL, Andover, Massachusetts, EUA). A reação foi monitorada por TLC usando sílica gel F-254 Glass Plate (20 x 20 cm). A medida do ponto de fusão foi determinada em um aparelho de ponto de fusão eletrotérmico (MQAPF-302, Microquímica Equipamentos Ltda, Palhoça, SC, Brasil).

3.2 Sínteses

A síntese de 4-metoxichalcona [(*E*)-3-(4-metoxifenil) -1-fenilprop-2-en-1-one] foi realizada pela reação de condensação de Claisen-Schmidt. Acetophenone (8.5 mmol) e *p*-methoxybenzaldehyde (8.5 mmol) foram dissolvidos em etanol (95%).

Solução de sodium hydroxide (50% w/v, 0.05 eq.) foram adicionados a uma mistura de *p*-metoxi-benzaldeído (0.12 eq.) e acetofenona (0.10 eq.) A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente. Posteriormente, permaneceu na temperatura de 5 a 10 °C até a cristalização. A reação foi monitorada por TLC usando sílica gel F-254 Glass Plate (20 x 20 cm). O produto bruto foi separado por filtração à vácuo e recristalizado em etanol (70%) sob resfriamento, obtendo um rendimento de 92% de MPP.

3.3 Caracterização por NMR e ESI-MS/MS

As análises de NMR (^1H , ^{13}C , DEPT135, ^1H - ^1H COSY, HSQC e HMBC) de MPP foram realizadas utilizando um espectrômetro de RMN [Bruker® Avance III HD 500.13 MHz para prótons e 125.8 MHz para ^{13}C , BBFO Plus SmartProbe™ (New York, NY, USA)] a 298.0 K. Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos usando a sequência de pulso zgpr (supressão de sinal residual de água). Os deslocamentos químicos são apresentados em ppm tendo como referência interna o TMS (0.0 ppm). Para a caracterização da estrutura química por NMR, as seguintes abreviações foram usadas: *s* = simpleto, *d* = duplete, *m* = multiplete e *J* (constante de acoplamento em Hz). Para aquisição dos espectros de massas foi utilizado um espectrômetro de massa triplo quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access (Thermo Scientific™, San Jose, CA, EUA). A amostra foi solubilizada em clorofórmio (1 mg mL⁻¹) e posteriormente foi diluída para 5 µg mL⁻¹. A fonte de ionização Eletrospray (ESI) em modo positivo para as análises ESI-MS e ESI-MS/MS por infusão direta (5 µL) foi utilizada. As condições analíticas foram as seguintes: faixa de aquisição *m/z* 100 – 1000 Da, potencial do capilar de 40 V; voltagem do spray de 8 kV; temperatura do capilar 247 °C; gás de arraste (N₂), fluxo de 11 unidades arbitrárias (arb). A fragmentação foi realizada com energia de colisão entre 35 a 45 eV. O

software Xcalibur™ versão 2.2 (Thermo Scientific™) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos espectros.

(*E*)-3-(4-methoxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one (MPP): Yellow powder, yield: 92%, mp: 108.4 - 110.1 °C. Molecular formula: C₁₆H₁₄O₂. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.86 (2H, *d*, *J*=8.7 Hz, H-2; H-6); δ 7.03 (2H, *d*, *J*=8.7 Hz, H-3; H-5); □ 7.73 (1H, *d*, *J*=15.5, H-α); δ 7.80 (1H, *d*, *J*=15.5, H-β); δ 7.57 (2H, *d*, *J*=7.3 Hz, H-2'; H-6'); δ 8.14 (2H, *m*, H-3'; H-5'); □ 7.66 (1H, *d*, *J*=7.3 Hz, H-4'); □ 3.83 (3H, *s*, *p*-OCH₃); **¹³C NMR** (125.8 MHz, DMSO-*d*₆): 55.8 (*p*-OCH₃); 114.8 (C-3; C-5); 120.1 (C-α); 127.6 (C-1); 128.9 (C-3'; C-5'); 129.1 (C-2'; C-6'); 131.3 (C-2; C-6); 133.4 (C-4'); 138.2 (C-1); 144.5 (C-β); 161.7 (C-4); 189.6 (C=O). **ESI-MS**: *m/z* 239.0 [M+H]⁺. **MS/MS** [M+H]⁺: 105.2 (100%), 133.1 (69.4%), 161.0 (74.2%).

3.4 Determinação de pureza por qNMR ¹H

A pureza de MPP por NMR quantitativa de ¹H (qNMR) foi determinada usando o padrão externo tereftalato de dimetila (TD) (pureza certificada, 99.988 ± 0.060 %, Inmetro, Rio de Janeiro, Brazil). Este padrão foi preparado (n=3) em DMSO-*d*₆ (530.0 μL), com TMS como referência interna (0.0 ppm). Inicialmente, realizou-se a calibração do pulso de 90° para todas as amostras utilizando a sequência de pulso zg. A constante de relaxação longitudinal (T₁) foi estimada para os hidrogênios em 8.08 (s, 4 H) pelo experimento de Inversão-Recuperação (t1ir1d). Os espectros de ¹H foram adquiridos utilizando a sequência de pulso zgpr (supressão de sinal residual de água), sem rotação de amostra. As aquisições medidas do padrão (AQ) foram de 3,27 s, intervalo de relaxação (d1) de 22 s (7xT₁+AQ), 64k pontos no Domínio do Tempo (TD) e uma janela espectral (SW) de 19.99 ppm.

MPP (4.80 ± 0.02 mg, n = 3) foi dissolvido em 530.0 μL de DMSO-*d*₆ contendo TMS (≥ 99.0 % de pureza) como referência interna (0.0 ppm). Essas soluções

permaneceram no ultrassom por 5 min (25.0 °C) e, em seguida, foram transferidas para tubos de RMN de 5 mm de diâmetro (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Os parâmetros de aquisição de RMN de ^1H de MPP foram padronizados para o sinal em 7.03 ppm (d, 2 H). A constante T1 foi estimada pelo experimento de Inversão-Recuperação (t1ir1d). Os parâmetros de aquisição otimizados foram os seguintes: P1 10.2 μs , AQ de 3.27 s, d1 de 15 s (7xT1+AQ), TD de 64 K, SW of 19.99 ppm, número de transientes de 4, varreduras fictícias de 2, valor de ganho do receptor 90,5. O software TopSpin™ 4.1.3 foi usado para o processamento dos espectros de RMN. A pureza de MPP foi determinada pela Eq. (1) (SAMUELS; WANG, 2020):

$$P_{\text{MPP}} = (I_{\text{MPP}}/I_{\text{TD}}) \times (N_{\text{TD}}/N_{\text{MPP}}) \times (M_{\text{MPP}}/M_{\text{TD}}) \times (W_{\text{TD}}/W_{\text{MPP}}) \times P_{\text{TD}} \quad (1)$$

Onde I é a área da integral absoluta, (N) número de núcleos, (M) massa molar, (W_{TD} e W_{MPP}) peso, (P_{MPP}) pureza do analito e (P_{TD}) pureza do padrão.

3.5 Docking Molecular:

3.5.1 Farmacocinética: distribuição

Cálculos de docking molecular foram realizados com o auxílio do software AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010) para avaliar a interação do MPP com a albumina sérica bovina (BSA), que foi obtida do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) sob o código 4OR0 (BUJACZ; ZIELINSKI; SEKULA, 2014). O protocolo de docking consistiu em remover moléculas de água e ligante (naproxeno), atribuir cargas de Gasteiger e delimitar caixas de grade de dimensões $12\text{\AA} \times 10\text{\AA} \times 10\text{\AA}$ centrado no sítio ativo I ($x=69.671$, $y=26.607$, $z=86.784$) e $14\text{\AA} \times 16\text{\AA} \times 14\text{\AA}$ centrado no sítio ativo II ($x=69.574$, $y=28.575$, $z=105.018$). Para validar o protocolo de docking, o ligante naproxeno foi removido e encaixado nos sítios I e II e comparado com as estruturas cristalizadas em cada sítio por cálculo de

RMSD. Os valores de RMSD obtidos foram 1,93 e 0,85 para os locais I e II, respectivamente. Valores até 2Å são considerados confiáveis para uma validação de encaixe.

3.5.2 Atividade sob a DPP-IV e PTP1B

Com o intuito de aprimorar e desvendar possíveis atividades biológicas baseadas nas propriedades químicas e físicas da estrutura do MPP foi realizado uma simulação de encaixamento dos possíveis sítios ativos utilizando GOLD 5.7.2. As distâncias de ligação e os ângulos de ligação da água foi restringido usando o algoritmo SETTLE (MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992). Os comprimentos de ligação dentro da proteína foram limitados com o algoritmo LINCS (BERK HESS *et al.*, 1997). As proteínas usadas foram: dipeptidil peptidase IV (4A5S) e proteína tirosina fosfatase 1B (1C83) ligadas com seu inibidor foram baixadas do banco de dados de proteína (PDB, <http://www.rcsb.org/>).

O parâmetro usado para validar estas proteínas foi o “desvio padrão quadrático” (RMSD), que mostra a média das possíveis poses do ligante e para que a ancoragem seja favorável o RMSD tem que ser menor a 2Å, no final a média das 15 poses do RMSD de cada FUNÇÃO (CHEMPLP, GoldScore, ChemScore e ASP) serão comparadas entre si para escolher o menor RMSD e essa FUNÇÃO será validada para essa proteína (TROTT; OLSON, 2010).

3.6 Ensaio *In vitro*

3.6.1 Ensaio glicação Albumina Bobina Sérica (BSA)

O ensaio de glicação, *in vitro*, foi realizado por dois métodos: modelo BSA/GO (albumina de soro bovino e glioxal) e modelo BSA/frutose, conforme anteriormente descrito por (KIHO *et al.*, 2004) e adaptado por (RAMOS *et al.*, 2019). Para o modelo BSA/GO, as soluções de glioxal (30 mM) e BSA (8 mg mL⁻¹) foram preparadas em

tampão fosfato (200 mM, pH 7.4) contendo azida de sódio (3.0 mM, pH 7.4) como agente antimicrobiano. Para determinar a atividade antiglicante, em uma microplaca foram adicionados 30 μL de MPP (1 mg mL^{-1} em DMSO), BSA (135 μL) e glioxal (135 μL), e a leitura inicial de fluorescência foi realizada (F1). Após 24 h de incubação a 37 °C foi realizada a leitura final de fluorescência (F2). A quercetina foi usada como padrão positivo (100.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e DMSO como controle negativo. Para o modelo BSA/frutose foi realizado conforme descrito anteriormente, com exceção do glioxal que foi substituído pela frutose (100 mM). Para determinar a atividade antiglicante por essa via, a microplaca foi incubada por 120h a 37 °C. Aminoguanidina foi utilizado como padrão positivo (100.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As leituras de fluorescências foram realizadas no leitor de microplaca (excitação 330 nm e emissão 420 nm) (DTX 800, Beckman Coulter, CA, USA). A concentração inibitória 50% (IC_{50}) de MPP e do padrão foi determinada por meio de diluições seriadas em DMSO (0.2 – 100.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada conforme a Eq. (2):

$$\left[\% \text{ inibição} = 100 - \frac{(F_2 \text{ (amostra/padrão)} - F_1 \text{ (amostra/padrão)})}{F_2 \text{ (amostra/padrão)} - F_2 \text{ (amostra/padrão)}} \times 100 \right] \quad (2)$$

3.6.2 Ensaio inibição *in vitro* α -glucosidase

A atividade inibitória da enzima α -glucosidase foi baseada na medição da liberação de 4-nitrophenol a partir do 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (4-NPGP). Os experimentos foram realizados utilizando as enzimas α -glucosidase, extraída de pós de acetona intestinal de rato, e α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*. O substrato 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (4-NPGP) e as duas enzimas foram diluídos em tampão fosfato (10 mM, pH 6.9), separadamente. Cada experimento foi realizado de forma independente, seguindo o mesmo protocolo

experimental(ANDRADE; BECERRA; CÁRDENAS, 2008). Em uma microplaca, 30 μ L de MPP (1 mg mL^{-1} , em DMSO) e 170 μ L da enzima ($0.08 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) foram incubados por 5 min a 37°C sob proteção de luz, e a primeira leitura foi realizada (R1). Posteriormente, 100 μ L do 4-NPGP (5 mg mL^{-1}) foram adicionados, e após 20 min de incubação foi realizada a segunda leitura a 405 nm (R2). DMSO foi usado como controle negativo e o padrão acarbose como controle positivo. Os experimentos foram realizados em triplicata. As leituras foram realizadas em um leitor de microplaca (DTX 800, Beckman Coulter, CA, USA). Para o cálculo da porcentagem de inibição foi utilizada a Eq. (3):

$$[\% \text{ inibição} = 100 - (R2_{\text{amostra/padrão}} - R1_{\text{amostra/padrão}} / R2_{\text{amostra/padrão}} - R1_{\text{amostra/padrão}}) \times 100] \quad (3)$$

3.6.3 Teste hemolítico

O teste de potencial hemolítico foi realizado segundo(JIMENEZ *et al.*, 2003). O sangue de um camundongo Swiss foi coletado por via intracardíaca para preparação de suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Em uma microplaca, foram adicionados 100 μ L de MPP ($420 \text{ } \mu\text{M}$) e 100 μ L da SE foram adicionados. Posteriormente, a microplaca foi incubada por 1 hora sob agitação constante a 37°C . Após esse período, as amostras foram centrifugadas (1500 rpm/10 min) e o sobrenadante foi transferido para outra microplaca e a leitura da absorbância foi realizada no espectrofotômetro a 540 nm (DTX 800, Beckman Coulter, CA, USA). Como controle positivo foi utilizado Triton X-100 (0.5%) e negativo DMSO. The assay was performed in triplicate.

3.6.4 Teste de viabilidade celular

A citotoxicidade de MPP em células de fibroblasto de pulmão humano (MRC-5) foi determinada segundo Mosmann *et al* (1983)(MOSMANN, 1983), com

adaptações. O método é baseado na redução enzimática de MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) para formação de cristais de formazan. As células MRC-5 foram plaqueadas (5×10^3 células/poço) e tratadas com 100 µL de MPP em diferentes concentrações (0.6 – 20.0 µM). A microplaca foi incubada por 72 horas (37 °C, 5% de CO₂). Após esse período, a lavagem dos poços com PBS (pH 7.2) foi realizada e, em seguida foram adicionados 100 µL de MTT (0.5 mg mL⁻¹). A microplaca foi incubada por mais 4 h a 37 °C, sob proteção de luz. As células viáveis metabolizam o MTT em cristais de formazan de coloração roxo. Posteriormente, 100 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazan foram adicionados, e após 5 min à temperatura ambiente foi realizada a leitura a 560 nm (DTX 800, Beckman Coulter, CA, USA). A doxorrubicina (20 µM) foi usada como controle positivo e PBS como controle negativo de morte celular. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem e a viabilidade foi calculada usando a Eq. (4):

$$[\% \text{ viability} = (\text{Abs sample}/\text{Abs control}) * 100] \quad (4)$$

3.7 Ensaios *in vivo*

3.7.1 *Animals*

Os protocolos experimentais seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Brasil e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) (protocolo n°. 004/2019). Para este estudo foram usados camundongos Swiss albinos (Unib:SW), machos, 6 semanas de idade, pesando 18 - 20 gramas, obtidos do Biotério Central da UFAM, Manaus, Brazil. Os animais foram mantidos sobre condições padrão de laboratório (ciclo claro-escuro de 12 horas,

temperatura de 22 ± 2 °C e umidade relativa de $50 \pm 10\%$) e alimentados com ração padronizada para roedores.

3.7.2 Teste de tolerância oral a sacarose (TTOS)

O teste de tolerância oral a sacarose foi realizada como descrito por Zulkawi et al (2018)(ZULKAWI *et al.*, 2018), com alterações. Os camundongos saudáveis foram divididos em três grupos de seis animais. Na véspera do experimento, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas para mensurar a glicemia com auxílio de um glicosímetro portátil Precision Xtra (Abbott Diabetes Care, Portugal). Um grupo foi usado como controle não tratado e recebeu solução salina 0.9% (NTG, Grupo 1). Outro grupo recebeu tratamento com acarbose na dose de 100 mg kg^{-1} de peso corporal (p.c.) (acarbose100, Grupo 2). Um grupo teste foi tratado com MPP na dose de 200 mg kg^{-1} pc (MPP200, Grupo 3). Após 20 min, todos os grupos receberam uma sobrecarga de sacarose (2000 mg kg^{-1} pc) e amostras de sangue foram coletadas da veia da cauda do animal. O nível de glicemia foi mensurado em diferentes tempos usando o glicosímetro portátil (30 min, 60 min, 90 min, e 120 min). Todas as administrações foram realizadas por via oral (gavagem).

3.7.3 Teste de tolerância oral a glicose (TTOG)

O teste de tolerância oral a glicose foi realizada como descrito por Zulkawi et al. (2018)(ZULKAWI *et al.*, 2018), com alterações. Os camundongos saudáveis foram divididos em quatro grupos de seis animais. Um grupo foi usado como controle não tratado e recebeu solução salina 0.9% (NTG, Grupo 1). Outro grupo recebeu tratamento com metformina na dose de 200 mg kg^{-1} de peso corporal (p.c.) (metformin200, Grupo 2). Dois grupos testes foram tratados com MPP nas doses de 100 mg kg^{-1} pc (MPP100, Grupo 3) e 200 mg kg^{-1} pc (MPP200, Grupo 4). Todos os grupos receberam uma sobrecarga de glicose ($2\ 000 \text{ mg kg}^{-1}$ pc). As amostras de

sangue foram coletadas da veia da cauda do animal. O nível de glicemia foi mensurado em diferentes tempos usando o glicosímetro portátil (30 min, 60 min, 90 min, e 120 min). Todas as administrações foram realizadas por via oral (gavagem).

3.7.4 Teste de tolerância oral a glicose (TTOG) em camundongos diabéticos

A indução do DM tipo 2 foi realizada segundo o método descrito por Arya et al. (2015)(ARYA *et al.*, 2015), com modificações. Um grupo de 6 animais saudáveis foram separados como grupo de controle (NTG, grupo 1). Nos demais camundongos, a indução ocorreu por uma única injeção intraperitoneal de nicotinamida solubilizada em solução salina ($50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc}$). Após 20 min, a estreptozotocina (STZ) foi administrada em uma única dose de $150 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc}$ (1 M tampão citrato, pH 4.5). Após 96h, os camundongos com glicemia maior que 200 mg/dl foram considerados diabéticos. Os animais diabéticos foram randomizados em 5 grupos de 6 animais: grupo de controle diabético não tratado (DNTG, grupo 2), grupo padrão tratado com metformina na dose de $200 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc}$ (metformina200, grupo 3) e dois grupos de tratamento com MPP nas doses de $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc}$ (MPP100, grupo 4) e $200 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc}$ (MPP200, grupo 5). O experimento foi iniciado com a medição do nível de glicose de todos os animais em jejum de 12h. Em seguida, o tratamento foi realizado de acordo com cada grupo. Após 20 min, todos os grupos receberam uma sobrecarga de glicose ($2\,000 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc}$). Os níveis de glicose no sangue foram mensurados em 30 min, 60 min, 90 min e 120 min. O padrão metformina, MPP e glicose foram solubilizados em água destilada nas doses estabelecidas e administrados por gavagem.

3.8 Analises estatística

O cálculo de pureza de MPP e IC_{50} por modelo de regressão linear foram realizados empregando o programa Excel® 2013. Os resultados dos experimentos *in*

vitro e *in vivo* foram analisados no programa GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA) empregando ANOVA (one-way and two-way). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 Conclusão

A chalcona sintetizada, 4-metoxichalcona (MPP), apresentou atividade antiglicante por duas vias utilizando modelos de albumina sérica bovina (BSA). Além disso, apresentou interação com BSA por dois sítios, sendo que há maior acomodação da molécula no Sítio I através da interação de ligação de H, seguida de interação π - π o que facilitaria sua distribuição e evitaria a glicação da albumina. MPP não apresentou citotoxicidade na linhagem fibroblasto de pulmão humano (MRC-5) após 72h e a hemólise em eritrócito de camundongos foi insignificante estes resultados junto com teste de toxicidade aguda mostram que a MPP é uma molécula segura de baixa toxicidade. Em adição, essa chalcona possui atividade hipoglicemiante, e esse efeito pode estar relacionado à captação celular de glicose que poderia ser causado pela inibição da DPP-IV e da PTP1B. Portanto, este estudo comprova que MPP possui potencial para ser um agente antidiabético para reduzir os níveis de glicose próximos a do normal. Por isso, estudos pré-clínicos estão em andamento a fim de investigar os mecanismos envolvidos nesse efeito.

Declaração de Interesse Concorrente

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Financiadora de Estudos de Projetos e Programas – FINEP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM (PROGRAMA POSGRAD), Central Analítica da UFAM pelo apoio financeiro, bolsas e infraestrutura.

Referencias

ADELUSI, T. I.; DU, L.; CHOWDHURY, A.; XIAOKE, G. *et al.* Signaling pathways and proteins targeted by antidiabetic chalcones. **Life Sci**, 284, p. 118982, Nov 01 2021.

AFSAR, N.; JONATHAN, D. R.; REVATHI, B. K.; SATHEESH, D. *et al.* (**J Mol Struct**, 1244, p. 130967, Nov 15 2021).

AHMAD, S.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N. H.; SHAARI, K. *et al.* Cardamonin, inhibits pro-inflammatory mediators in activated RAW 264.7 cells and whole blood. **Eur J Pharmacol**, 538, n. 1-3, p. 188-194, May 24 2006.

AL-MEHIZIA, A. A.; BAKHEIT, A. H.; ZARGAR, S.; BHAT, M. A. *et al.* Evaluation of Biophysical Interaction between Newly Synthesized Pyrazoline Pyridazine Derivative and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic and Molecular Docking Studies. **Journal of Spectroscopy**, 2019, p. 3848670, 2019/06/16 2019.

ANDERSEN, H. S.; IVERSEN, L. F.; JEPPESEN, C. B.; BRANNER, S. *et al.* 2-(oxalylamino)-benzoic acid is a general, competitive inhibitor of protein-tyrosine phosphatases. **J Biol Chem**, 275, n. 10, p. 7101-7108, Mar 10 2000.

ANDRADE, C. A.; BECERRA, J. J.; CÁRDENAS, V. R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of ethnopharmacology**, 116, n. 1, p. 27-32, Feb 2008.

ARYA, A.; AL-OBAIDI, M. M.; KARIM, R. B.; TAHA, H. *et al.* Extract of *Woodfordia fruticosa* flowers ameliorates hyperglycemia, oxidative stress and improves β -cell function in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 175, p. 229-240, Dec 04 2015.

BERK HESS ; HENK BEKKER ; HERMAN J. C. BERENDSEN ; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry** 18, n. 12, p. 1463-1472, September 1997 1997.

BRITO, D. H. A. D.; ALMEIDA-NETO, F. W. Q.; RIBEIRO, L. R.; MAGALHÃES, E. P. *et al.* Synthesis, structural and spectroscopic analysis, and antiproliferative activity of chalcone derivate (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(benzo[b]thiophen-2-yl)prop - 2-en-1-one in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Molecular Structure**, 1253, n. 5, p. 132197, April 2022 2022.

BUJACZ, A.; ZIELINSKI, K.; SEKULA, B. Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen. **Proteins**, 82, n. 9, p. 2199-2208, Sep 2014.

BUKHARI, S. N.; ZHANG, X.; JANTAN, I.; ZHU, H. L. *et al.* Synthesis, Molecular Modeling, and Biological Evaluation of Novel 1, 3-Diphenyl-2-propen-1-one Based Pyrazolines as Anti-inflammatory Agents. **Chem Biol Drug Des**, 85, n. 6, p. 729-742, Jun 2015.

BURMAOGLU, S.; KAZANCIOGLU, E. A.; KAYA, R.; KAZANCIOGLU, M. *et al.* Synthesis of novel organohalogen chalcone derivatives and screening of their molecular docking study and some enzymes inhibition effects. **Journal of Molecular Structure**, 1208, n. 127868, 15 May 2020 2020.

CAIRNS, J. A. The coxibs and traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a current perspective on cardiovascular risks. **Can J Cardiol**, 23, n. 2, p. 125-131, Feb 2007.

CAMPBELL, G. M.; TIWARI, S.; PICKE, A. K.; HOFBAUER, C. *et al.* Effects of insulin therapy on porosity, non-enzymatic glycation and mechanical competence in the bone of rats with type 2 diabetes mellitus. **Bone**, 91, p. 186-193, Oct 2016.

CATHBERT, T. Affordability effect of diabetic medicine on Patient's treatment adherence case study: Itojo Hospital in Ntungamo District. **Diabetes Metab Syndr**, 13, n. 3, p. 2025-2031, 2019.

DEFRONZO, R.; FLEMING, G. A.; CHEN, K.; BICSAK, T. A. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. **Metabolism**, 65, n. 2, p. 20-29, Feb 2016.

DIABETES, F. I. D. IDF Diabetes Atlas. Belgica: editora Bruxela 2021.

EGAWA, T.; TSUDA, S.; GOTO, A.; OHNO, Y. *et al.* Potential involvement of dietary advanced glycation end products in impairment of skeletal muscle growth and muscle contractile function in mice. **Br J Nutr**, 117, n. 1, p. 21-29, Jan 2017.

ELEFThERIOU, P.; GERONIKAKI, A.; PETROU, A. PTP1b Inhibition, A Promising Approach for the Treatment of Diabetes Type II. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 19, n. 4, p. 246-263, 2019.

FU, M.; SHEN, W.; GAO, W.; NAMUJIA, L. *et al.* Essential moieties of myricetins, quercetins and catechins for binding and inhibitory activity against α -Glucosidase. **Bioorg Chem**, 115, p. 105235, Oct 2021.

GARRIDO, B. C.; DE CARVALHO, L. J. Nuclear magnetic resonance using electronic referencing: method validation and evaluation of the measurement uncertainties for the quantification of benzoic acid in orange juice. **Magn Reson Chem**, 53, n. 2, p. 135-141, Feb 2015.

GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P. A.; PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A. *et al.* Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **J Mol Biol**, 353, n. 1, p. 38-52, Oct 14 2005.

HAESEN, S.; CÖL, Ü.; SCHURGERS, W.; EVENS, L. *et al.* Glycolaldehyde-modified proteins cause adverse functional and structural aortic remodeling leading to cardiac pressure overload. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 12220, Jul 22 2020.

HSIEH, C. T.; HSIEH, T. J.; EL-SHAZLY, M.; CHUANG, D. W. *et al.* Synthesis of chalcone derivatives as potential anti-diabetic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 22, n. 12, p. 3912-3915, Jun 15 2012.

IFTIKHAR, S.; KHAN, S.; BILAL, A.; MANZOOR, S. *et al.* Synthesis and evaluation of modified chalcone based p53 stabilizing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 27, n. 17, p. 4101-4106, Sep 01 2017.

ILLIEN-JÜNGER, S.; PALACIO-MANCHENO, P.; KINDSCHUH, W. F.; CHEN, X. *et al.* Dietary Advanced Glycation End Products Have Sex- and Age-Dependent Effects on Vertebral Bone Microstructure and Mechanical Function in Mice. **J Bone Miner Res**, 33, n. 3, p. 437-448, Mar 2018.

JABEEN, F.; OLIFERENKO, P. V.; OLIFERENKO, A. A.; PILLAI, G. G. *et al.* Dual inhibition of the α -glucosidase and butyrylcholinesterase studied by molecular field topology analysis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 80, p. 228-242, Jun 10 2014.

JIMENEZ C PAULA ; FORTIER C. SÉRGIO; TITO M.C. LOTUFO; PESSOA CLÁUDIA *et al.* Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 287, n. 1, p. 93-101, 2003.

JUNG, S. H.; PARK, S. Y.; KIM-PAK, Y.; LEE, H. K. *et al.* Synthesis and PPAR- γ ligand-binding activity of the new series of 2'-hydroxychalcone and thiazolidinedione derivatives. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, 54, n. 3, p. 368-371, Mar 2006.

KIHO, T.; USUI, S.; HIRANO, K.; AIZAWA, K. *et al.* Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 68, n. 1, p. 200-205, Jan 2004.

LAHTCHEV, K. L.; BATOVSKA, D. I.; PARUSHEV, S. P.; UBIYVOVK, V. M. *et al.* Antifungal activity of chalcones: a mechanistic study using various yeast strains. **Eur J Med Chem**, 43, n. 10, p. 2220-2228, Oct 2008.

LIMA, D. C.; VALE, C. R.; VÉRAS, J. H.; BERNARDES, A. *et al.* Absence of genotoxic effects of the chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(4-methylphenyl)-prop-2-en-1-one) and its potential chemoprevention against DNA damage using in vitro and in vivo assays. **PLoS One**, 12, n. 2, p. e0171224, 2017.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, 13, n. 8, p. 952-962, 1992.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MOURAD, A. A. E.; KHODIR, A. E.; SABER, S.; MOURAD, M. A. E. Novel Potent and Selective DPP-4 Inhibitors: Design, Synthesis and Molecular Docking Study of Dihydropyrimidine Phthalimide Hybrids. **Pharmaceuticals (Basel)**, 14, n. 2, Feb 11 2021.

NURSAMSAR; NUR, S.; FEBRINA, E.; ASNAWI, A. *et al.* Synthesis and Inhibitory Activity of Curculigoside A Derivatives as Potential Anti-Diabetic Agents with β -Cell Apoptosis. **Journal of Molecular Structure**, 1265, n. 5, October 2022 2022.

OGURTSOVA, K.; DA ROCHA FERNANDES, J. D.; HUANG, Y.; LINNENKAMP, U. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Res Clin Pract**, 128, p. 40-50, Jun 2017.

OLIVEIRA, E. S. C.; PONTES, F. L. D.; ACHO, L. D. R.; DO ROSÁRIO, A. S. *et al.* qNMR quantification of phenolic compounds in dry extract of Myrcia multiflora leaves and its antioxidant, anti-AGE, and enzymatic inhibition activities. **J Pharm Biomed Anal**, 201, p. 114109, Jul 15 2021.

OLIVEIRA ESC, ACHO LDR, DA SILVA BJP, MORALES-GAMBA RD, PONTES FLD, do Rosário AS, Bezerra JA, Campos FR, Barcellos JFM, Lima ES, Machado MB. Hypoglycemic effect and toxicity of the dry extract of Eugenia biflora (L.) DC. leaves. **J Ethnopharmacol**. 15;293:115276. 2022

RAMMOHAN, A.; BHASKAR, B. V.; VENKATESWARLU, N.; GU, W. *et al.* Design, synthesis, docking and biological evaluation of chalcones as promising antidiabetic agents. **Bioorg Chem**, 95, p. 103527, Jan 2020.

RAMOS, A. S.; MAR, J. M.; DA SILVA, L. S.; ACHO, L. D. R. *et al.* Pedra-ume caá fruit: An Amazon cherry rich in phenolic compounds with antiglycant and antioxidant properties. **Food Res Int**, 123, p. 674-683, Sep 2019.

SAMUELS, E. R.; WANG, T. Quantitative ^1H NMR analysis of a difficult drug substance and its exo-isomer as hydrochloride salts using alkaline deuterated methanol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 187, p. 113338, Aug 05 2020.

SARMAH, S.; ROY, A. S. A review on prevention of glycation of proteins: Potential therapeutic substances to mitigate the severity of diabetes complications. **Int J Biol Macromol**, 195, p. 565-588, Jan 15 2022.

SHORI, A. B. Screening of antidiabetic and antioxidant activities of medicinal plants. **J Integr Med**, 13, n. 5, p. 297-305, Sep 2015.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J.; D.N.; WADE. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular Pharmacology**, 11, p. 824–832, 1975.

SUN, H.; SAEEDI, P.; KARURANGA, S.; PINKEPANK, M. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes Res Clin Pract**, 183, p. 109119, Jan 2022.

TAJAMMAL, A.; BATOOL, M.; RAMZAN, A.; SAMRA, M. M. *et al.* Synthesis, antihyperglycemic activity and computational studies of antioxidant chalcones and flavanones derived from 2,5 dihydroxyacetophenone. **Journal of Molecular Structure**, 1148, n. 15, p. 512-520, 15 November 2017 2017.

TEIXEIRA, A. M. R.; SANTOS, H. S.; BANDEIRA, P. N.; JULIÃO, M. S. S. *et al.* Structural, spectroscopic and microbiological characterization of the chalcone 2E-1-(2'-hydroxy-3',4',6'-trimethoxyphenyl)-3-(phenyl)-prop-2-en-1-one derived from the natural product 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone. **Journal of Molecular Structure**, 1179, n. 5, p. 739-748, March 2019 2019.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 419, n. 1, p. 31-40, Nov 2003.

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**, 31, n. 2, p. 455-461, Jan 30 2010.

VISTOLI, G.; DE MADDIS, D.; CIPAK, A.; ZARKOVIC, N. *et al.* Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, 47 Suppl 1, p. 3-27, Aug 2013.

YING, L.; SHEN, Y.; ZHANG, Y.; WANG, Y. *et al.* Association of advanced glycation end products with diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, 177, p. 108880, Jul 2021.

ZULKAWI, N.; NG, K. H.; ZAMBERI, N. R.; YEAP, S. K. *et al.* Antihyperglycemic and anti-inflammatory effects of fermented food paste in high-fat diet and streptozotocin-challenged mice. **Drug Design, Development and Therapy**, 12, p. 1373-1383, 2018.

ARTIGO 2

Efeito anti-diabético de um sistema polimerico nanodisperso contendo 4-metoxichalcona

Leonard Domingo Rosales Acho^a, Mracia de Jesus amazonas da silva^a, Serafim Florentino Neto^a

Jesús Rafael Rodriguez Amado^a, Emersom Silva Lima^{a*}.

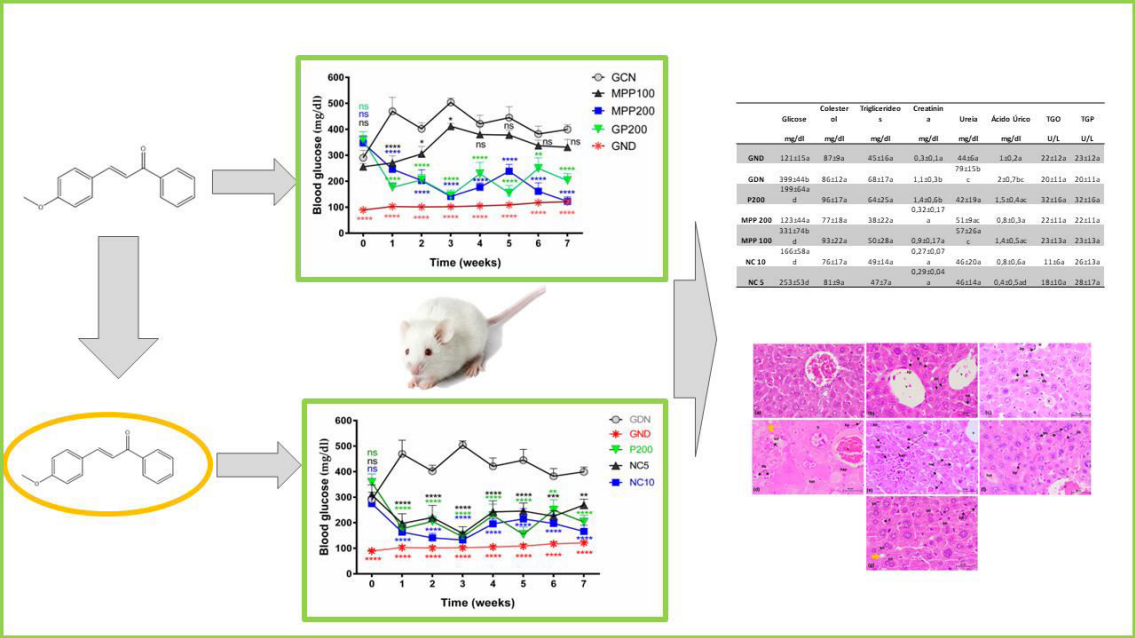
^aFaculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

*Corresponding author: eslima@ufam.edu.br

HIGHLIGHTS

- Foi mostrado o efeito hipoglicemiante da 4-methoxyhalcone (MPP) em camundongos diabeticos
- A MPP não mostrou toxicidade *in vivo*.
- A MPP ireduz a HbA1c.
- O nanoencapsulado de MPP potencializou em 20vezes sua atividade antidiabetica quando comparado a substancia não encapsulada

Graphical abstract



RESUMO

A 4-metoxichalcona (MPP) é uma molécula que mostrou ter atividade antidiabética *in vitro*, mas devido à sua baixa solubilidade em água, seu uso oral é limitado. Neste estudo, desenvolvemos uma nanoformulação estável com liberação retardada para viabilizar a administração oral da MPP no tratamento do diabetes, sem causar toxicidade. A MPP foi sintetizada utilizando a reação de Claisen-Schmidt e, em seguida, nanoencapsulada dissolvendo-a em etanol para inclusão no núcleo lipofílico do palmitato de isopropila. O surfactante usado nessa fase orgânica foi o SPAN 20, juntamente com o polímero gastroprotetor Kollicoat® MAE 100P. A fase orgânica foi preparada sob agitação constante e, posteriormente, gotejada sobre a fase aquosa em agitação. Como último passo, o tamanho do nanoencapsulado (NC) foi homogeneizado utilizando o dispositivo Ultraturrax. Nos testes de estabilidade, o NC contendo MPP manteve uma distribuição monomodal, tanto no tamanho ($187 \pm 3,85$ nm) quanto no potencial zeta ($-19,9 \pm 0,72$ mV), com baixo índice de polidispersão ($0,21 \pm 0,007$) e condutividade ($0,041 \pm 0,004$ mS), indicando alta estabilidade. Quando exposto a variações de temperatura e pH, a estabilidade foi mantida entre 10°C e 80°C , e pH de 1 a 5, demonstrando assim boa resistência térmica e gástrica. No teste *in vivo*, o efeito antidiabético da MPP e do NC contendo MPP foi comparado em camundongos diabéticos. Após 7 semanas de tratamento, a glicemia (mg/dL) dos animais tratados com NC contendo MPP (NC10 = 166 ± 58) na dose de 10 mg kg^{-1} pc, metformina (MET200 = 199 ± 64) e MPP (MPP200 = 123 ± 44) na dose de 200 mg kg^{-1} pc.. foram estatisticamente iguais ao grupo não diabético (GN = 121 ± 15) o que mostra que o NC potencializou 20 vezes o efeito antidiabético do MPP. A redução na formação de HbA1c (%) a níveis normais (GN), mostra a inibição da glicação nos mesmos grupos (MET200, MPP200 e NC10) mantendo o diabetes controlando sem causar dano hepático, confirmada pelas baixas concentrações de malonaldeído ($\mu\text{mol/g}$) e pela histologia hepática. Este resultado é de grande importância porque a MPP é uma molécula de baixo custo e de fácil obtenção que não conseguiu chamar a atenção dos pesquisadores que procuram novas opções terapêuticas para o tratamento do diabetes.

Keywords: Diabetes, 4-metoxichalcona, nanocapsula, insolubilidade.

1. Introdução

O diabetes mellitus (DM) é considerado uma síndrome metabólica cuja característica principal é a hiperglicemia crônica, geralmente causada por alterações nos receptores de insulina ou pela redução drástica na produção deste hormônio (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006; JOHN W BAYNES, 2010). Essa alteração causa diversas complicações como nefropatia (FAN *et al.*, 2022; TENG *et al.*, 2014), hepatopatia (HAMED *et al.*, 2018; HAMED *et al.*, 2019), neurotoxicidade (MEZA LETELIER *et al.*, 2017), imunodeficiência (DE LOURDES OCHOA-GONZÁLEZ *et al.*, 2021), insuficiência cardíaca (GIACCO; BROWNLEE, 2010; LEHRKE; MARX, 2017; SHAH; BROWNLEE, 2016), hipertensão arterial que afeta a dois terços dos diabéticos (PAVLOU *et al.*, 2018; SMULYAN; LIEBER; SAFAR, 2016) e neuropatia diabética periférica que afeta a metade da população diabética (FELDMAN *et al.*, 2019). Por esse motivo, o diabetes e suas complicações causam sérios problemas socioeconômicos para as famílias que tem que lidar com esta doença no dia a dia e para os governos que em 2021 gastaram aproximadamente US\$ 966 bilhões, o equivalente a 11,5% de todos os gastos destinados à saúde (DIABETES, 2021).

Diante desse problema, surge a necessidade da procura de novas alternativas terapêuticas mais econômicas e com menores efeitos colaterais do que as já encontradas no mercado. Nesse contexto, destacam-se as chalconas, flavonoides com uma ampla gama de propriedades biológicas (FAN *et al.*, 2022; FANG; DENG *et al.*, 2015; HSIEH *et al.*, 2012). Dentro desse grupo, a 4-metoxichalcona (MPP) demonstrou diversas atividades *in vitro*, como propriedades anti-inflamatórias (SHIH *et al.*, 2018), estímulo à captação de glicose (HSIEH *et al.*, 2012), atividades antineoplásica (NETO *et al.*, 2022) e antitumoral (CABRERA *et al.*, 2007) sobre a linhagem celular glioblastoma humano (AHOL1 e U87)(NETO *et al.*, 2022),

carcinoma humano de rins (TH-10), adenocarcinoma mamário (MCF-7) e adenocarcinoma de cólon (HT-29)(CABRERA *et al.*, 2007).

Entretanto, a principal desvantagem da MPP é sua insolubilidade em água, tornando-a pouco útil pela via oral e limita sua absorção. Além disso, são necessárias quantidades relativamente elevadas de MPP para atingir o efeito farmacológico desejado, o que poderia afetar negativamente sua biodisponibilidade devido à baixa hidrosolubilidade, tornando essa molécula pouco atrativa para os pesquisadores que procuram novos tratamentos para o diabetes e suas complicações. Portanto, este trabalho visa o desenvolvimento de nanocápsulas contendo MPP tecnicamente estável que permita sua hidrosolubilidade, melhora à permeabilidade, e proteger MPP contra fatores de degradação, como o pH ácido do estômago. Por fim, permite controlar a liberação do fármaco e a redução da dosagem usando pequenas quantidades de MPP, devido à potenciação da ação sem causar toxicidade.

Por este motivo o presente estudo teve como objetivo desenvolver um sistema nanodisperso polimerico contendo MPP e avaliar seu efeito sobre a glicemia de camundongos diabéticos e também a sua toxicidade com o objetivo de testar a eficácia de uma formulação nanocomposta em comparação com a MPP de forma isolada.

2. Material e métodos

2.1 Produtos químicos.

Todos os insumos usados no desenvolvimento das nanocápsulas e para os testes *in vivo* foram da SIGMA como: Kollicoat® Mae 100 P, monolauril sorbitano 20 (Span 20), monooleato de sorbitano 80 (Tween 80), Palmitato de isopropila (PMP),

estreptozotocina (STZ), nicotinamida da SIGMA. Os Kits usados para o análises bioquímicos foram da Wiener Lab. O MPP com 96.32 % de pureza.

2.2 Síntese da MPP

Para a sínteses da 4-metoxichalcona foi usado o método de condensação de Claisen-Schmith (IFTIKHAR *et al.*, 2017), usando *p*-metoxi-benzaldeído (CELSONO PINTO DE MELO; PIMENTA, 2004) e acetofenona (DIMER *et al.*, 2023) como reagentes (0.12 e 0.1 eq., respectivamente). O aldeído aromático foi convertido na correspondente chalcona (MPP) por tratamento com 0.05 eq. de NaOH em etanol e água, mantendo a temperatura abaixo de 10° C. O composto foi purificado por recristalização e identificado por análise de espectros de massas e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono.

2.3 Preparação do Nanoencapsulado.

O nanoencapsulamento do MPP foi realizado seguindo o método de deslocamento de solvente descrito por Fessi, 1989 (FESSI *et al.*, 1989) Sobre agitação constante de 400 rpm por 30 min a temperatura ambiente duas fases foram preparadas (Tabela 01). A Fase orgânica contendo palmitato de isopropila, MPP, Span 20, Kollicoat® MAE 100P, etanol 96%, e acetona; A fase aquosa composta por água ultrapura e Tween 80. A montagem da nanocápsula contendo MPP compreende na junção da fase orgânica por gotejamento sobre a fase aquosa que continuará sobre agitação. Após completado todo o processo a agitação foi mantida por 20 min e logo para homogeneizar o tamanho de partícula no Ultra-turrax® (IKA, Suíça) a 10 krpm por 10 min. No final o álcool e a acetona foram eliminados por rota evaporação a vácuo (IKA, Suíça) a 50°C.

Tabela 0 1: A composição das nanocápsulas de MPP, compreende as seguintes substâncias e quantidades:

Fase orgânica	Mínimo	Máximo	Preferivelmente
---------------	--------	--------	-----------------

Palmitato de isopropila (mg)	300	800	500
MPP (mg)	25	100	50
Span 20 (mg)	300	1000	500
Kollicoat® MAE 100P (mg)	100	1000	350
Etanol 96% (ml)	5	20	5
Acetona (ml)	5	50	15
Fase aquosa			
Tween® 80 (mg)	100	800	500
Água Ultrapura (mL)	25	100	50

2.4 Tamanho e morfologia da gota

Os medidas do tamanho de partícula e o índice de polidispersidade foram medidos por PCS (espectroscopia de correlação de fótons) utilizando um Zetasizer Nano (Malvern, Reino Unido), com comprimento de onda de 633 nm, ângulo de dispersão de 173° e temperatura de 25°C (RODRIGUEZ *et al.*, 2017). Antes das medições, a solução de nanocápsulas foi filtrada através de uma membrana Millipore® (0,45 µm). Cada medida foi repetida três vezes, e a média $\pm$ desvio padrão foi registrada.

2.5 Potencial Zeta e condutividade

O potencial zeta e a condutividade foram determinados utilizando um analisador de tamanho de partículas (Zetasizer, Malvern, Reino Unido), com o uso de uma célula zeta de policarbonato descartável. A mobilidade eletroforética foram automaticamente convertidas em potencial zeta pelo meio da aproximação de Smoluchowsky. As medições foram realizadas a 25 °C, aplicando uma tensão de 150 V (RODRIGUEZ *et al.*, 2017). Cada amostra foi medida em triplicata, e a média $\pm$ desvio padrão foi registrada.

2.6 Efeito do pH

Para avaliar o efeito do pH no tamanho da partícula ANC e no potencial ζ , utilizamos um titulador MPT-2 (Malvern, Reino Unido) acoplado a um analisador de

tamanho de partícula (Zetasizer). Hidróxido de sódio (0,1 mol/L) e ácido clorídrico (0,1 mol/L) foram usados como titulantes. O instrumento foi previamente calibrado com soluções tampão (pH 4, pH 7, pH 10; Alphatec, Brasil). As medições foram realizadas em triplicado a 25°C.

2.7 Efeito térmico

Para avaliar o efeito da temperatura no tamanho de partícula e no índice de polidispersidade das nanocápsulas, a suspensão de nanocápsulas foi aquecida de 20° a 70°C, em intervalos de 5°C. A amostra foi mantida por 5 min em cada temperatura antes da medição. O tamanho de partícula e o índice de polidispersidade foram medidos em triplicata e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

2.8 Animais

O protocolo experimental foi baseado segundo as diretrizes da Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) e aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da universidade federal da Amazonia (UFAM) com o protocolo 004/2019. Para este estudo foram usados camundongos Swiss albinos, machos, 6 semanas de idade, pesando 18 - 20 gramas, obtidos do Biotério Central da UFAM; Manaus. Eles serão mantidos sobre condições padrão de laboratório (Ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 21 ± 2 °C e umidade relativa de 35 % a 60 %). Eles serão alimentados com rações e água já padronizados pela instituição.

2.9 Indução do diabetes:

A indução do diabetes foi realizada segundo o método descrito por Arya et al. (2015) com leves alterações. Os animais receberam Nicotinamida (50 mg kg⁻¹ de peso corporal; diluída em solução salina) e após 20 min, estreptozotocina (150 mg

kg⁻¹ de peso corporal; diluído em tampão citrato 0.1 M – pH 4.5) por via intraperitoneal. Após 96 horas os animais com glicemia maior a 200 mg/dl foram considerados diabéticos.

2.10 Teste de Atividade Hipoglicemiante Crônico DM2.

Os camundongos diabéticos foram divididos aleatoriamente em 7 grupos de 6 animais por grupo. Os grupos foram divididos da seguinte maneira: grupo controle normoglicêmico não tratado (Normoglicêmico); grupo controle positivo – hiperglicêmico sem tratamento (Controle); grupo padrão tratado com Metformina 200 mg kg⁻¹ pc (Metformina); e grupos testes tratados com MPP e nanoencapsulado contendo MPP. Foi administrado por via oral no Grupo Controle (GD) o veículo 200µL de soro fisiológico- Kolliphor 3%. o grupo Padrão recebeu 200 mg kg⁻¹ pc de Metformina (MET 200) e os grupos testes receberam o MPP em doses 200 e 100 mg kg⁻¹ pc (MPP 200 e MPP 100) e nanoencapsulado com MPP de 5 e 10 mg kg⁻¹ pc (NC5 e NC10).

A cada 7 dias foram realizadas dosagens para medição da glicemia e a pesagem dos grupos. A glicose no sangue foi medida usando um glicosímetro Precision Xtra (Abbott Diabetes Care, Portugal), colocando uma pequena gota de sangue em uma nova tira de teste e registrado as medições. O Tratamento foi iniciado a partir da confirmação do diabetes (ARYA *et al.*, 2015).

2.11 Coleta de sangue e fígado do teste crônico.

Ao final do tratamento os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação de Cetamina e Xilazina (100:10 mg kg⁻¹ de pc), e o sangue foi coletado por punção cardíaca para a dosagem dos parâmetros bioquímicos. Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocação cervical. Após a eutanásia o fígado foi coletado e imerso em uma solução de formol 10% tamponado

pH 7 para a análise histológica. Para o doseamento de malonaldeído, 1 grama de fígado foi separada e congelada a -70 °C em 10 mL de tampão fosfato pH 7.

2.12 Análises Bioquímicas

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca no final do tratamento, antes da eutanásia para determinação do perfil glicêmico (Glicose e HbA1c), perfil lipídico (Colesterol e triglicerídeos), perfil hepático (ALT e AST) e perfil renal (Ácido úrico, creatinina e ureia). As dosagens foram determinadas utilizando um analisador automático Chem Well Model 2910; AWARENESS TECHNOLOGY, INC e Kits Comerciais disponíveis enzimáticos e ELISA.

2.13 Dosagem de malonaldeído (MDA)

O nível de MDA presente no fígado foi mesurado através da reação de ácido tiobarbitúrico (TBARS), para estimar a intensidade da peroxidação lipídica, através da formação de um cromógeno de cor rosa cuja absorção foi lida no espectrofotômetro. Para isso, uma grama do fígado foi homogeneizado em 10 ml de NaCl 150 μ M. EM seguida, 100 μ l deste homogenato foi misturado com 1.5ml do complexo reacional contendo ácido tiobarbitúrico 0,1%, ácido clorídrico 0,25N e ácido tricloroacético 10%, agitados por 30 segundos no vortex. As amostras foram então cobertas com bolas de gude e incubadas em banho-maria a 100°C por 45 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugados a 3500 rpm por 5 min, e o sobrenadante foi analisado no comprimento de onda de 535 nm no espectrofotômetro T70 UV/VIS PG Instruments Ltda. Os resultados foram expressos em μ mol/L de MDA usando a curva com as concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 e 8,0 μ mol do padrão 1,1,3,-tetrahidroxipropano (HIROSHI *et al.*, 1979).

2.14 Analise Histológica

Amostras de tecido hepático de cada camundongo foram submetidas a um processo de desidratação sequencial em álcool etílico nas concentrações de 70%, 80%, 96* e 100%, seguido por imersão em xilol / álcool (1:1) e, por fim, em xilol 100%, permanecendo 30 min em cada solução. Em seguida, as amostras foram montadas em blocos de parafina a 60 °C e mantidas sob refrigeração. Posteriormente, foram realizados cortes de 3-5 µm usando um micrótomo (RM 2125rt, Leica Microsystems-Wetlar, Alemanha). Esses cortes foram montados em lâminas de microscopia e submetidos à coloração com hematoxilina e eosina (H & E), sendo fixados com bálsamo do Canadá e cobertos com lamínula para posterior análise. A análise e documentação fotográfica foram realizadas com um microscópio óptico (DM500, Leica Microsystems-Wetlar, Alemanha) e câmera integrada (ICC50W, Leica Microsystems-Wetlar, Alemanha).

2.14 Analises estatísticas

As diferenças entre os grupos analisados foram avaliadas usando o software GraphPad Prism. Para os resultados univariados, foi aplicada a análise de variância One-Way ANOVA, enquanto para os resultados bivariados, foi empregada a análise de variância Two-Way ANOVA usando o teste de dunnett. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi aceita em $p < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

3.1 Tamanho de partícula

A formulação da nanocápsula apresentou uma distribuição de tamanho de partícula de 187 nm (Figura 01), caracterizada por uma distribuição monomodal, altamente homogênea e com baixo índice de polidispersão (0,210). Esses resultados são atribuídos à utilização de uma combinação de dois tensoativos não iônicos, que

conferem estabilidade às partículas ao longo do tempo, prevenindo a formação de agregados durante o processo de armazenamento (GUTERRES *et al.*, 1995; PUISIEUX *et al.*, 1994). A Manutenção do tamanho das partículas praticamente constante por longos períodos reforça a estabilidade do sistema nanoencapsulado desenvolvido.

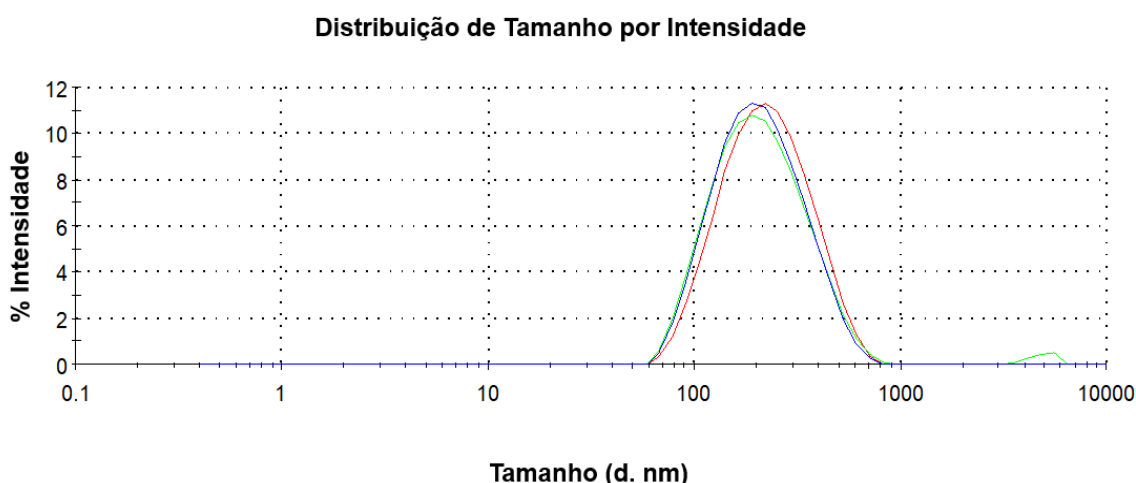


Figura 0 1: Tamanho partículas: $187,13 \pm 3,85$ nm com uma polidispersão de: $0,210 \pm 0,007$ da Nanocápsula

3.2 Potencial Zeta e condutividade

A análises do potencial zeta em triplicata revelou uma distribuição monomodal com valor médio de -19mV, o qual se manteve praticamente constante ao logo do tempo (Figura 02). Além disso, a condutividade $0,041 \text{ (m/s cm}^{-1}\text{)}$ apresentou um valor reduzido, indicando baixa mobilidade de íons livres na solução. Esses resultados são indicativos de uma alta estabilidade da formulação, uma vez que a diminuição da mobilidade iônica favorece a manutenção da integridade das partículas e evita a agregação durante o período de armazenamento.

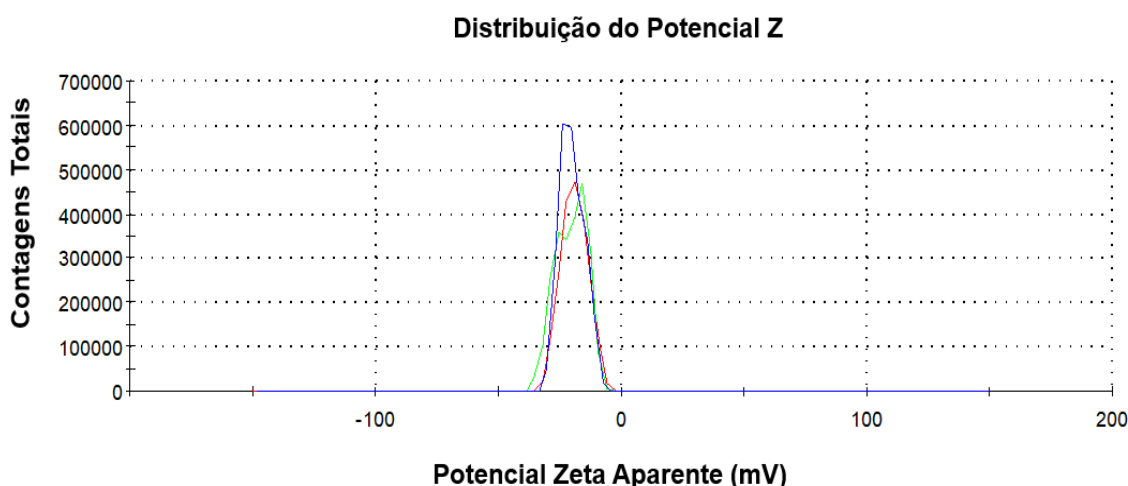


Figura 0 2: O Potencial Z $-19,90 \pm 0,72$ mV e condutividade de $0,041 \pm 0,004$ mS da nanocápsula.

3.3 Efeito do pH

O efeito do pH no tamanho de partícula das nanocápsulas e no potencial zeta foi avaliado e apresentado na Figura 03. Observamos no gráfico que, até o pH 5, as nanocápsulas mantêm-se praticamente inalterado, sofre pequenas variações em seu tamanho. Acima deste pH, ocorre um aumento gradual no tamanho das partículas, chegando à ruptura da parede polimérica ao atingir o pH 9, quando o tamanho das partículas aumenta em quase três vezes. Por outro lado, partindo do ponto isoelétrico, o potencial zeta sofreu pequenas variações, aumentando em módulo entre pH 1 e 5, e este aumento é mais acentuado a até pH 9, quando atingiu o valor de -40mV. Estes fatores favorecem a liberação do princípio ativo. O ensaio indica que as nanocápsulas não sofrem alterações estruturais em valores de pH abaixo de 5, ou seja, são gastrorresistentes, permitindo que o produto encapsulado seja liberado somente na porção intestinal. Isso favorece a absorção da molécula, evitando sua absorção inadequada pela via oral, quando em contato com o estômago.

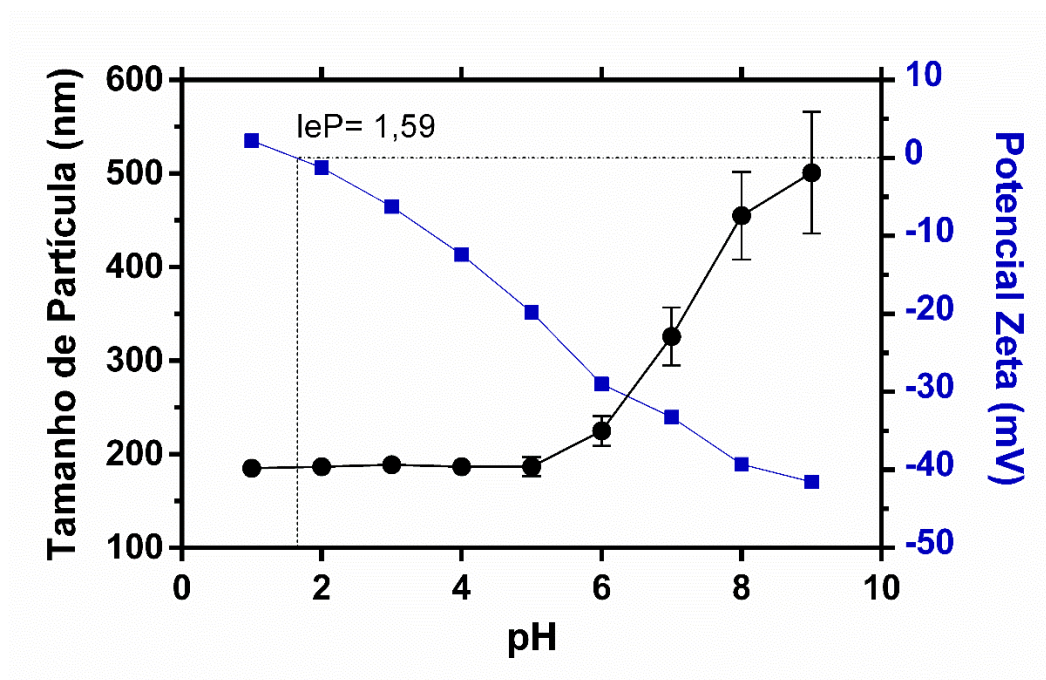


Figura 0 3: Efeito do pH sobre o potencial de Zeta da nanocápsula (IeP= ponto isoelétrico)

3.4 Efeito térmico

Considerando que os efeitos térmicos podem afetar a formulação, especialmente o princípio ativo, este parâmetro foi avaliado conforme apresentado na Figura 04, que mostra o efeito da temperatura variando de 10 a 80 °C, no tamanho das partículas das nanocápsulas e no índice de polidispersão. Observou-se que a variação no tamanho das partículas foi muito estreita, permanecendo entre 160 e 180 nm ao longo da faixa da temperatura avaliada. Da mesma forma, o índice de polidispersão manteve-se entre 0,24 a 10 °C e 0,26 a 80 °C, conferindo elevada estabilidade térmica das nanocápsulas. Esses resultados indicam que a formulação mantém sua integridade mesmo em condições de variação térmica, o que é de extrema importância para garantir a eficácia e a qualidade do produto durante o armazenamento e transporte em diferentes condições climáticas.

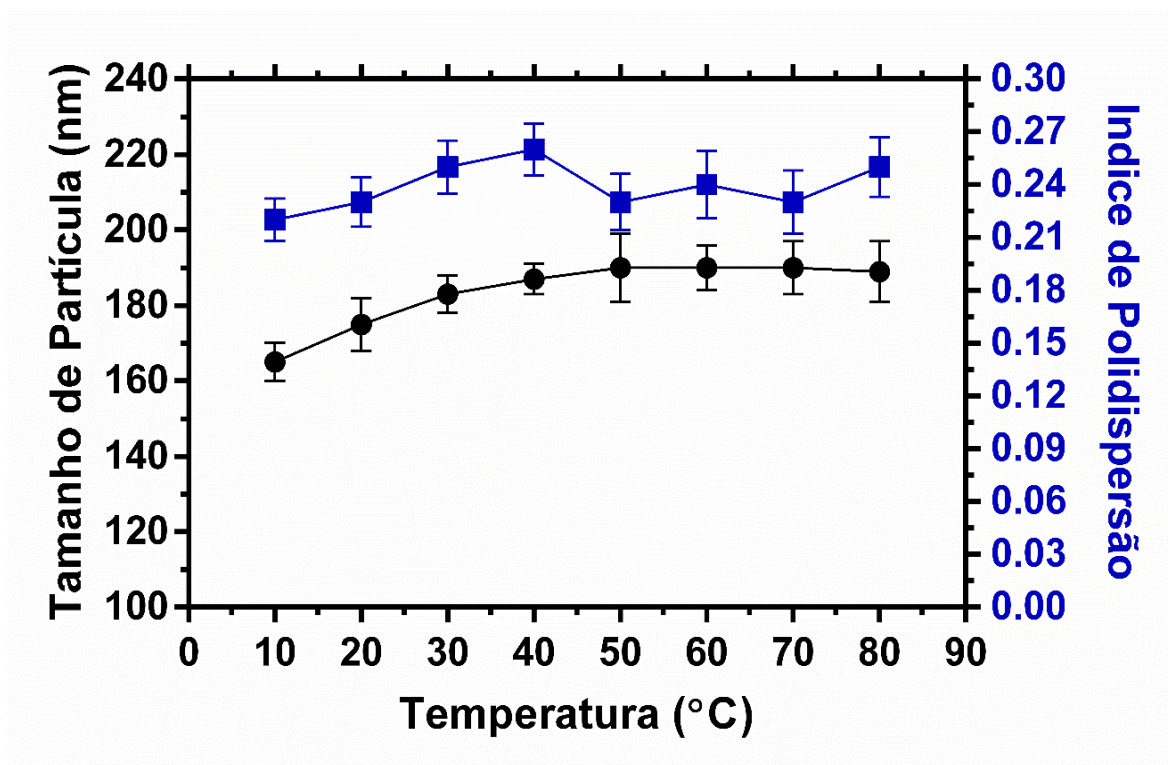


Figura 0 4: Efeito da temperatura sobre tamanho de partícula e o índice de dispersão da nanocápsula.

3.5 Teste de Atividade Hipoglicemiante

Os camundongos diabéticos tratados por 7 semanas com MPP e nanoencapsulados contendo MPP, começaram a mostrar redução da glicemia nos grupos MPP200 ($246,2 \pm 39,4$ mg/dl), NC5 ($197,3 \pm 91,9$ mg/dl), NC10 ($163,2 \pm 76,3$ mg/dl) e MET 200 ($176,33 \pm 44,68$ mg/dl), em comparação com o grupo GD ($469,5 \pm 131,8$ mg/dl), conforme ilustrado nas figuras 05 e 06. Esses valores mantiveram-se baixos até o final do experimento; No entanto, o grupo MPP100 perdeu completamente sua atividade hipoglicemiante a partir da quarta semana (Figura 05), indicando que o MPP apresenta atividade hipoglicemiante similar ao padrão (MET200) apenas na concentração de $200 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc}$, e quando são nanoencapsulados, seu efeito é potencializado em até 20 vezes ($10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ pc}$). Esses resultados demonstram a eficácia da formulação nanoencapsulada em

melhorar a atividade antidiabética do MPP, oferecendo uma opção promissora para o tratamento do diabetes mellitus.

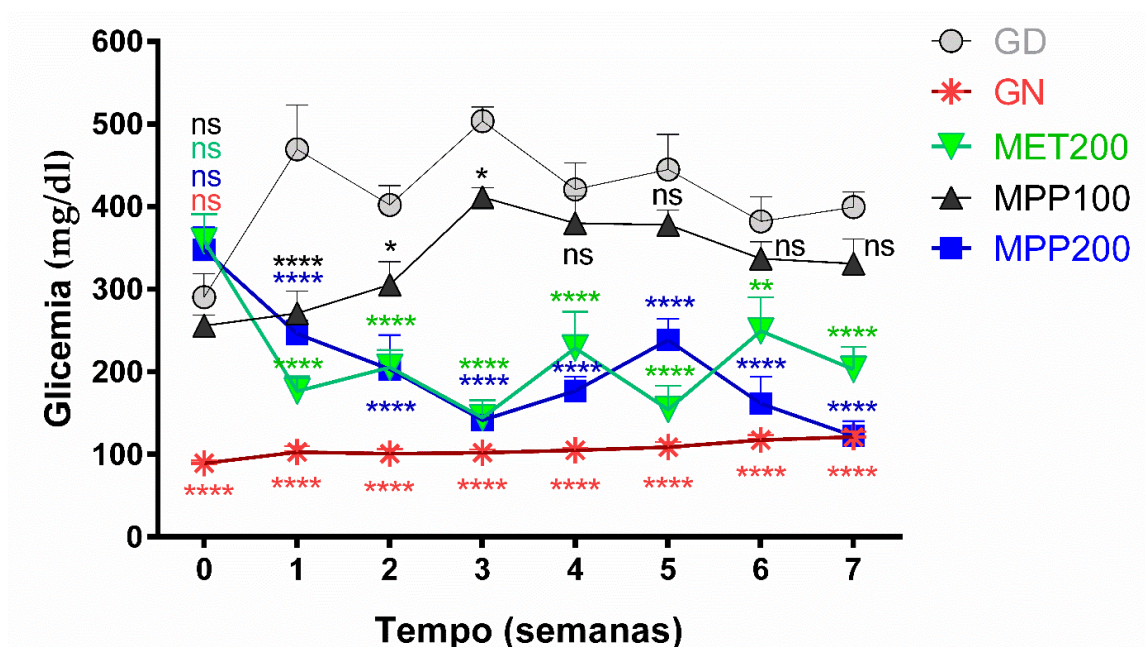


Figura 0 5: Teste crônico em camundongos diabéticos por 7 semanas. Os camundongos com glicemia superior a 200 mg/dl foram separados e em grupos: Grupo não diabético (GN), Grupo diabético não tratado (GD), metformina 200 mg kg⁻¹ (GP200) e os grupos tratados com MPP 100 e 200 mg kg⁻¹ (MPP100 e MPP200). Os grupos GN e GD foram tratados com 200µL de veículo (Soro fisiológico). Os valores foram expressos em média ± SEM para (n = 6). Two way ANOVA multie comparação com teste Dunnett de foi aplicado. Onde: $p < 0.05$ $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; $^{****}p < 0.0001$ mostram diferencia estatística quando comparado com o Grupo não tratado (GNT) e $^{ns}p > 0.05$ não apresenta diferencia estatística.

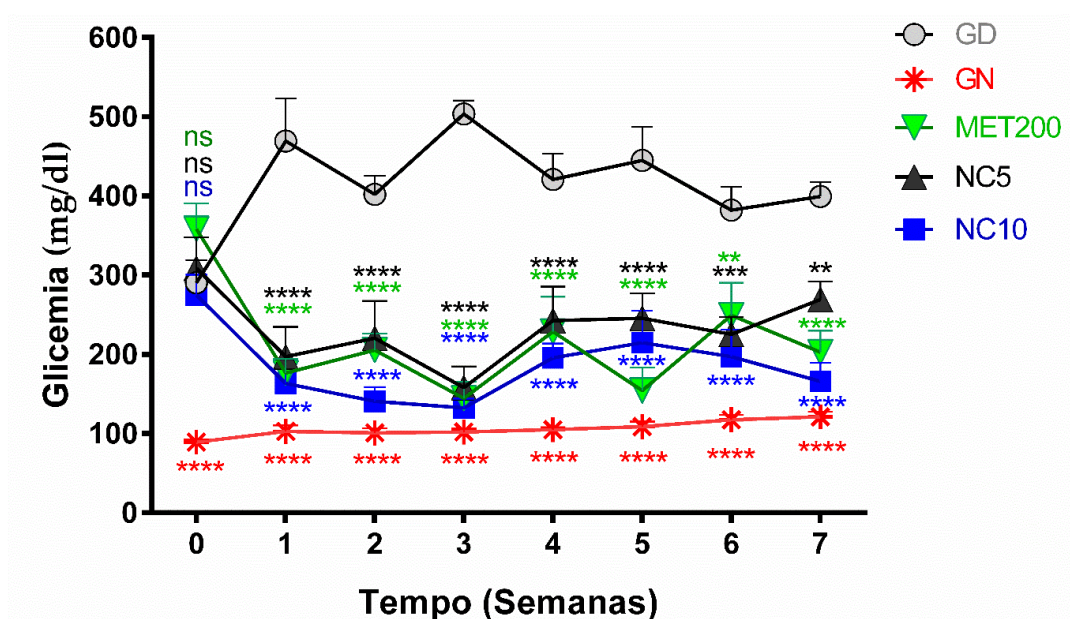


Figura 0 6: Teste crônico em camundongos diabéticos por 7 semanas. Os camundongos com glicemia superior a 200 mg/dl foram separados e em grupos: Grupo não diabético (GN), Grupo diabético não tratado (GD), metformina 200 mg kg⁻¹ (GP200) e os grupos tratados com Nanocápsula com MPP 5 e 10 mg kg⁻¹ (NC5 e NC10). Os grupos GN e GD foram tratados com 200μL de veículo (Soro fisiológico). Os valores foram expressos em média ± SEM para (n = 6). Two way ANOVA multie comparação com teste Dunnett de foi aplicado. Onde: $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ mostram diferencia estatística quando comparado com o Grupo não tratado (GNT) e ^{ns} $p > 0.05$ não apresenta diferencia estatística.

Após as 7 semanas de tratamento, foram realizadas análises bioquímicas no sangue coletado de todos os camundongos. Além disso, amostras de fígado foram retidas para análises histológicas, a fim de verificar possíveis dados nesse tecido, e outra parte do fígado foi utilizada para dosar malonaldeído, proporcionando maior robustez aos resultados. Na tabela 02, os resultados bioquímicos revelam que os níveis de colesterol e triglicerídeos não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos estudados. No entanto, em relação à glicose, foram obtidos os seguintes resultados: GN (121,3±15,3), GD (399,3±44,1), MET200 (199,3±63,5), MPP 200 (122,5±44), MPP100 (330,8±73,9), NC10 (166±57,8) e NC5 (252,8±52,7), notavelmente, os grupos MET200, MPP200, NC10 e NC5 conseguiram reduzir significativamente a glicemia dos camundongos diabéticos. Esses resultados indicam que a formulação nanoencapsulada, assim como a MPP na dose de 200 mg/kg, foi eficaz em promover a redução da glicemia em animais diabéticos

De acordo com o estudo de Chi-Ting Hsieh (2012), o MPP demonstrou estimular a captação de glicose em células 3T3-L1, possivelmente por reduzir a expressão do fator de necroses tumoral alfa (TNF-α). Esse fator está diretamente relacionado à produção de fatores pro-inflamatórios como IL-6, PAI-1 e MCP-1, e é inversamente proporcional com a expressão do PPARγ, que estimula a produção de adiponectina, melhorando a sensibilidade à insulina (GOMES, 2023; HAN *et al*, 2017). Entretanto, a MPP e seus derivados apresentam baixa solubilidade em água, o que dificulta sua absorção e reduz sua superfície de contato no trato gastrointestinal (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). Para contornar esse problema, desenvolve-se uma nanoformulação

que melhorou em 20 vezes a atividade da MPP. Utilizando o polímero de revestimento Kollicoat[®] MAE 100P. Esse polímero possui propriedades gastroprotetoras de liberação retardada, demonstrado por Neto *et al.* (2021). Dessa forma, a nanoformulação se mostra uma abordagem promissora para melhorar a eficácia da MPP no tratamento do diabetes, ao aumentar sua solubilidade e proteger o composto durante o trânsito gastrointestinal, potencializando seu efeito hipoglicemiante.

Os grupos MPP200 ($4,5 \pm 0,4\%$) e NC10 ($4,6 \pm 0,4\%$) apresentaram níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) semelhantes aos do grupo controle normoglicêmico (GN) ($4,3 \pm 0,2\%$) e significativamente inferiores ao grupo diabético (GD) ($7,4 \pm 0,3\%$), como ilustrado na figura 07. Esses tratamentos demonstraram ser mais eficazes na prevenção da glicação da hemoglobina em comparação com a metformina 200 mg kg⁻¹ pc ($6,1 \pm 1\%$), corroborando nossos resultados anteriores que indicaram que a MPP possui propriedades antiglicantes *in vitro*, tanto pela via oxidativa quanto não oxidativa. Essa ação benéfica evita os danos causados pela glicotoxicidade, comuns em indivíduos diabéticos. Curiosamente, a Diidrochalcona extraída da *Eysenhardtia polystachya* também mostrou a capacidade de manter baixos níveis de HbA1c ($4,3 \pm 0,8\%$) em camundongos diabéticos tratados por 5 semanas na dose de 100 mg kg⁻¹ pc, atenuando os danos renais causados pelos produtos finais de glicação avançada, isso reforça a importância das chalconas sintéticas ou naturais como possíveis alternativas terapêuticas para o tratamento do diabetes e suas complicações. (AGEs) (PÉREZ *et al.*, 2019).

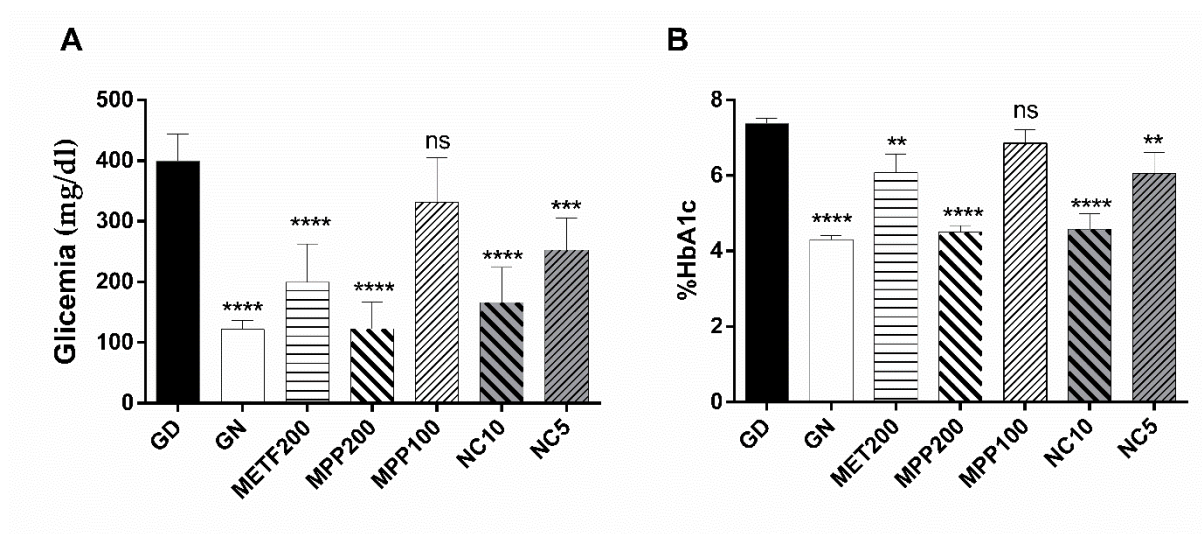


Figura 0 7: Mensuração da glicemia (A) e hemoglobina glicada (B) em camundongos diabéticos após 7 semanas de tratamento com MPP e nanocápsula com MPP. Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM para ($n = 6$). One way ANOVA os grupos foram comparados com o grupo diabético não tratado (GD) com teste Dunnett de foi aplicado. Onde: $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ mostram diferencia estatística quando comparado com o Grupo não tratado (GNT) e $^{ns}p > 0.05$ não apresenta diferencia estatística

Tabela 0 2: Resultados bioquímicos dos camundongos tratados por 7 semanas

	Colesterol mg/dl	Triglicerídeos mg/dl	Creatinina mg/dl	Ureia mg/dl	Ácido Úrico mg/dl	TGO U/L	TGP U/L
GN	87 $\pm$ 9a	45 $\pm$ 16a	0,3 $\pm$ 0,1a	44 $\pm$ 6a	1 $\pm$ 0,2a	22 $\pm$ 12a	23 $\pm$ 12a
GD	86 $\pm$ 12a	68 $\pm$ 17a	1,1 $\pm$ 0,3b	79 $\pm$ 15bc	2 $\pm$ 0,7bc	20 $\pm$ 11a	20 $\pm$ 11a
MET200	96 $\pm$ 17a	64 $\pm$ 25a	1,4 $\pm$ 0,6b	42 $\pm$ 19a	1,5 $\pm$ 0,4ac	32 $\pm$ 16a	32 $\pm$ 16a
MPP200	77 $\pm$ 18a	38 $\pm$ 22a	0,32 $\pm$ 0,17a	51 $\pm$ 9ac	0,8 $\pm$ 0,3a	22 $\pm$ 11a	22 $\pm$ 11a
MPP100	93 $\pm$ 22a	50 $\pm$ 28a	0,9 $\pm$ 0,17a	57 $\pm$ 26ac	1,4 $\pm$ 0,5ac	23 $\pm$ 13a	23 $\pm$ 13a
NC10	76 $\pm$ 17a	49 $\pm$ 14a	0,27 $\pm$ 0,07a	46 $\pm$ 20a	0,8 $\pm$ 0,6a	11 $\pm$ 6a	26 $\pm$ 13a
NC5	81 $\pm$ 9a	47 $\pm$ 7a	0,29 $\pm$ 0,04a	46 $\pm$ 14a	0,4 $\pm$ 0,5ad	18 $\pm$ 10a	28 $\pm$ 17a
NC5	81 $\pm$ 9a	47 $\pm$ 7a	0,29 $\pm$ 0,04a	46 $\pm$ 14a	0,4 $\pm$ 0,5ad	18 $\pm$ 10a	28 $\pm$ 17a

Os resultados bioquímicos dos grupos não diabéticos (GND), grupos diabéticos não tratados (GDN), Metformina 200 mg kg⁻¹ (P200), MPP 200mg kg⁻¹ (MPP200), MPP 100mg kg⁻¹ (MPP100), Nanoencapsulado de MPP 10mg kg⁻¹ NC10) e Nanoencapsulado de MPP 5mg kg⁻¹ (NC5) são expressos em média $\pm$ DP (N=6/Grupo) e analisados por One-way ANOVA seguido por Tukey, onde as letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$)

Os parâmetros bioquímicos renais analisados foram a creatinina, ureia, e ácido úrico, sendo que os níveis creatinina indicam danos nos grupos MET200 e GD. Quanto aos níveis de ureia e ácido úrico, observou-se dano significativo no grupo GD, além de um leve dano nos grupos MET200, MPP100 e MPP200 (Tabela 02), todos os grupos apresentaram resultados estatisticamente similares. Entretanto, ao

avaliar a concentração elevada de malonaldeído ($\mu\text{mol/g}$) mostrada na figura 08, foi possível identificar dano hepático nos grupos GD ($5,5 \pm 1,8$) e MPP100 ($3,4 \pm 0,6$), os quais apresentaram resultados estatisticamente iguais. Por outro lado, os grupos GN ($1,5 \pm 0,3$), MPP200 ($0,9 \pm 0,1$) e NC10 ($1,1 \pm 0,1$) não apresentaram dano hepático, demonstrando diferença significativa em relação ao grupo GD. Os grupos MET200 ($1,9 \pm 0,1$) e NC5 (2 ± 1) apresentaram um leve aumento no malonaldeído, sugerindo a possibilidade de uma resposta adaptativa em relação ao estresse oxidativo hepático.

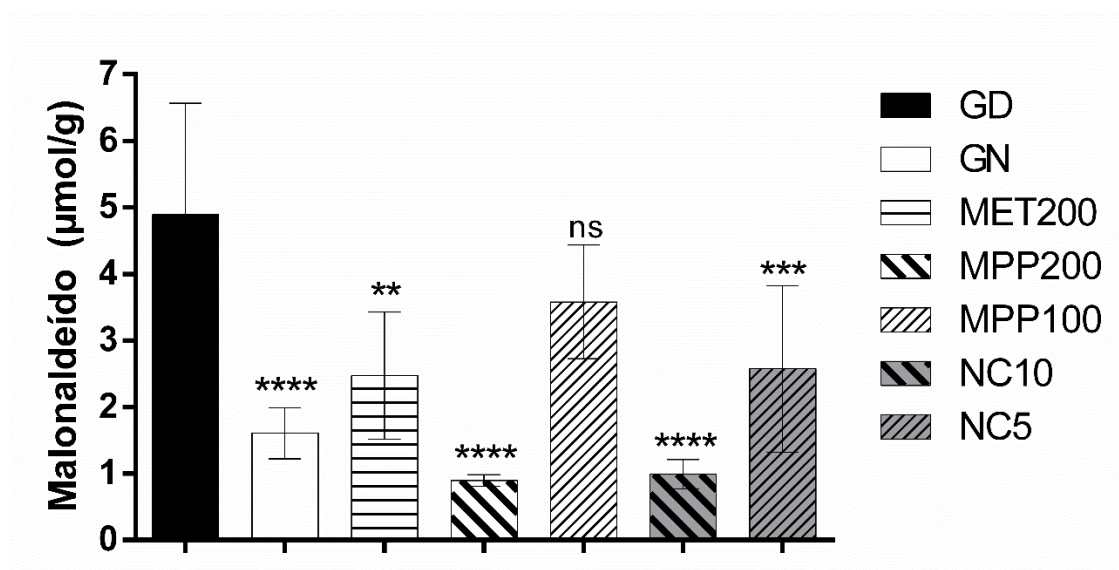


Figura 0 8: Mostra o doseamento da malonaldeído em camundongos diabéticos após 7 semanas de tratamento com MPP e nanocápsula com MPP. Os valores foram expressos em média $\pm$ DP para ($n = 6$). One way ANOVA os grupos foram comparados com o grupo diabético não tratado (GD) com teste Dunnett de foi aplicado. Onde: $p < 0.05$ ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ mostram diferencia estatística quando comparado com o Grupo não tratado (GN) e $^{ns}p > 0.05$ não apresenta diferencia estatística.

Na análise histológica do fígado, o grupo GN revelou uma arquitetura normal dos hepatócitos (h) com capilares sinusóides (s) estreitos, alguns hepatócitos binucleados e células de Kupffer (Fig. 09a). Já no grupo GD, observou-se uma redução acentuada do número de hepatócitos (h), que apresentavam hipertrofia, além de uma expressiva redução vascular. Esses hepatócitos exibiam um perfil de danos marcado por infiltrado inflamatório (inf), microvesículas com gotículas e glicogênio, e esteatose macrovesicular (zeta amarela), caracterizada por gotículas

de gordura bem definidas. Além disso, identificou-se a presença de uma célula em apoptose, bem como células de Kupffer, devido à sua baixa vascularização e capilares sinusoidais dilatados (sd) (Fig. 09d), indicando um dano hepático acentuado.

No grupo MPP100 podemos observar diversos hepatócitos em apoptoses (hap) e um infiltrado inflamatório (inf) proeminente, acompanhados de capilares sinusóides dilatados e hepatócitos com infiltrado microvesicular (hst), evidenciando um dano hepático significativo (Fig. 09e). Em contrapartida, os grupos MPP200 (Fig 09b) e NC10 (Fig 09c) exibiram uma arquitetura semelhante ao grupo GN, sugerindo uma preservação da integridade hepática. Essa observação condiz com os baixos níveis de malonaldeído produzido nesses grupos (Fig. 08). O grupo MET200 (Fig. 09g) mostrou presença de várias células de Küpper e evidências de esteatose macrovesicular (zeta amarela), indicando uma leve inflamação. Por fim o grupo NC05 (Fig 09f) mostrou apenas esteatose microvesicular (hst). Estes achados ratificam os resultados obtidos no teste de MDA.

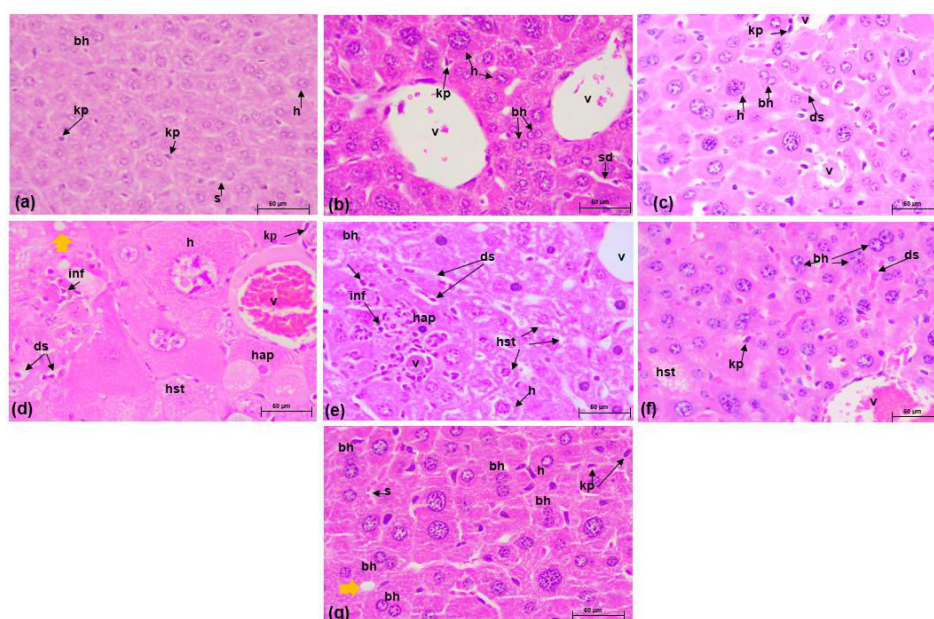


Figura 09: Efeito do tratamento em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ), histopatológica do fígado determinado via coloração H & E (aumento de 40x, 50 µm na escala de

bar). GN (a), GD (d), MPP200 (b), MPP100 (e), NC10 (c), NC5 (f) e MET 200 (g). h: hepatócito; bh: hepatócito bilateral; s: sinusóide capilar; ds: sinusóide dilatada; gc: conteúdo de glicogênio; Kp: célula de Kupffer; hap: hepatócito em apoptose; hst: hepatócito na esteatose microvesicular; inf: infiltrado inflamatório; seta amarela: esteatose macrovesicular

4 Conclusão:

Neste estudo, evidenciamos que tanto o MPP quanto a metformina exercem eficácia notável na redução da glicemia em camundongos diabéticos, quando administrados oralmente a uma dose de 200 mg kg⁻¹ pc durante 7 semanas. Isso reforça as propriedades antidiabéticas do MPP em um contexto in vivo. Contudo, vale ressaltar que sua alta lipofilicidade levou à perda da atividade antidiabética na dose de 100 mg kg⁻¹ pc.

Para superar este desafio, foi desenvolvida uma nanoformulação, com estabilidade de tamanho e potencial zeta a um pH 5 e temperaturas entre 20 °C e 70 °C. Através do revestimento das nanocápsulas com Kollicoat® MAE 100P, um polímero de liberação retardada, conseguimos ampliar o efeito antidiabético do MPP em até 20 vezes. Este notável resultado se deve à liberação seletiva do MPP no ambiente intestinal, conferindo maior precisão terapêutica.

Além disso, durante o tratamento de camundongos diabéticos por 7 semanas com MPP a 200 mg kg⁻¹ pc e com o nanoencapsulado contendo 10 mg kg⁻¹ pc de MPP, não foram observados sinais de toxicidade hepática e renal. Tais achados fornecem bases promissórias, indicando que o nanoencapsulado contendo MPP tem um grande potencial de se tornar um medicamento para o tratamento do diabetes.

Embora nossos resultados sejam promissores, é importante ressaltar a necessidade de estudos adicionais e ensaios clínicos para validar completamente o potencial terapêutico, segurança e eficácia dessa nanoformulação. No entanto, as descobertas atuais abrem caminho para uma abordagem potencialmente

transformadora no tratamento do diabetes mellitus. A nanoencapsulação do MPP apresenta-se como uma opção terapêutica inovadora e potente na luta contra o diabetes.

Referencias:

ARYA, A.; AL-OBAIDI, M. M.; KARIM, R. B.; TAHA, H. *et al.* Extract of *Woodfordia fruticosa* flowers ameliorates hyperglycemia, oxidative stress and improves β -cell function in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 175, p. 229-240, Dec 04 2015.

CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M. L. *et al.* Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorg Med Chem**, 15, n. 10, p. 3356-3367, May 15 2007.

CELSO PINTO DE MELO; PIMENTA, M. **Nanociências e nanotecnologia**. Brasília: 9-21 p. 2004.

CHAMPE., P. C.; HARVEY., R. A.; DENISE R. FERRIER. **Bioquímica Ilustrada**. 3ra edição ed. Artmed Editora SA, 2006. 0-7817-2265-9.

DE LOURDES OCHOA-GONZÁLEZ, F.; GONZÁLEZ-CURIEL, I. E.; CERVANTES-VILLAGRANA, A. R.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. C. *et al.* Innate Immunity Alterations in Type 2 Diabetes Mellitus: Understanding Infection Susceptibility. **Curr Mol Med**, 21, n. 4, p. 318-331, 2021.

DE OLIVEIRA, M. E.; CENZI, G.; NUNES, R. R.; ANDRIGHETTI, C. R. *et al.* Antimalarial activity of 4-metoxychalcones: docking studies as falcipain/plasmeprin inhibitors, ADMET and lipophilic efficiency analysis to identify a putative oral lead candidate. **Molecules**, 18, n. 12, p. 15276-15287, Dec 10 2013.

DIABETES, F. I. D. IDF Diabetes Atlas. Belgica: editora Bruxela 2021.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, 36, p. 1520-1526, 2023.

FAN, Y.; LAU, E. S. H.; WU, H.; YANG, A. *et al.* Incidence of long-term diabetes complications and mortality in youth-onset type 2 diabetes: A systematic review. **Diabetes Res Clin Pract**, 191, p. 110030, Sep 2022.

FANG, Q.; DENG, L.; WANG, L.; ZHANG, Y. *et al.* Inhibition of mitogen-activated protein kinases/nuclear factor κ B-dependent inflammation by a novel chalcone protects the kidney from high fat diet-induced injuries in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, 355, n. 2, p. 235-246, Nov 2015.

FELDMAN, E. L.; CALLAGHAN, B. C.; POP-BUSUI, R.; ZOCHODNE, D. W. *et al.* Diabetic neuropathy. **Nat Rev Dis Primers**, 5, n. 1, p. 42, Jun 13 2019.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res**, 107, n. 9, p. 1058-1070, Oct 29 2010.

GOMES, M. D. B. Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 50, p. 271-280, 2023.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; PUISIEUX, F. *et al.* Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. **Pharm Res**, 12, n. 10, p. 1545-1547, Oct 1995.

H. FESSI; F. PUISIEUX; J.PH. DEVISSAGUET; N. AMMOURY *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

HAMED, A. E.; ELSAHAR, M.; ELWAN, N. M.; EL-NAKEEP, S. *et al.* Managing diabetes and liver disease association. **Arab J Gastroenterol**, 19, n. 4, p. 166-179, Dec 2018.

HAMED, A. E.; ELWAN, N.; NAGUIB, M.; ELWAKIL, R. *et al.* Diabetes Association with Liver Diseases: An Overview for Clinicians. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, 19, n. 3, p. 274-280, 2019.

HAN, Y.; LEE, S. H.; LEE, I. S.; LEE, K. Y. Regulatory effects of 4-methoxychalcone on adipocyte differentiation through PPAR γ activation and reverse effect on TNF- α in 3T3-L1 cells. **Food Chem Toxicol**, 106, n. Pt A, p. 17-24, Aug 2017.

HIROSHI OHKAWA ; NOBUKO OHISHI ; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 95, n. 2, p. 535-538, 1979.

HSIEH, C. T.; HSIEH, T. J.; EL-SHAZLY, M.; CHUANG, D. W. *et al.* Synthesis of chalcone derivatives as potential anti-diabetic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 22, n. 12, p. 3912-3915, Jun 15 2012a.

HSIEH, C. T.; HSIEH, T. J.; EL-SHAZLY, M.; CHUANG, D. W. *et al.* Synthesis of chalcone derivatives as potential anti-diabetic agents. **Bioorg Med Chem Lett**, 22, n. 12, p. 3912-3915, Jun 15 2012b.

IFTIKHAR, S.; KHAN, S.; BILAL, A.; MANZOOR, S. *et al.* Synthesis and evaluation of modified chalcone based p53 stabilizing agents. **Bioorg Med Chem Lett**, 27, n. 17, p. 4101-4106, Sep 01 2017.

JOHN W BAYNES, M. H. D. **Bioquímica Medica**. 3ra ed. 2010. 9788535235616.

LEHRKE, M.; MARX, N. Diabetes Mellitus and Heart Failure. **Am J Med**, 130, n. 6S, p. S40-S50, Jun 2017.

MEZA LETELIER, C. E.; SAN MARTÍN OJEDA, C. A.; RUIZ PROVOSTE, J. J.; FRUGONE ZAROR, C. J. [Pathophysiology of diabetic nephropathy: a literature review]. **Medwave**, 17, n. 1, p. e6839, Jan 12 2017.

NETO, R. A. M.; SANTOS, C. B. R.; HENRIQUES, S. V. C.; MACHADO, L. O. *et al.* Novel chalcones derivatives with potential antineoplastic activity investigated by docking and molecular dynamics simulations. **J Biomol Struct Dyn**, 40, n. 5, p. 2204-2216, Mar 2022.

NETO, S. F.; PRADA, A. L.; ACHOD, L. D. R.; TORQUATO, H. F. V. *et al.* α -amylin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. **Biomed Pharmacother**, 139, p. 111656, Jul 2021.

PAVLOU, D. I.; PASCHOU, S. A.; ANAGNOSTIS, P.; SPARTALIS, M. *et al.* Hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus: Targets and management. **Maturitas**, 112, p. 71-77, Jun 2018.

PUISIEUX, F.; BARRATT, G.; COUARRAZE, G. *et al.* **Polymeric biomaterials.** Severian Dumitriu, 1994. 749-794 p. (Polymeric Micro- and Nanoparticles as Drug Carriers.

PÉREZ GUTIERREZ, R. M.; GARCÍA CAMPOY, A. H.; PAREDES CARRERA, S. P.; MUÑOZ RAMIREZ, A. *et al.* 3'-. **Molecules**, 24, n. 7, Mar 28 2019.

RODRIGUEZ AMADO, J. R.; PRADA, A. L.; DUARTE, J. L.; KEITA, H. *et al.* Development, stability and. **Saudi Pharm J**, 25, n. 8, p. 1158-1168, Dec 2017.

SHAH, M. S.; BROWNLEE, M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. **Circ Res**, 118, n. 11, p. 1808-1829, May 27 2016.

SHIH, T. L.; LIU, M. H.; LI, C. W.; KUO, C. F. Halo-Substituted Chalcones and Azachalcones-Inhibited, Lipopolysaccharite-Stimulated, Pro-Inflammatory Responses through the TLR4-Mediated Pathway. **Molecules**, 23, n. 3, Mar 07 2018.

SMULYAN, H.; LIEBER, A.; SAFAR, M. E. Hypertension, Diabetes Type II, and Their Association: Role of Arterial Stiffness. **Am J Hypertens**, 29, n. 1, p. 5-13, Jan 2016.

TENG, B.; DUONG, M.; TOSSIDOU, I.; YU, X. *et al.* Role of protein kinase C in podocytes and development of glomerular damage in diabetic nephropathy. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 5, p. 179, 2014.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- Este trabalho confirmou que a 4-metoxichalcona (MPP) possui atividades *consideradas* antidiabéticas demonstradas por meio de ensaios *in sílico*, *in vitro* e *in vivo*.
- Constatou-se que o método de reação de condensação de Claisen-Schmith.
- sintetiza MPP com pureza de 96%.
- A MPP não se mostrou capaz causar hemólise e se ser citotóxica em células de fibroblastos humanos.
- Constatou-se que a MPP não possui atividade inibitória sob a enzima α -glicosidase pelos testes *in vitro* e não interfere na tolerância a sacarose quando avaliada *in vivo*.
- Foi possível desenvolver um nanoencapsulado contendo MPP com tamanho de partícula e potencial zeta homogêneo e estável a temperatura de 10 °C - 80 °C e pH de 1 – 5.
- O tratamento por 7 semanas de camundongos diabéticos com MPP na dose de 200 mg kg⁻¹ pc (123±44 mg/dl) e o NC contendo MPP na dose de 10 mg kg⁻¹ pc (166±58 mg/dl) reduziu a glicemia níveis normais. Este resultado mostra que o que mostra que o NC potencializa aproximadamente 20 vezes o efeito antidiabético da MPP.
- A administração oral de MPP (200 mg kg⁻¹ pc) ou do NC (10 mg kg⁻¹ pc) foi capaz de normalizar os níveis de HbA1c após 7 semanas de tratamento.
- Os resultados bioquímicos e histológicos mostraram que a MPP e o NC contendo MPP nas doses acima mostradas evitam danos renais e hepáticos causados pelo diabetes.

7. REFERENCIAS ADICIONAIS

ADELUSI, T. I.; AKINBOLAJI, G. R.; YIN, X.; AYINDE, K. S. *et al.* Neurotrophic, anti-neuroinflammatory, and redox balance mechanisms of chalcones. **European Journal of Pharmacology** 891, p. 173695, Jan 15 2021.

ADELUSI, T. I.; DU, L.; CHOWDHURY, A.; XIAOKE, G. *et al.* Signaling pathways and proteins targeted by antidiabetic chalcones. **Life Science**, 284, p. 118982, Nov 01 2021.

AFSAR, N.; JONATHAN, D. R.; REVATHI, B. K.; SATHEESH, D. *et al.* (**J Mol Struct**, 1244, p. 130967, Nov 15 2021.

AHMAD, S.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N. H.; SHAARI, K. *et al.* Cardamonin, inhibits pro-inflammatory mediators in activated RAW 264.7 cells and whole blood. **European Journal of Pharmacology** 538, n. 1-3, p. 188-194, May 24 2006.

AL-MEHIZIA, A. A.; BAKHEIT, A. H.; ZARGAR, S.; BHAT, M. A. *et al.* Evaluation of Biophysical Interaction between Newly Synthesized Pyrazoline Pyridazine Derivative and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic and Molecular Docking Studies. **Journal of Spectroscopy**, 2019, p. 3848670, 2019/06/16 2019.

ANDERSEN, H. S.; IVERSEN, L. F.; JEPPESEN, C. B.; BRANNER, S. *et al.* 2-(oxalylamino)-benzoic acid is a general, competitive inhibitor of protein-tyrosine phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, 275, n. 10, p. 7101-7108, Mar 10 2000.

ANDERSSON, B.; MCCANN, S. M. The effect of hypothalamic lesions on the water intake of the dog. **Acta Physiologica Scandinavica**, 35, n. 3-4, p. 312-320, 1956.

ANDRADE, C. A.; BECERRA, J. J.; CÁRDENAS, V. R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of ethnopharmacology**., 116, n. 1, p. 27-32, Feb 2008.

APONTE, J. C.; VERÁSTEGUI, M.; MÁLAGA, E.; ZIMIC, M. *et al.* Synthesis, cytotoxicity, and anti-Trypanosoma cruzi activity of new chalcones. **Journal of Medicinal Chemistry**, 51, n. 19, p. 6230-6234, 2008.

ARYA, A.; AL-OBAIDI, M. M.; KARIM, R. B.; TAHA, H. *et al.* Extract of Woodfordia fruticosa flowers ameliorates hyperglycemia, oxidative stress and improves β -cell function in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 175, p. 229-240, 2015

ASHRAF, J. M.; SHAHAB, U.; TABREZ, S.; LEE, E. J. *et al.* Quercetin as a finer substitute to aminoguanidine in the inhibition of glycation products. **International journal of biological macromolecules**, 77, p. 188-192, 2015.

BERK HESS ; HENK BEKKER ; HERMAN J. C. BERENDSEN ; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry** 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997.

BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**, 464, n. 7293, p. 1293-1300, 2010.

BOUMENDJEL, A.; RONOT, X.; BOUTONNAT, J. Chalcones derivatives acting as cell cycle blockers: potential anti cancer drugs? **Current Drug Targets**, 10, n. 4, p. 363-371, 2009.

BOURQUE, C. W.; OLIET, S. H.; RICHARD, D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. **Front Neuroendocrinol**, 15, n. 3, p. 231-274, 1994.

BRITO, D. H. A. D.; ALMEIDA-NETO, F. W. Q.; RIBEIRO, L. R.; MAGALHÃES, E. P. *et al.* Synthesis, structural and spectroscopic analysis, and antiproliferative activity of chalcone derivate (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(benzo[b]thiophen-2-yl)prop - 2-en-1-one in Trypanosoma cruzi. **Journal of Molecular Structure**, 1253, n. 5, p. 132197, 2022.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, 414, n. 6865, p. 813-820, 2001.

BUJACZ, A.; ZIELINSKI, K.; SEKULA, B. Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen. **Proteins**, 82, n. 9, p. 2199-2208, 2014.

BUKHARI, S. N.; ZHANG, X.; JANTAN, I.; ZHU, H. L. *et al.* Synthesis, Molecular Modeling, and Biological Evaluation of Novel 1, 3-Diphenyl-2-propen-1-one Based Pyrazolines as Anti-inflammatory Agents. **Chemical Biology & Drug Design**, 85, n. 6, p. 729-742, 2015.

BURMAOGLU, S.; KAZANCIOGLU, E. A.; KAYA, R.; KAZANCIOGLU, M. *et al.* Synthesis of novel organohalogen chalcone derivatives and screening of their molecular docking study and some enzymes inhibition effects. **Journal of Molecular Structure**, 1208, n. 127868, 2020.

BURMAOGLU, S.; YILMAZ, A. O.; POLAT, M. F.; KAYA, R. *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel tris-chalcones as potent carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and α -glycosidase inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, 85, p. 191-197, 2019.

BURMAOGLU, S.; YILMAZ, A. O.; POLAT, M. F.; KAYA, R. *et al.* Synthesis of novel tris-chalcones and determination of their inhibition profiles against some metabolic enzymes. **Arch Journal of Physiology and Biochemistry** 127, n. 2, p. 153-161, 2021.

CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M. L. *et al.* Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 15, n. 10, p. 3356-3367, 2007.

CABRERA-CRUZ, H.; ORÓSTICA, L.; PLAZA-PARROCHIA, F.; TORRES-PINTO, I. *et al.* The insulin-sensitizing mechanism of myo-inositol is associated with AMPK activation and GLUT-4 expression in human endometrial cells exposed to a PCOS environment. **American Journal of Physiology: endocrinology and metabolism**, 318, n. 2, p. E237-E248, 2020.

CAIRNS, J. A. The coxibs and traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a current perspective on cardiovascular risks. **Canadian Journal of Cardiology**, 23, n. 2, p. 125-131, 2007.

CAMPBELL, G. M.; TIWARI, S.; PICKE, A. K.; HOFBAUER, C. *et al.* Effects of insulin therapy on porosity, non-enzymatic glycation and mechanical competence in the bone of rats with type 2 diabetes mellitus. **Bone**, 91, p. 186-193, 2016.

CATHBERT, T. Affordability effect of diabetic medicine on Patient's treatment adherence case study: Itojo Hospital in Ntungamo District. **Diabetology & Metabolic Syndromer**, 13, n. 3, p. 2025-2031, 2019.

CELSO PINTO DE MELO; PIMENTA, M. **Nanociências e nanotecnologia**. Brasília: 9-21 p. 2004.

CHAMPE., P. C.; HARVEY., R. A.; DENISE R. FERRIER. **Bioquímica Ilustrada**. 3ra edição ed. Artmed Editora SA, 2006. 0-7817-2265-9.

CHARRON, M. J.; GOROVITS, N.; LAIDLAW, J. S.; RANALLETTA, M. *et al.* Use of GLUT-4 null mice to study skeletal muscle glucose uptake. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 32, n. 4, p. 308-313, 2005.

CHEN, X.; YU, W.; LI, W.; ZHANG, H. *et al.* An anti-inflammatory chalcone derivative prevents heart and kidney from hyperlipidemia-induced injuries by attenuating inflammation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 338, p. 43-53, 2018.

CHISTÉ, L. A.; PEREIRA, B. P.; PORTO, M. L.; DE OLIVEIRA, J. P. *et al.* Worsening of Oxidative Stress, DNA Damage, and Atherosclerotic Lesions in Aged LDLr. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019, p. 9042526, 2019.

CHO, H. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and obesity. **Vitamins & Hormones**, 91, p. 405-424, 2013.

CLOETE, L. Diabetes mellitus: an overview of the types, symptoms, complications and management. **Nursing standard**., 37, n. 1, p. 61-66, 2022.

CONSTANTINESCU, T.; LUNGU, C. N. Anticancer Activity of Natural and Synthetic Chalcones. **International Journal of Molecular Sciences**, 22, n. 21, 2021.

CRUZ HERNÁNDEZ JEDDÚ ; LICEA PUIG MANUEL EMILIANO ; HERNÁNDEZ GARCÍA PILAR ; ABRAHAM MARCEL ENRIQUE A *et al.* Aldosa reductasa y proteína quinasa C en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**. 58: 102-107 p. 2011.

DAGOGO, J. S. 2015 Presidential Address: 75 Years of Battling Diabetes--Our Global Challenge. **Diabetes Care**, 39, n. 1, p. 3-9, 2016.

DANDAWATE, P.; AHMED, K.; PADHYE, S.; AHMAD, A. *et al.* Anticancer Active Heterocyclic Chalcones: Recent Developments. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, 21, n. 5, p. 558-566, 2021.

DANILO, M. J.; ANTÔNIO, P. E. A. J.; WILSON, D. M. C. Proteína do Grupo 1 de Mobilidade Alta (HMGB-1): Função Imune e Utilização como Marcador Diagnóstico. **Revista Estudos**, Goiânia 41: 821-830 p. 2014.

DARIEL, D. A. Hiperglicemia y estrés oxidativo en el paciente diabético. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**. 25: 1-7 p. 2006.

DE LOURDES OCHOA-GONZÁLEZ, F.; GONZÁLEZ-CURIEL, I. E.; CERVANTES-VILLAGRANA, A. R.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J. C. *et al.* Innate Immunity Alterations in Type 2 Diabetes Mellitus: Understanding Infection Susceptibility. **Current Molecular Medicine**, 21, n. 4, p. 318-331, 2021.

DE OLIVEIRA, M. E.; CENZI, G.; NUNES, R. R.; ANDRIGHETTI, C. R. *et al.* Antimalarial activity of 4-metoxychalcones: docking studies as falcipain/plasmeprin inhibitors, ADMET and lipophilic efficiency analysis to identify a putative oral lead candidate. **Molecules**, 18, n. 12, p. 15276-15287, 2013.

DEFRONZO, R.; FLEMING, G. A.; CHEN, K.; BICSAK, T. A. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. **Metabolism**, 65, n. 2, p. 20-29, 2016.

DIABETES, F. I. D. **IDF Diabetes Atlas. Belgica**: editora Bruxela 2021.

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, 36, p. 1520-1526, 2023.

DU, X. L.; EDELSTEIN, D.; ROSSETTI, L.; FANTUS, I. G. *et al.* Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) Sci U S A**, 97, n. 22, p. 12222-12226, 2000.

DUGÉ DE BERNONVILLE, T.; GUYOT, S.; PAULIN, J. P.; GAUCHER, M. *et al.* Dihydrochalcones: Implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. **Phytochemistry**, 71, n. 4, p. 443-452, 2010.

EGAWA, T.; TSUDA, S.; GOTO, A.; OHNO, Y. *et al.* Potential involvement of dietary advanced glycation end products in impairment of skeletal muscle growth and muscle contractile function in mice. **British Journal of Nutrition**, 117, n. 1, p. 21-29, 2017.

ELEFTHERIOU, P.; GERONIKAKI, A.; PETROU, A. PTP1b Inhibition, A Promising Approach for the Treatment of Diabetes Type II. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 19, n. 4, p. 246-263, 2019.

FAN, Y.; LAU, E. S. H.; WU, H.; YANG, A. *et al.* Incidence of long-term diabetes complications and mortality in youth-onset type 2 diabetes: A systematic review. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 191, p. 110030, 2022.

FANG, Q.; DENG, L.; WANG, L.; ZHANG, Y. *et al.* Inhibition of mitogen-activated protein kinases/nuclear factor κ B-dependent inflammation by a novel chalcone protects the kidney from high fat diet-induced injuries in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 355, n. 2, p. 235-246, 2015.

FELDHAMMER, M.; UETANI, N.; MIRANDA-SAAVEDRA, D.; TREMBLAY, M. L. PTP1B: a simple enzyme for a complex world. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 48, n. 5, p. 430-445, 2013.

FELDMAN, E. L.; CALLAGHAN, B. C.; POP-BUSUI, R.; ZOCHODNE, D. W. *et al.* Diabetic neuropathy. **Nature Reviews Disease Primers**, 5, n. 1, p. 42, Jun 13 2019.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. PH.; AMMOURY, N. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v.55, n. 1, p. R1 - R4,

FU, M.; SHEN, W.; GAO, W.; NAMUJIA, L. *et al.* Essential moieties of myricetins, quercetins and catechins for binding and inhibitory activity against α -Glucosidase. **Bioorganic Chemistry**, 115, p. 105235, 2021.

FUNATSU, H.; YAMASHITA, H.; NOMA, H.; MIMURA, T. *et al.* Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema. **American Journal of Ophthalmology**, 133, n. 1, p. 70-77, 2002.

GARRIDO, B. C.; DE CARVALHO, L. J. Nuclear magnetic resonance using electronic referencing: method validation and evaluation of the measurement uncertainties for the quantification of benzoic acid in orange juice. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 53, n. 2, p. 135-141, Feb 2015.

GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P. A.; PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A. *et al.* Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **Journal of Molecular Biology**, 353, n. 1, p. 38-52, 2005.

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

GILBERT, M. P.; PRATLEY, R. E. GLP-1 Analogs and DPP-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Therapy: Review of Head-to-Head Clinical Trials. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 11, p. 178, 2020.

GILLERY, P. [Advanced glycation end products (AGEs), free radicals and diabetes]. **Journal de la Société de biologie**, 195, n. 4, p. 387-390, 2001.

GOMES, M. D. B. Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 50, p. 271-280, 2023.

GUAZELLI, C. F. S.; FATTORI, V.; FERRAZ, C. R.; BORGHI, S. M. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory effects of hesperidin methyl chalcone in experimental ulcerative colitis. **Chemico-Biological Interactions**, 333, p. 109315, 2021.

GUNASEKHARAN, M.; CHOI, T. I.; RUKAYADI, Y.; MOHAMMAD LATIF, M. A. *et al.* Preliminary Insight of Pyrrolylated-Chalcones as New Anti-Methicillin-Resistant. **Molecules**, 26, n. 17, Sep 01 2021.

GUPTA, D.; JAIN, D. K. Chalcone derivatives as potential antifungal agents: Synthesis, and antifungal activity. **Urnal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, 6, n. 3, p. 114-117, 2015.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; PUISIEUX, F. *et al.* Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing non-steroidal anti-inflammatory drugs: gastrointestinal tolerance following intravenous and oral administration. **Pharmaceutical Research**, 12, n. 10, p. 1545-1547, Oct 1995.

H. FESSI; F. PUISIEUX; J.PH. DEVISSAGUET; N. AMMOURY *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

HAESEN, S.; CÖL, Ü.; SCHURGERS, W.; EVENS, L. *et al.* Glycolaldehyde-modified proteins cause adverse functional and structural aortic remodeling leading to cardiac pressure overload. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 12220, Jul 22 2020.

HAMED, A. E.; ELSAHAR, M.; ELWAN, N. M.; EL-NAKEEP, S. *et al.* Managing diabetes and liver disease association. **Arab Journal of Gastroenterology**, 19, n. 4, p. 166-179, 2018.

HAMED, A. E.; ELWAN, N.; NAGUIB, M.; ELWAKIL, R. *et al.* Diabetes Association with Liver Diseases: An Overview for Clinicians. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, 19, n. 3, p. 274-280, 2019.

HAN, Y.; LEE, S. H.; LEE, I. S.; LEE, K. Y. Regulatory effects of 4-methoxychalcone on adipocyte differentiation through PPAR γ activation and reverse effect on TNF- α in 3T3-L1 cells. **Food and Chemical Toxicology**, 106, n. Pt A, p. 17-24, 2017.

HARTOG, J. W.; VOORS, A. A.; BAKKER, S. J.; SMIT, A. J. *et al.* Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. **European Journal Heart Failure**, 9, n. 12, p. 1146-1155, 2007.

HE, X. F.; CHEN, J. J.; LI, T. Z.; HU, J. *et al.* Diarylheptanoid-chalcone hybrids with PTP1B and α -glucosidase dual inhibition from *Alpinia katsumadai*. **Bioorganic Chemistry**, 108, p. 104683, 2021.

HELLEWELL, L.; BHAKTA, S. Chalcones, stilbenes and ketones have anti-infective properties via inhibition of bacterial drug-efflux and consequential synergism with antimicrobial agents. **Access Microbiology**, 2, n. 4, p., 2020.

HIROSHI OHKAWA ; NOBUKO OHISHI ; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 95, n. 2, p. 535-538, 1979.

HSIEH, C. T.; HSIEH, T. J.; EL-SHAZLY, M.; CHUANG, D. W. *et al.* Synthesis of chalcone derivatives as potential anti-diabetic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 22, n. 12, p. 3912-3915, Jun 15 2012.

HSIEH, H. K.; TSAO, L. T.; WANG, J. P.; LIN, C. N. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 52, n. 2, p. 163-171, Feb 2000.

HUEBSCHMANN, A. G.; REGENSTEINER, J. G.; VLASSARA, H.; REUSCH, J. E. Diabetes and advanced glycoxidation end products. **Diabetes Care**, 29, n. 6, p. 1420-1432, Jun 2006.

IFTIKHAR, S.; KHAN, S.; BILAL, A.; MANZOOR, S. *et al.* Synthesis and evaluation of modified chalcone based p53 stabilizing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 27, n. 17, p. 4101-4106, Sep 01 2017a.

IFTIKHAR, S.; KHAN, S.; BILAL, A.; MANZOOR, S. *et al.* Synthesis and evaluation of modified chalcone based p53 stabilizing agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 27, n. 17, p. 4101-4106, Sep 01 2017b.

ILLIEN-JÜNGER, S.; PALACIO-MANCHENO, P.; KINDSCHUH, W. F.; CHEN, X. *et al.* Dietary Advanced Glycation End Products Have Sex- and Age-Dependent Effects on Vertebral Bone Microstructure and Mechanical Function in Mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, 33, n. 3, p. 437-448, 2018.

IMBALZANO, E.; QUARTUCCIO, S.; DI SALVO, E.; CREA, T. *et al.* Association between HMGB1 and asthma: a literature review. **Clinical and Molecular Allergy**, 15, p. 12, 2017.

JABEEN, F.; OLIFERENKO, P. V.; OLIFERENKO, A. A.; PILLAI, G. G. *et al.* Dual inhibition of the α -glucosidase and butyrylcholinesterase studied by molecular field topology analysis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 80, p. 228-242, Jun 10 2014.

JIMENEZ C PAULA ; FORTIER C. SÉRGIO; TITO M.C. LOTUFO; PESSOA CLÁUDIA *et al.* Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 287, n. 1, p. 93-101, 2003.

JOHN W BAYNES, M. H. D. **Bioquímica Médica**. 3ra ed. 2010.

JUNG, S. H.; PARK, S. Y.; KIM-PAK, Y.; LEE, H. K. *et al.* Synthesis and PPAR-gamma ligand-binding activity of the new series of 2'-hydroxychalcone and thiazolidinedione derivatives. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin(Tokyo)**, 54, n. 3, p. 368-371, 2006.

JURANEK, J.; RAY, R.; BANACH, M.; RAI, V. Receptor for advanced glycation end-products in neurodegenerative diseases. **Reviews in the Neurosciences**, 26, n. 6, p. 691-698, 2015.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, 444, n. 7121, p. 840-846, 2006.

KARAMAN, A.; AYDIN, H.; GEÇKINLI, B.; ÇETINKAYA, A. *et al.* DNA damage is increased in lymphocytes of patients with metabolic syndrome. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.**, 782, p. 30-35, 2015.

KAWAMORI, D.; AKIYAMA, M.; HU, J.; HAMBRO, B. *et al.* Growth factor signalling in the regulation of α -cell fate. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 13 Suppl 1, p. 21-30, 2011.

KERNER, W.; BRÜCKEL, J.; ASSOCIATION, G. D. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, 122, n. 7, p. 384-386, Jul 2014.

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

KIHO, T.; USUI, S.; HIRANO, K.; AIZAWA, K. *et al.* Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** m, 68, n. 1, p. 200-205, Jan 2004.

KOLM-LITTY, V.; SAUER, U.; NERLICH, A.; LEHMANN, R. *et al.* High glucose-induced transforming growth factor β 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. **Journal of Clinical Investigation**, 101, n. 1, p. 160-169, 1998.

KRAUSE, N.; WEGNER, A. Fructose Metabolism in Cancer. **Cells**, 9, n. 12, Dec 08 2020.

LAHTCHEV, K. L.; BATOVSKA, D. I.; PARUSHEV, S. P.; UBIYVOVK, V. M. *et al.* Antifungal activity of chalcones: a mechanistic study using various yeast strains. **Eur Journal of Medicinal Chemistry**, 43, n. 10, p. 2220-2228, 2008.

LEE, J. M.; EASON, A.; NELSON, C.; KAZZI, N. G. *et al.* Screening practices for identifying type 2 diabetes in adolescents. **Journal of Adolescent Health**, 54, n. 2, p. 139-143, Feb 2014.

LEHRKE, M.; MARX, N. Diabetes Mellitus and Heart Failure. **The American Journal of Medicine**, 130, n. 6S, p. S40-S50, 2017.

LI, J. L.; GAO, L. X.; MENG, F. W.; TANG, C. L. *et al.* PTP1B inhibitors from stems of *Angelica keiskei* (Ashitaba). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** Lett, 25, n. 10, p. 2028-2032, 2015.

LI, W.; HUANG, E.; GAO, S. Type 1 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairments: A Systematic Review. **Journal of Alzheimer's Disease**, 57, n. 1, p. 29-36, 2017.

LIM, J.; LEE, S. H.; CHO, S.; LEE, I. S. *et al.* 4-methoxychalcone enhances cisplatin-induced oxidative stress and cytotoxicity by inhibiting the Nrf2/ARE-mediated defense mechanism in A549 lung cancer cells. **Molecules and Cells**, 36, n. 4, p. 340-346, Oct 2013.

LIMA, D. C.; VALE, C. R.; VÉRAS, J. H.; BERNARDES, A. *et al.* Absence of genotoxic effects of the chalcone (E)-1-(2-hydroxyphenyl)-3-(4-methylphenyl)-prop-2-en-1-one and its

potential chemoprevention against DNA damage using in vitro and in vivo assays. **PLoS One**, 12, n. 2, p. e0171224, 2017.

MAHARAJAN, N.; GANESAN, C. D.; MOON, C.; JANG, C. H. *et al.* Licochalcone D Ameliorates Oxidative Stress-Induced Senescence via AMPK Activation. **International Journal of Molecular Sciences**, 22, n. 14, Jul 07 2021.

MALTA, D. C.; DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I.; MACHADO, Í. *et al.* Prevalence of diabetes mellitus as determined by glycated hemoglobin in the Brazilian adult population, National Health Survey. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 22Suppl 02, n. Suppl 02, p. E190006.SUPL.190002, 2019.

MASTACHI-LOZA, S.; RAMÍREZ-CANDELERO, T. I.; BENÍTEZ-PUEBLA, L. J.; FUENTES-BENÍTES, A. *et al.* Chalcones, a Privileged Scaffold: Highly Versatile Molecules in [4+2] Cycloadditions. **Chemistry – An Asian Journal**, 17, n. 20, p. e202200706, Oct 17 2022.

MATHIEU, C.; GILLARD, P.; BENHALIMA, K. Insulin analogues in type 1 diabetes mellitus: getting better all the time. **Nature Reviews Endocrinology**, 13, n. 7, p. 385-399, Jul 2017.

MEZA LETELIER, C. E.; SAN MARTÍN OJEDA, C. A.; RUIZ PROVOSTE, J. J.; FRUGONE ZAROR, C. J. [Pathophysiology of diabetic nephropathy: a literature review]. **Medwave**, 17, n. 1, p. e6839, Jan 12 2017.

MICHAEL L. BISHOP Y EDWARD P. FODY. **QUÍMICA CLÍNICA; Principios, procedimientos y correlaciones**. 5ta ed. 2007. 750 p. 9789701057667.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, 13, n. 8, p. 952-962, 1992.

MORIKAWA, T.; NINOMIYA, K.; AKAKI, J.; KAKIHARA, N. *et al.* Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dimeric dihydrochalcone glycosides from flowers of *Helichrysum arenarium*. **J Nature Medicine**, 69, n. 4, p. 494-506, Oct 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MOTTA, V. T. **BIOQUÍMICA BÁSICA**. 2da edição ed. 2011. 448 p. 9788599977668.

MOURAD, A. A. E.; KHODIR, A. E.; SABER, S.; MOURAD, M. A. E. Novel Potent and Selective DPP-4 Inhibitors: Design, Synthesis and Molecular Docking Study of Dihydropyrimidine Phthalimide Hybrids. **Pharmaceuticals (Basel)**, 14, n. 2, 2021.

MUELLER, M.; BECK, V.; JUNGBAUER, A. PPAR α activation by culinary herbs and spices. **Planta Medica.**, 77, n. 5, p. 497-504, 2011.

NEELOFAR, K. M.; AHMAD, J.; ARIF, Z.; ALAM, K. Elucidating the impact of glucosylation on human serum albumin: A multi-technique approach. **International Journal of Biological Macromolecules.**, 92, p. 881-891, 2016.

NELSON, V. L.; BALLOU, L. M.; LIN, R. Z. Energy balancing by fat Pik3ca. **Adipocyte**, 4, n. 1, p. 70-74, 2015.

NETO, R. A. M.; SANTOS, C. B. R.; HENRIQUES, S. V. C.; MACHADO, L. O. *et al.* Novel chalcones derivatives with potential antineoplastic activity investigated by docking and molecular dynamics simulations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 40, n. 5, p. 2204-2216, 2022.

NETO, S. F.; PRADA, A. L.; ACHOD, L. D. R.; TORQUATO, H. F. V. *et al.* α -amylin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 139, p. 111656, 2021.

NISKANEN, L.; SIITONEN, O.; KARJALAINEN, J.; UUSITUPA, M. Hyperglycaemic symptoms before diagnosis of non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus in relation to 5-year outcome. **Journal of Internal Medicine**, 231, n. 4, p. 397-402, 1992.

NOMA, H.; FUNATSU, H.; YAMASHITA, H.; KITANO, S. *et al.* Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy: possible balance between vascular endothelial growth factor and endostatin. **Archives of Ophthalmology**, 120, n. 8, p. 1075-1080, 2002.

NURSAMSAR; NUR, S.; FEBRINA, E.; ASNAWI, A. *et al.* Synthesis and Inhibitory Activity of Curculigoside A Derivatives as Potential Anti-Diabetic Agents with β -Cell Apoptosis. **Journal of Molecular Structure**, 1265, n. 5, 2022.

OGURTSOVA, K.; DA ROCHA FERNANDES, J. D.; HUANG, Y.; LINNENKAMP, U. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 128, p. 40-50, 2017.

OLIVEIRA, E. S. C.; PONTES, F. L. D.; ACHO, L. D. R.; DO ROSÁRIO, A. S. *et al.* qNMR quantification of phenolic compounds in dry extract of *Myrcia multiflora* leaves and its antioxidant, anti-AGE, and enzymatic inhibition activities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 201, p. 114109, 2021.

PAVLOU, D. I.; PASCHOU, S. A.; ANAGNOSTIS, P.; SPARTALIS, M. *et al.* Hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus: Targets and management. **Maturitas**, 112, p. 71-77, 2018.

PIEPER, G. M.; RIAZ-UL-HAQ. Activation of nuclear factor-kappaB in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. **Journal of Cardiovascular Pharmacology** 30, n. 4, p. 528-532, 1997.

PRESCOTT, T. A. K.; ANAISSI-AFONSO, L.; FOX, K. R.; MAXWELL, A. *et al.* A simplified and easy-to-use HIP HOP assay provides insights into chalcone antifungal mechanisms of action. **FEBS Lett**, 596, n. 23, p. 3087-3102, 2022.

PUISIEUX, F.; BARRATT, G.; COUARRAZE, G. *et al.* **Polymeric biomaterials**. Editora Severian Dumitriu, (Polymeric Micro- and Nanoparticles as Drug Carriers). 749-794 p. 1994.

PÉREZ GUTIERREZ, R. M.; GARCÍA CAMPOY, A. H.; PAREDES CARRERA, S. P.; MUÑIZ RAMIREZ, A. *et al.* 3'. **Molecules**, 24, n. 7, Mar 28 2019.

RAMMOHAN, A.; BHASKAR, B. V.; VENKATESWARLU, N.; GU, W. *et al.* Design, synthesis, docking and biological evaluation of chalcones as promising antidiabetic agents. **Bioorganic Chemistry**, 95, p. 103527, 2020.

RAMOS, A. S.; MAR, J. M.; DA SILVA, L. S.; ACHO, L. D. R. *et al.* Pedra-ume caá fruit: An Amazon cherry rich in phenolic compounds with antiglycant and antioxidant properties. **Food Research International**, 123, p. 674-683, 2019.

ROCHA, S.; SOUSA, A.; RIBEIRO, D.; CORREIA, C. M. *et al.* A study towards drug discovery for the management of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the carbohydrate-hydrolyzing enzymes α -amylase and α -glucosidase by chalcone derivatives. **Food Function**, 10, n. 9, p. 5510-5520, 2019.

RODRIGUEZ AMADO, J. R.; PRADA, A. L.; DUARTE, J. L.; KEITA, H. *et al.* Development, stability and. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 25, n. 8, p. 1158-1168, 2017.

RÜCKER, H.; AL-RIFAI, N.; RASCLE, A.; GOTTFRIED, E. *et al.* Enhancing the anti-inflammatory activity of chalcones by tuning the Michael acceptor site. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 13, n. 10, p. 3040-3047, 2015.

SALEEM, F.; KANWAL; KHAN, K. M.; CHIGURUPATI, S. *et al.* Synthesis of azachalcones, their α -amylase, α -glucosidase inhibitory activities, kinetics, and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**, 106, p. 104489, 2021.

SAMUELS, E. R.; WANG, T. Quantitative ^1H NMR analysis of a difficult drug substance and its exo-isomer as hydrochloride salts using alkaline deuterated methanol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 187, p. 113338, 2020.

SARMAH, S.; ROY, A. S. A review on prevention of glycation of proteins: Potential therapeutic substances to mitigate the severity of diabetes complications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 195, p. 565-588, 2022.

SCHERBAUM, W. A. Autoimmune diabetes insipidus. **Handbook of clinical neurology**, 181, p. 193-204, 2021.

SHAH, M. S.; BROWNLEE, M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. **Circulation Research**, 118, n. 11, p. 1808-1829, 2016.

SHIH, T. L.; LIU, M. H.; LI, C. W.; KUO, C. F. Halo-Substituted Chalcones and Azachalcones-Inhibited, Lipopolysaccharite-Stimulated, Pro-Inflammatory Responses through the TLR4-Mediated Pathway. **Molecules**, 23, n. 3, 2018.

SHORI, A. B. Screening of antidiabetic and antioxidant activities of medicinal plants. **Journal of Integrative Medicine**, 13, n. 5, p. 297-305, 2015.

SIMS, E. K.; CARR, A. L. J.; ORAM, R. A.; DIMEGLIO, L. A. *et al.* 100 years of insulin: celebrating the past, present and future of diabetes therapy. **Nature Medicine**, 27, n. 7, p. 1154-1164, 2021.

SIQUEIRA, M. M. R.; FREIRE, P. T. C.; CRUZ, B. G.; DE FREITAS, T. S. *et al.* Aminophenyl chalcones potentiating antibiotic activity and inhibiting bacterial efflux pump. **European Journal of Pharmacology Sci**, 158, p. 105695, 2021.

SMULYAN, H.; LIEBER, A.; SAFAR, M. E. Hypertension, Diabetes Type II, and Their Association: Role of Arterial Stiffness. **American Journal of Hypertension**, 29, n. 1, p. 5-13, 2016.

STANKEVICIUS, E.; KEVELAITIS, E.; VAINORIUS, E.; SIMONSEN, U. [Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. **Medicina (Kaunas)**, 39, n. 4, p. 333-341, 2003.

SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J.; D.N.; WADE. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. **Molecular Pharmacology**, 11, p. 824-832, 1975.

SUN, H.; SAEEDI, P.; KARURANGA, S.; PINKEPANK, M. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 183, p. 109119, 2022.

SUN, L. P.; GAO, L. X.; MA, W. P.; NAN, F. J. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 2,4,6-trihydroxychalcone derivatives as novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. **Chemical Biology & Drug Design**, 80, n. 4, p. 584-590, 2012.

SZEREMETA, M.; KEMONA-CHETNIK, I.; DYMICKA-PIEKARSKA, V.; MATOWICKA-KARNA, J. *et al.* [The relations between platelet count, mean platelet volume and HbA1C in patients with type 2 diabetes]. **Przegląd Lekarski**, 66, n. 12, p. 1049-1051, 2009.

TAJAMMAL, A.; BATOOL, M.; RAMZAN, A.; SAMRA, M. M. *et al.* Synthesis, antihyperglycemic activity and computational studies of antioxidant chalcones and flavanones derived from 2,5 dihydroxyacetophenone. **Journal of Molecular Structure**, 1148, n. 15, p. 512-520, 2017.

TEIMOURI, M.; HOSSEINI, H.; ARABSADEGHABADI, Z.; BABAEI-KHORZOUGH, R. *et al.* The role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Journal of Physiology and Biochemistry** 78, n. 2, p. 307-322, 2022.

TEIXEIRA, A. M. R.; SANTOS, H. S.; BANDEIRA, P. N.; JULIÃO, M. S. S. *et al.* Structural, spectroscopic and microbiological characterization of the chalcone 2E-1-(2'-hydroxy-3',4',6'-trimethoxyphenyl)-3-(phenyl)-prop-2-en-1-one derived from the natural product 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone. **Journal of Molecular Structure**, 1179, n. 5, p. 739-748, 2019.

TENG, B.; DUONG, M.; TOSSIDOU, I.; YU, X. *et al.* Role of protein kinase C in podocytes and development of glomerular damage in diabetic nephropathy. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 5, p. 179, 2014.

THIJSEN, D. H.; RONGEN, G. A.; VAN DIJK, A.; SMITS, P. *et al.* Enhanced endothelin-1-mediated leg vascular tone in healthy older subjects. **Journal of Applied Physiology**, 103, n. 3, p. 852-857, Sep 2007.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 419, n. 1, p. 31-40, Nov 2003.

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**, 31, n. 2, p. 455-461, Jan 30 2010.

UR RASHID, H.; XU, Y.; AHMAD, N.; MUHAMMAD, Y. *et al.* Promising anti-inflammatory effects of chalcones via inhibition of cyclooxygenase, prostaglandin E. **Bioorganic Chemistry**, 87, p. 335-365, Jun 2019.

VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; TADDEI, S. Effects of antihypertensive treatment on endothelial function. **Current Hypertension Reports**, 13, n. 4, p. 276-281, 2011.

VISTOLI, G.; DE MADDIS, D.; CIPAK, A.; ZARKOVIC, N. *et al.* Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, 47 Suppl 1, p. 3-27, 2013.

W, B. J.; H, D. M. **Bioquímica Médica** 3ra edição ed. 2011. 680 p. 978-84

WANG, C.; WANG, L.; YANG, Z. [Role of protein tyrosine phosphatase 1B in the type 2 diabetes and obesity]. **Biomedicine & pharmacotherapy**, 26, n. 6, p. 941-946, 2004.

WANG, W. Y.; HSIEH, P. W.; WU, Y. C.; WU, C. C. Synthesis and pharmacological evaluation of novel beta-nitrostyrene derivatives as tyrosine kinase inhibitors with potent antiplatelet activity. **Biochemical Pharmacology** 1, 74, n. 4, p. 601-611, Aug 2007.

WHITE, M. F. The insulin signalling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, 40 Suppl 2, p. S2-17, Jul 1997.

WOOD, I. S.; TRAYHURN, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **British Journal of Nutrition**, 89, n. 1, p. 3-9, Jan 2003.

YING, L.; SHEN, Y.; ZHANG, Y.; WANG, Y. *et al.* Association of advanced glycation end products with diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 177, p. 108880, Jul 2021.

ZHANG, J.; LIU, F. Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging. **IUBMB Life**, 66, n. 7, p. 485-495, Jul 2014.

ZHANG, L. B.; LEI, C.; GAO, L. X.; LI, J. Y. *et al.* Isoprenylated Flavonoids with PTP1B Inhibition from *Macaranga denticulata*. **Natural Products and Bioprospecting** , 6, n. 1, p. 25-30, Feb 2016.

ZHUANG, C.; ZHANG, W.; SHENG, C.; XING, C. *et al.* Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, 117, n. 12, p. 7762-7810, Jun 28 2017.

ZULKAWI, N.; NG, K. H.; ZAMBERI, N. R.; YEAP, S. K. *et al.* Antihyperglycemic and anti-inflammatory effects of fermented food paste in high-fat diet and streptozotocin-challenged mice. **Drug Design, Development and Therapy**, 12, p. 1373-1383, 2018.

7. APÊNDICE I: MINI CURRICULUM

LEONARD DOMINGO ROSALES ACHO

Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), possui graduação em Farmácia e bioquímica - Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP) com diploma revalidado pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Trabalhou com bolsa – técnica nos projetos “Prospecção de Produtos Naturais Inibidores de enzimas-chaves no desenvolvimento de fármacos ou cosméticos” e “Efeitos de Bioativos Naturais Sobre Vias Inflamadoras e adipogênicas *in Vitro* e *in Vivo*”. Com experiência em ensaios *in vitro*: quantificação de fenóis e flavonoides; ensaios antioxidantes como DPPH e ABTS; inibição de enzimáticas digestiva como: lipase, α -glicosidase e amilase; inibição de enzimas usadas na cosmetologia como: elastase, hialuronidase e tirosinase; teste antiglicantes por via oxidativa e não oxidativa. Experiencia em ensaios *in vivo* em modelos de camundongos e ratos: teste de tolerância oral a dissacarídeos, indução e tratamento de diabetes, testes anti-inflamatórios e nociceptivos; análises de composição centesimal. Experiência na docência pela universidade FAMETRO, e como farmacêutico pesquisador na empresa TERRAMAZONIA SUPERPLANTS. Com experiência na área de farmácia e no laboratório de pesquisa científica. Pertença atualmente no grupo de pesquisa Biophar-UFAM.

Produção bibliográfica durante o doutorado:

1. OLIVEIRA, EDINILZE S.C. ; ACHO, LEONARD D.R. ; MORALES-GAMBA, RUBEN DARIO ; DO ROSÁRIO, ALESSANDRO S. ; BARCELLOS, JOSÉ FERNANDO M. ; LIMA, EMERSOM S. ; MACHADO, MARCOS B. . Hypoglycemic effect of the dry leaf extract of *Myrcia multiflora* in streptozotocin-induced diabetic mice. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, v. 307, p. 116241, 2023.
2. DE LIMA BARROS, ANDRÉ ; DE LIMA, EMILLY J. S. P. ; FARIA, JÉSSICA V. ; ACHO, LEONARD R. D. ; LIMA, EMERSOM S. ; BEZERRA, DANIEL P. ; SOARES, ELZALINA R. ; DE LIMA, BRUNA R. ; COSTA, EMMANOEL V. ; PINHEIRO, MARIA LÚCIA B. ; BATAGLION, GIOVANA A. ; DA SILVA, FELIPE M. A. ; CARDOZO, NÁLLARET M. DÁVILA ; GONÇALVES, JOSÉ F. C. ; KOOLEN, HECTOR H. F. . Cytotoxicity and Lipase Inhibition of Essential Oils from Amazon Annonaceae Species. Chemistry-Switzerland, v. 4, p. 1208-1225, 2022.
3. COSTA, MARIA BEATRIZ SILVA ; SIMÕES, REJANE DE CASTRO ; SILVA, MÁRCIA DE JESUS AMAZONAS DA ; OLIVEIRA, ANDRÉ CORREA DE ; ACHO, LEONARD DOMINGO ROSALES ; LIMA, EMERSOM SILVA ; TADEI, WANDERLI PEDRO ; TELES, HELDER LOPES ; OLIVEIRA, CAMILA MARTINS DE . Oxidative stress induction by crude extract of *Xylaria* sp. triggers lethality in the larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. REVISTA, v. 55, p. 29;55, 2022.
4. FERREIRA, R. G. S. ; GUILHON, F. ; ACHO, LEONARD D.R. ; BATISTA, N. Y. ; GUEDES-JUNIOR, F. C. ; FERREIRA, M. S. L. ; BARCELLOS, J. F. M. ; VEIGA-JUNIOR, V. F. ; LIMA, E. S. . Anti-hyperglycemic, lipid-lowering, and anti-obesity effects of the triterpenes α and β -amyrenones in vivo. *Avicenna Journal Of Phytomedicine*, v. 11, p. 451-463., 2021.
5. OLIVEIRA, EDINILZE S.C. ; PONTES, FLÁVIA L.D. ; ACHO, LEONARD D.R. ; DO ROSÁRIO, ALESSANDRO S. ; DA SILVA, BÁRBARA JANAÍNA P. ; DE A. BEZERRA, JAQUELINE ; CAMPOS, FRANCINETE R. ; LIMA, EMERSOM S. ; MACHADO, MARCOS B. . qNMR quantification of phenolic compounds in dry extract of *Myrcia multiflora* leaves and its antioxidant, anti-AGE, and enzymatic inhibition activities. JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, v. 201, p. 114109, 2021.
6. NETO, SERAFIM FLORENTINO ; PRADA, ARIADNA LAFOURCADE ; ACHOD, LEONARDO DOMINGO ROSALES ; TORQUATO, HERON FERNANDES VIEIRA ; LIMA, CAUÊ SANTOS ; PAREDES-GAMERO, EDGAR JULIAN ; SILVA DE MORAES, MARIA ONEIDE ; LIMA, EMERSOM SILVA ; SOSA, EDGAR HERNANDEZ ; DE SOUZA, TATIANE PEREIRA ; AMADO, JESUS RAFAEL RODRIGUEZ . α -amyrin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY, v. 139, p. 111656, 2021.

7. FARIA, JÉSSICA V. ; VALIDO, IRIS H. ; PAZ, WEIDER H.P. ; DA SILVA, FELIPE M.A. ; DE SOUZA, AFONSO D.L. ; ACHO, LEONARD R.D. ; LIMA, EMERSOM S. ; BOLETI, ANA PAULA A. ; MARINHO, JANE V.N. ; SALVADOR, MARCOS J. ; DOS SANTOS, EDSON L. ; SOARES, PATRÍCIA K. ; LÓPEZ-MESAS, MONTSERRAT ; MAIA, JAIR M.F. ; KOOLEN, HECTOR H.F. ; BATAGLION, GIOVANA A. . Comparative evaluation of chemical composition and biological activities of tropical fruits consumed in Manaus, central Amazonia, Brazil. *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL*, v. 139, p. 109836, 2021.
8. SALOMÃO-OLIVEIRA, ADELE. Hypolipidemic Effect of Supplements Containing the Bioactive Compounds Found in Amazonian Fruits. *Food Science and Nutrition*, v. 7, p. 1-9, 2021.
9. LAFOURCADE PRADA, ARIADNA ; ACHOD, LEONARD DOMINGO ROSALES ; KEITA, HADY ; CARVALHO, JOSE CARLOS TAVARES ; DE SOUZA, TATIANE PEREIRA ; RODRÍGUEZ AMADO, JESÚS RAFAEL . Development, pharmacological and toxicological evaluation of a new tablet formulation based on *Cassia grandis* fruit extract. *SUSTAINABLE CHEMISTRY AND PHARMACY*, v. 16, p. 100244, 2020.
10. FERNANDES, KAMILA RANGEL PRIMO ; BITTERCOURT, PAULO SENNA ; SOUZA, AFONSO DUARTE LEÃO DE ; SOUZA, ANTONIA QUEIROZ LIMA DE ; SILVA, FELIPE MOURA ARAÚJO DA ; LIMA, EMERSOM SILVA ; ACHO, LEONARD DOMINGO ROSALES ; NUNOMURA, RITA DE CÁSSIA SARAIVA ; TEIXEIRA, ANA FRAZÃO ; KOOLEN, HECTOR HENRIQUE FERREIRA . Phenolic compounds from *Virola venosa* (Myristicaceae) and evaluation of their antioxidant and enzyme inhibition potential. *ACTA AMAZONICA*, v. 49, p. 48-53, 2019.
11. RAMOS, ANDREZZA S. ; MAR, JOSIANA M. ; DA SILVA, LAIANE S. ; ACHO, LEONARD D.R. ; SILVA, BÁRBARA JANAÍNA P. ; LIMA, EMERSOM S. ; CAMPELO, PEDRO H. ; SANCHES, EDGAR A. ; BEZERRA, JAQUELINE A. ; CHAVES, FRANCISCO CÉLIO M. ; CAMPOS, FRANCINETE R. ; MACHADO, MARCOS B. . Pedra-ume caá fruit: An Amazon cherry rich in phenolic compounds with antiglycant and antioxidant properties. *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL*, v. 123, p. 674-683, 2019.
12. COSTA, EMMANOEL V. ; SOARES, LIVIANE N. ; PINHEIRO, MARIA L.B. ; MAIA, BEATRIZ H.L.N.S. ; MARQUES, FRANCISCO A. ; BARISON, ANDERSSON ; ALMEIDA, JACKSON R.G.S. ; SOUSA, IRAN L. ; GALAVERNA, RENAN S. ; HEERDT, GABRIEL ; MORGON, NELSON H. ; ACHO, LEONARD D.R. ; LIMA, EMERSOM S. ; DA SILVA, FELIPE M.A. ; KOOLEN, HECTOR H.F. . Guaianolide sesquiterpene lactones and aporphine alkaloids from the stem bark of *Guatteria friesiana*. *PHYTOCHEMISTRY*, v. 145, p. 18-25, 2018.
13. LAFOURCADE PRADA, ARIADNA ; KEITA, HADY ; PEREIRA DE SOUZA, TATIANE ; SILVA LIMA, EMERSOM ; DOMINGO ROSALES ACHO, LEONARD ; DE JESUS AMAZONAS DA SILVA, MÁRCIA ; CARLOS

TAVARES CARVALHO, JOSÉ ; RAFAEL RODRIGUEZ AMADO, JESUS .
Cassia grandis Lf nanodispersion is a hypoglycemic product with a potent α -glucosidase and pancreatic lipase inhibitor effect. ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, v. 27, p. 191-199, 2018.

14. PAZ, WEIDER H.P. ; DE ALMEIDA, RICHARDSON A. ; BRAGA, NEILA A. ; DA SILVA, FELIPE M.A. ; ACHO, LEONARD D.R. ; LIMA, EMERSOM S. ; BOLETI, ANA PAULA A. ; DOS SANTOS, EDSON L. ; ANGOLINI, CÉLIO F.F. ; BATAGLION, GIOVANA A. ; KOOLEN, HECTOR H.F. . Remela de cachorro (*Clavija lancifolia* Desf.) fruits from South Amazon: Phenolic composition, biological potential, and aroma analysis. FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, v. 109, p. 112-119, 2018.

8. APÊNDICE II: Certificado do CEUA



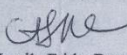
Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comissão de Ética no Uso de Animais



18.08.2020

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da atividade antidiabética de um novo nitroderivado do 1-nitro-2-feniletano”, sob a responsabilidade dos pesquisadores **Leonard Domingo Rosales Acho** (doutorando do PPGIF/UFAM) e **Emerson Silva Lima** (docente/UFAM), que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – e por encontrar-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após análise pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, foi aprovada sob o número 004/2019.


Prof.ª. Dra. Cinthya Iamile Frithz Brandão de Oliveira
Presidente do CEUA-UFAM

Manaus, 16 de janeiro de 2019.

Av. Gal. Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000, Coroado, Campus Universitário, Setor Sul, ICB Bloco 1, terceiro andar, 69077-000 – Manaus/AM