

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação do efeito do extrato bruto e da fração acetato de etila da casca do fruto da
Annona crassiflora Mart. na oxidação e glicação da LDL *in vitro*

Nycollas Bruno Oliveira Fernandes

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia –MG

Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação do efeito do extrato bruto e da fração acetato de etila da casca do fruto da
Annona crassiflora Mart. na oxidação e glicação da LDL *in vitro*

Nycollas Bruno Oliveira Fernandes

Orientadora: Prof. Dr^a. Françoise Vasconcelos Botelho

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia –MG

Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação do efeito do extrato bruto e da fração acetato de etila da casca do fruto da
Annona crassiflora Mart. na oxidação e glicação da LDL *in vitro*

Nycollas Bruno Oliveira Fernandes

Françoise Vasconcelos Botelho
(Instituto de Biotecnologia)

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Coordenador do Curso Edgar Silveira Campos

Uberlândia –MG
Dezembro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação do efeito do extrato bruto e da fração acetato de etila da casca do fruto da
Annona crassiflora Mart. na oxidação e glicação da LDL *in vitro*

Nycollas Bruno Oliveira Fernandes

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Françoise Vasconcelos Botelho
Presidente da Banca

Uberlândia, de de

RESUMO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica com os primeiros estágios envolvendo modificações oxidativas da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Além disso, o diabetes relaciona-se com doença através da glicação da LDL. Tais modificações, oxidativas e glicativas, alteram a estrutura da lipoproteína tornando-a reconhecida por receptores *scavengers*, levando à formação das *foam cells* (células espumosas), marca da lesão aterosclerótica. *Annona crassiflora* Mart. é uma planta muito usada na medicina popular com diversas propriedades clínicas, dentre elas estão a proteção contra o estresse oxidativo, inflamação e glicação. O objetivo do nosso estudo foi avaliar o efeito do extrato bruto, da fração acetato de etila da casca dos frutos da *Annona crassiflora* Mart. e do flavonóide quercetina na oxidação e glicação da LDL *in vitro*. A LDL foi isolada do plasma com EDTA por ultracentrifugação através de criação de um gradiente de concentração com KBr. A sua oxidação foi monitorada através da formação de dienos conjugados a 234nm, produção das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), análise da fluorescência dos resíduos de triptofano e através das alterações estruturais por espectroscopia de infravermelho. Para os ensaios de glicação a LDL foi incubada com metilglioxal e diferentes concentrações do extrato bruto de da fração acetato de etila da *Annona crassiflora* Mart., quercetina. A intensidade da fluorescência, como medida dos produtos de glicação à LDL, foi analisada a 340nm de excitação e a 380nm de emissão e os resultados foram expressos em unidades de fluorescência. Os resultados mostraram que o extrato da casca do fruto e sua fração retardaram ou inibiram a oxidação da LDL induzida por íons Cu^{+2} *in vitro*. A Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier (FTIR) revelou que regiões específicas da Apolipoproteína B-100 que foram modificadas e os tratamentos reduziram tais alterações. Entretanto, o aumento dos níveis de produtos avançados de glicação observados na LDL glicada por metilglioxal não foram revertidos pelo extrato bruto e nem pela fração acetato de etila, somente pela quercetina. Considerando que os tratamentos com os extratos de *Annona crassiflora* Mart. retardaram ou inibiram a oxidação da LDL *in vitro* é interessante o estudo em modelos de aterogênese para avaliarmos os efeitos no desenvolvimento da lesão aterosclerótica.

Palavras-chave: LDL, aterosclerose, oxidação, glicação, *Annona crassiflora* Mart..

SUMÁRIO

RESUMO	iii
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS.	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos	8
3 METODOLOGIA	8
3.1 Coleta do material	8
3.2 Obtenção do extrato de <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	9
3.3 Isolamento da LDL	9
3.4 Avaliação da oxidação da LDL <i>in vitro</i> com diferentes concentrações do extrato de <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	10
3.4.1 Avaliação da peroxidação lipídica da oxidação da LDL <i>in vitro</i> pelo método das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	11
3.4.2 Monitoramento da fluorescência do resíduo de triptofano com a oxidação da LDL	12
3.4.3 Avaliação da alteração molecular da oxidação da LDL por Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier (FTIR).....	12
3.5 Ensaio de glicação da LDL	13
3.6 Análises estatísticas	13
4 RESULTADOS.....	14
4.1 Avaliação da oxidação da LDL <i>in vitro</i> com diferentes concentrações do extrato de <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	14
4.2 Produção de TBARS	16
4.3 Fluorescência Trp-LDL.....	17
4.4 FTIR	18
4.5 Formação de produtos avançados de glicação	20
5 DISCUSSÃO.....	21
6 CONCLUSÃO.....	23
7 REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, progressiva, em resposta a injúria do endotélio vascular. O seu desenvolvimento é caracterizado por diversos eventos celulares e moleculares, dentre os quais se destacam o acúmulo de lipídeos contidos na lipoproteína de baixa densidade (LDL) e de células como, macrófagos, linfócitos T, células musculares lisas, que vão se depositando na túnica íntima das artérias de médio a longo calibre, ocasionando a formação de placas ateroscleróticas (HANSSON et al., 2015; ROSS, 1999). A doença causa infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica e está entre as doenças cardiovasculares com alto índice de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos, industrializados ou em desenvolvimento (BENJAMIN et al., 2018). Segundo dados epidemiológicos da organização mundial da saúde (OMS), das 50 milhões de mortes nas últimas décadas, 30% foram causadas por doenças cardiovasculares, representando um total de 17 milhões de mortes. Os fatores de risco modificáveis, associados à doença envolvem estilo de vida sedentário, consumo de dietas ricas em colesterol e gorduras saturadas, tabagismo. Além destes fatores, temos que considerar o histórico familiar, hipertensão, diabetes, idade avançada, que são os fatores de risco não modificáveis e que precisam ser cuidados (REIS, 2019; FALK, 2006).

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) participam diretamente do processo da aterogênese, sendo as principais moléculas transportadoras de colesterol do corpo humano e sua função é fornecer o colesterol para as células, onde o colesterol pode ser utilizado para a modulação da fluidez da membrana, síntese de hormônios esteróides, vitamina D, sais biliares e regulação de vias de sinalização celulares (KOVANEN et al., 2000). Como mostrado na **Figura 1** a Apolipoproteína B100 (Apo-B100) localizada na superfície da LDL é o componente proteico estrutural permitindo a circulação da LDL na corrente sanguínea e também seu reconhecimento por receptores de membrana para endocitose e degradação das mesmas. A endocitose, pelo receptor de LDL, depende principalmente da estrutura conformacional adequada da Apo-B100 (PRESSL e LAGGNER, 2012).

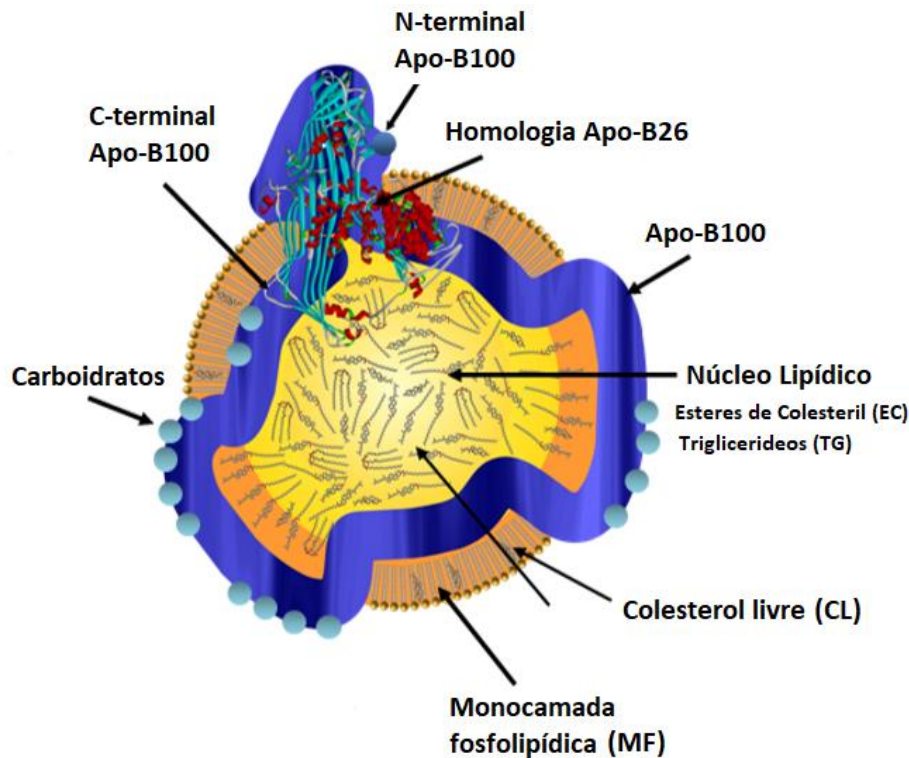


Figura 1. Composição da partícula da Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL). Adaptado de Pressl, R. e Laggner, P. 2012.

A aterogênese se inicia com a injúria endotelial, como mostrado na **Figura 2**, que causa infiltração e acúmulo da LDL no espaço subendotelial onde a LDL se torna alvo de oxidação pelos catalisadores cobre e ferro (WITZTUM e GLASS, 2001). Amostras de lesões ateroscleróticas apresentam cobre e ferro, ambos podendo participar da formação de radicais livres e, na ausência de agentes quelantes, o Cu (II) se liga à resíduos de histidina da apolipoproteína B-100 na molécula da LDL podendo ser reduzido a Cu (I) induzindo o processo de oxidação (GIESEG et al., 1994). A peroxidação lipídica ocorre quando Cu (I) reduz hidroperóxidos lipídicos pré-formados a radicais álcoxil. Na ausência dos hidroperóxidos lipídicos, a pró-oxidação pode ser iniciada por radicais hidroxila resultantes da redução do oxigênio por Cu (I), há então a transformação de LDL à LDL oxidada (LDL-ox) (WITZTUM e GLASS, 2001). A lipoproteína modificada aumenta a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, levando ao recrutamento de leucócitos, dentro do espaço subendotelial (KETELHUTH e HANSSON, 2011). Com a interação de proteínas quimioatraentes, estas células inflamatórias migram para a íntima dos vasos, há então uma diferenciação de monócito a macrófago que expressam receptores sequestradores da LDLox (CD36,

SRA e LOX-1) e internalizam a lipoproteína modificada (MOORE et al., 2006). A marca da lesão aterosclerótica são as chamadas células espumosas, devido sua aparência rica em gotículas de gordura e presença na parede arterial (STEINBERG & WITZTUM, 2002).

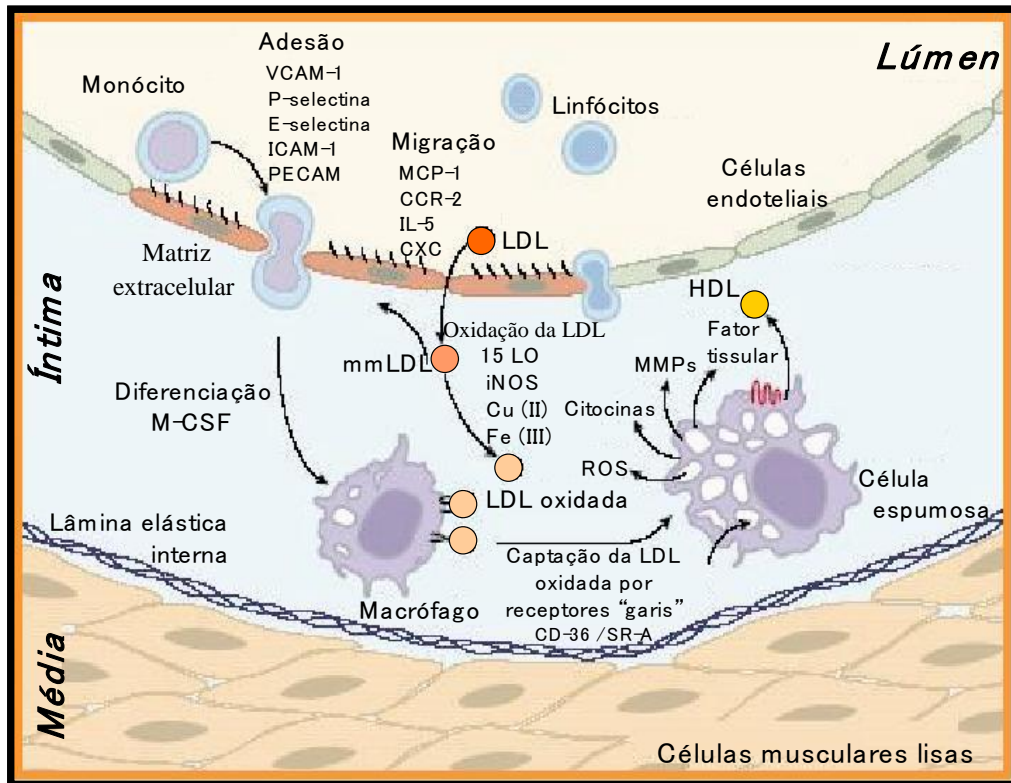


Figura 2. Eventos iniciais no desenvolvimento da estria gordurosa. A LDL penetra no espaço subendotelial (íntima) aderindo-se à proteoglicanos da matriz extracelular. Tal aprisionamento aumenta a susceptibilidade da LDL à oxidação por diferentes vias incluindo lipoxigenases, mieloperoxidases, iNOS e por metais de transição. Os monócitos, aderidos às células endoteliais, migram para o espaço subendotelial diferenciando-se em macrófagos que expressam receptores *scavengers* (garis) captando descontroladamente a LDL modificada oxidativamente e formando a célula espumosa que caracteriza a lesão aterosclerótica. Adaptado de WITZTUM e GLASS., 2001.

Há também uma liberação de citocinas por mastócitos, linfócitos T que migraram para a íntima, juntamente com as células espumosas, promovendo inflamação e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), este desbalanço a favor do aumento da produção de ROS pelos macrófagos, leva a diminuição das atividades de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidases (SIES, 1997). Os fatores de crescimento liberados estimulam a migração das células musculares lisas e a deposição de colágeno, que leva ao desenvolvimento da placa aterosclerótica. Portanto, as ROS, induzem a expressão de receptores sequestradores nas

células musculares lisas e sua diferenciação em células espumosas, induzem também a liberação de metaloproteinases da matriz e a degradação de colágeno o que resulta na ruptura da placa (KATTOOR et al., 2017; STEINBERG, 1989; YOSHIDA e KISUGI, 2010).

A inibição da produção de ROS protege as células endoteliais da lesão causada pelo acúmulo de LDL oxidada e proliferação de macrófagos durante o desenvolvimento da placa aterosclerótica. Além disso, agentes antioxidantes são capazes de reduzir a oxidação da LDL e, conseqüentemente, a formação da lesão aterosclerótica (SKILTON, 2008). Antioxidantes podem atuar, em parte, por inibir a ligação do cobre ou ferro à LDL, ou seja, quelando metais de transição e impedindo que esses atuem nos eventos de peroxidação lipídica (GUNATHILAKE et al., 2014). Com a diminuição do sistema endógeno antioxidante que inclui vitaminas e enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidases que reparam o dano oxidativo, novos estudos estão surgindo sobre o uso de antioxidantes externos para fins terapêuticos, para prevenir ou retardar a aterogênese. Dentre os compostos antioxidantes podemos citar os polifenólicos, os alcalóides, vitaminas como a vitamina E, C e A que são compostos presentes em produtos naturais de grande poder antioxidante capazes de inibir a oxidação da LDL, reduzirem a produção de ROS, inibirem a glicação da LDL, a progressão da aterosclerose e contribuir para o descobrimento de drogas mais efetivas (RICE-EVANS et al., 1995; RICE-EVANS, 1996, dos SANTOS et al., 2018; BHASKAR; SHALINI; HELEN, 2011; RABBANI et al., 2011).

Outro fator agravante para o desenvolvimento da aterosclerose é a hiperglicemia. O risco do desenvolvimento de aterosclerose é até 3 vezes maior em pacientes com diabetes, sendo que a progressão da doença é acelerada se a resistência à insulina está associada, o que contribui com a inflamação (RABBANI et al., 2011). Algumas modificações nas partículas das lipoproteínas como a glicação não enzimática podem ser demonstradas em tecidos e proteínas circulantes nos diabéticos, como por exemplo a hemoglobina glicada que reflete na concentração de glicose circulante, outros fatores metabólicos, genéticos e agentes terapêuticos também estão envolvidos (Gkogkolou; Böhm, 2012). A glicação é um processo não enzimático que ocorre entre açúcares e grupos nucleofílicos de biomoléculas ou quando açúcares redutores como glicose e frutose reagem com os grupos nucleofílicos de aminoácidos constituintes de lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos, o que gera os produtos de glicação avançada (PGA), estes

são capazes de causar modificações químicas e funcionais em diferentes estruturas biológicas, pela geração de radicais livres e também podem causar diversas complicações fisiológicas (Nowotny et al., 2015; Florkowski, 2013). Depois de se ligarem ao seu receptor os PGA trazem complicações patológicas, como, estresse oxidativo, respostas pro-inflamatórias e morte celular (Ott et al., 2014). OS PGA são também os principais mediadores patogênicos da diabetes e a hiperglicemia tende a favorecer a glicação proteica onde a glicose e outros compostos reativos como o glioxal e o metilglioxal reagem com o grupamento amino das proteínas levando a formação dos PGA. O metilglioxal é um potente agente glicante e está aumentado de 2 a 5 vezes nas concentrações plasmáticas dos pacientes diabéticos contribuindo para a hiperglicemia nestes pacientes (RABBANI et al., 2011; LYONS et al., 1986). A glicação da LDL por metilglioxal é direcionada aos resíduos de arginina presentes na apoB-100, o que gera a formação do maior produto de glicação avançada, conhecido como hidroimidazolona (MG-H1). (dos SANTOS et al., 2018; TORRES et al., 2018).

A glicação e oxidação da LDL são processos interdependentes e cada vez mais pesquisadores buscam por compostos que inibam tais eventos de forma efetiva, sem efeitos adversos para que possam ser uma estratégia para a prevenção das doenças cardiovasculares. Diversos trabalhos têm demonstrado que as plantas possuem vários compostos com propriedades antiglicativas e ou antioxidativas (KIM et al., 2019; WU et al., 2009; dos SANTOS et al., 2018). Estudos mostram que compostos como os alcaloides, vitaminas e, principalmente, os polifenóis podem ser aliados importantes na prevenção dos eventos envolvidos no desenvolvimento e progressão da aterosclerose através de suas ações antioxidativas, na quelatação de metais, sequestro de ROS, inibição da produção dos PGA e bloqueio de MG. (LAM et al., 2005; ODJAKOVA et al., 2012; BARTOSZ e BARTOSZ 2015; YEH et al., 2016; KIM e SHIM 2019; CHEN et al., 2007).

Uma das plantas estudadas no nosso laboratório é a *Annona crassiflora* Mart., uma espécie nativa do Cerrado brasileiro conhecida como Araticum, muito utilizada na medicina popular para tratamento de câncer, picada de cobras, doenças sexualmente transmissíveis, são utilizadas como tônico e adstringente; possui propriedades antifúngicas e antirreumáticas. (VILAR et al., 2011). Estudos mostram também a ação antiparasitária, antibacteriana, nematicida, antimalárica, antimutagênica e anti-inflamatória (MESQUITA et al., 2005; ARRUDA et al., 2018)

As frações obtidas da casca do fruto apresentaram ser fonte de compostos antioxidantes com atividades antiglicantes (JUSTINO et al., 2016). A fração enriquecida com polifenóis também apresentou moléculas antioxidantes com propriedades hepatoprotetoras contra o estresse oxidativo e nitrosativo causado pela indução da diabetes em camundongos (JUSTINO et al., 2017) e efeitos protetores contra dor inflamatória aguda e persistente (JUSTINO et al., 2019). A casca do fruto também apresentou uma diversidade de compostos como polifenóis, flavonóides e alcaloides com atividade inibitória da lipase pancreática, atividade cicatrizante e anti-inflamatória (PEREIRA et al., 2017; de Moura 2018), inibição de glicação e peroxidação lipídica (JUSTINO et al., 2019), e efeitos antinoceptivos (JUSTINO et al., 2020).

Diante disso, levantamos a hipótese de que uso dos extratos da casca do fruto do “Araticum” poderiam ser efetivos contra as modificações oxidativas induzidas por Cu(II) e glicativas da LDL.

2 OBJETIVOS.

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do nosso trabalho foi avaliar o efeito do extrato bruto e da fração acetato de etila, da casca dos frutos da *Annona crassiflora* Mart., na oxidação e glicação da LDL *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção do extrato da casca de *Annona crassiflora* Mart.
- Isolamento da LDL.
- Avaliação da oxidação da LDL *in vitro* com diferentes concentrações do extrato e da fração acetato de etila de *Annona crassiflora* Mart.
- Avaliar a peroxidação lipídica da oxidação da LDL *in vitro* pelo método das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- Monitorar a fluorescência do resíduo de triptofano com a oxidação da LDL.
- Avaliar a alteração molecular da oxidação da LDL por Espectroscopia Infravermelha com Transformação de Fourier (FTIR).
- Avaliar a glicação da LDL com metilglioxal.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta do material

Os frutos de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) foram coletados nos recursos naturais do Bioma Cerrado na região norte do estado de Minas Gerais por um comerciante de frutos nativos do Cerrado localizado em Presidente Olegário, Minas Gerais, Brasil. As cascas do araticum foram cuidadosamente retiradas do fruto para serem transportadas, sob proteção da luz, para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia. As cascas foram armazenadas a -20° C até o momento das extrações e análises.

3.2 Obtenção do extrato de *Annona crassiflora* Mart.

O extrato etanólico da casca do fruto araticum foi obtido pelo processo de maceração à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Foram utilizados 1,0 kg de cascas do fruto, triturados e previamente secos em estufa a 50° C durante 24 horas. A maceração foi realizada utilizando 5,0 L de etanol 98% como solvente (proporção de 1:5 m.v⁻¹). O material vegetal foi deixado em maceração durante 6 dias. Após esse período, a solução com os extrativos foi filtrada e o solvente foi removido em um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40° C. O extrato foi congelado e liofilizado para a remoção da água. O processo de maceração com o material vegetal filtrado foi repetido até a exaustão da extração. O extrato etanólico foi armazenado a -20° C. Para a partição líquido-líquido do extrato etanólico, aproximadamente 20 gramas de extrato etanólico da casca do araticum foi solubilizado em 200,0 mL de solução metanol:água (9:1). Com o auxílio de um funil de separação, a partição líquido-líquido foi realizada com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol e água. Para esse processo, foram realizadas quatro extrações com aproximadamente 200,0 mL de cada solvente. Os solventes das frações foram totalmente removidos por rotaevaporação sob pressão reduzida a 40° C; as frações foram congeladas e liofilizadas para a remoção da água remanescente e, em seguida, armazenadas a -20° C.

3.3 Isolamento da LDL

Foram coletados 10mL do sangue de indivíduo saudável (voluntário) não fumante, em tubo vacutainer com EDTA 10%, os tubos foram centrifugados a 3,000rpm, 4°C, por dez minutos. O plasma foi coletado e adicionado os conservantes: aprotinina, benzamidina 2mM, solução de azida sódica 5% com EDTA 5% e clorafenicol 0,1% e, por fim, o PMSF 0,5mM em DMSO. O plasma teve sua densidade elevada para 1,21 (densidade da lipoproteína LDL) com solução de Brometo de potássio (KBr). Três mililitros deste plasma foram colocados em tubos de polipropileno, com volume total de 10mL, próprios para ultracentrífuga. Adicionamos sobre o plasma a solução de KBr de densidade 1,006 até completar o volume total do tubo, formando assim o gradiente descontínuo de densidade de duas camadas. Os tubos devidamente equilibrados foram colocados para ultracentrifugação por duas horas a 40,000rpm e 4°C, para separação das

lipoproteínas de alta densidade. Terminada a rodada, foi retirada a camada composta pela LDL e a amostra foi submetida à diálise em solução de tampão fosfato (PBS) 20 mM, pH 7.4, por um período de 72 horas a 20°C com trocas do tampão a cada 24 horas. Em seguida, o material foi filtrado e guardado na geladeira, em recipiente protegido da luz (CHUNG et al., 1986).

3.4 Avaliação da oxidação da LDL *in vitro* com diferentes concentrações do extrato de *Annona crassiflora* Mart.

Uma das técnicas mais comuns de oxidação da LDL *in vitro* envolve a incubação com Cu (II). A cinética da oxidação da LDL induzida por íons cobre pode ser dividida em três fases: fase lag, de propagação e decomposição (**Figura 3**). Durante a fase lag a LDL torna-se progressivamente depletada dos seus antioxidantes, ocorrendo uma mínima peroxidação lipídica. Quando a LDL está depletada dos seus antioxidantes, a taxa de peroxidação aumenta rapidamente e cerca de 70 a 80% dos ácidos graxos poliinsaturados são oxidados. O conteúdo de peróxidos da LDL começa a cair caracterizando a fase de decomposição onde a formação de aldeídos torna-se predominante. Este parâmetro é comumente usado como ensaio *in vitro* para verificar a susceptibilidade da LDL a oxidação (GIESEG e ESTERBAUER, 1994).

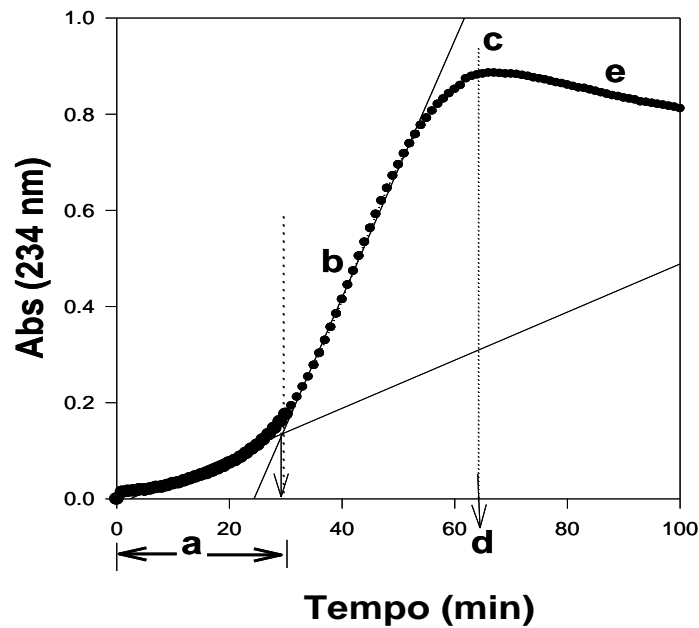


Figura 3. Curva típica do monitoramento da oxidação da LDL pelo método da formação de dieno conjugado a 234 nm. A curva mostra a fase lag (a), (b) representa a fase de propagação, (d, c) fornecem a concentração máxima da formação de dieno conjugado antes da fase de decomposição (c,e). Adaptado de Giese et al., 1994).

Para monitoramento da oxidação amostras de LDL (2mg proteína/mL) foram diluídas a uma concentração final de 100 µg de proteína/mL e incubadas em solução contendo tampão fosfato (PBS 1X, pH 7,4) com diferentes concentrações do extrato bruto, da fração acetato de etila e da quercetina (0,5, 1,0 e 2,0 µg/mL) por 2 horas a 37 °C. A oxidação foi iniciada com CuCl₂ (concentração final de 5 µM) no meio de reação e o monitoramento foi feito espectrofotometricamente, medindo-se a formação de dienos conjugados a 234nm a cada 2 minutos por 2 horas. Analisamos o tempo de resistência à oxidação da LDL (t-lag) determinando graficamente o intercepto das tangentes entre a etapa lenta e a rápida da absorção de dienos conjugados (GIESEG e ESTERBAUER, 1994).

3.4.1 Avaliação da peroxidação lipídica da oxidação da LDL *in vitro* pelo método das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os produtos finais da peroxidação lipídica podem ser avaliados através da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (OKHAWA et al., 1979). As alíquotas do meio de reação do item 3.4 foram armazenadas em gelo e foi adicionado em cada alíquota a proporção (1:1) de ácido tricloroacético (TCA 20%).

Após a homogeneização das alíquotas foram adicionados HCl 0,5 M e foram separadas em branco e teste (presença e ausência de TBA, 0,75%). Para proteger o material analisado da oxidação foi adicionado também BHT (50 mM) para concentração final de 0,1mM. As amostras foram incubadas a 95°C e centrifugadas a 10,000g, 4°C por 6 minutos e após, foram lidas espectrofotometricamente, a 500 e 600nm. A análise foi determinada pela formação de nmol de malondialdeído (MDA).

3.4.2 Monitoramento da fluorescência do resíduo de triptofano com a oxidação da LDL

A LDL nativa exibe espectro de fluorescência aproximadamente na banda de 332 nm, que é atribuído aos resíduos de triptofano (Trp) na apoB-100 (GIESSUF et al., 1995). A perda de fluorescência é considerada um marco do dano oxidativo na porção protéica da LDL. Para tais análises usamos o mesmo procedimento de oxidação da LDL descritas no item 3.4 na ausência ou presença de concentrações do extrato bruto, da fração acetato de etila e da quercetina (0,5, 1,0 e 2,0 µg/mL). A fluorescência das amostras (excitação a 282nm e emissão a 331nm) foi avaliada sem adição do cobre (LDL nativa) e ao final do tempo de oxidação para cada condição experimental. Os dados foram expressos em intensidade de fluorescência ao final da oxidação.

3.4.3 Avaliação da alteração molecular da oxidação da LDL por Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier (FTIR)

Para analisar as modificações induzidas pela oxidação da LDL as amostras da oxidação descritas no item 3.4, na ausência ou presença do extrato bruto, da fração acetato de etila e da quercetina na concentração de 2,0 µg/mL, foram submetidas ao espectro de FTIR. Analisamos as regiões com espectro eletromagnético entre 4000 cm⁻¹ e 400 cm⁻¹ (ATR/ FTIR Vertex 70; Bruker, Ettlingen, Germany). Esta técnica permite identificar com grande acurácia as terminações C-H, O-H e N-H de proteínas, a composição lipídica e compostos glicídicos (MAMARELIS et al., 2010). Para a aquisição do espectro foram utilizados 1 µL de cada amostras com uma secagem de 2 minutos. A aquisição dos espectros foi realizada em temperatura controlada (22 ± 2°C)

e espectros de referência (background) foram removidos de cada amostra, para garantir a qualidade do espectro em relação à variação de CO₂, vapores de água presentes na análise e possível variação na linha de base. Cada espectro foi obtido com resolução de 4 cm⁻¹, por meio de 32 varreduras.

3.5 Ensaio de glicação da LDL

A formação de produtos avançados de glicação foi feita através da glicação da LDL com metilglioxal. A LDL 190 µg proteína/mL mais o metilglioxal (MGO), 5 mM, foram incubados por 72 horas a 37 °C em meio contendo tampão fosfato 20 mM, pH 7.4 e o extrato bruto, fração acetato de etila e quercetina na concentração 100 µg/mL. Para o controle positivo e negativo foi utilizada a presença ou ausência, de MGO como agente glicante. Após o tempo de incubação a fluorescência das amostras foram analisadas no espectrofluorímetro. A leitura foi feita a 340 nm de excitação e 380 nm de emissão. Resultados expressos em unidades de fluorescência.

3.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o método de análise de variância (ANOVA). Para as análises de múltiplas comparações foi utilizado o teste de Turkey's. O programa GraphPad Prism versão 8.0 foi utilizado para a confecção dos gráficos e análises estatísticas. Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da oxidação da LDL *in vitro* com diferentes concentrações do extrato de *Annona crassiflora* Mart..

O extrato e a fração acetato de etila retardam a formação de dienos conjugados na oxidação da LDL induzida por Cu(II), aumentando o tempo de resistência à oxidação (T-Lag), de maneira dependente da concentração (0,5, 1,0 e 2,0 µg/mL). Como mostrado na (**Figura 4A**), na concentração de 0,5 µg/mL a quercetina houve maior tempo de resistência à oxidação comparada ao controle negativo. Já na (**Figura 4B**), na concentração de 1,0 µg/mL a fração acetato de etila exibiu o mesmo perfil de resistência da quercetina comparados ao controle negativo. Por fim na (**Figura 4C**), ambos os tratamentos mostraram o mesmo perfil de resistência à oxidação quando comparados ao grupo controle negativo.

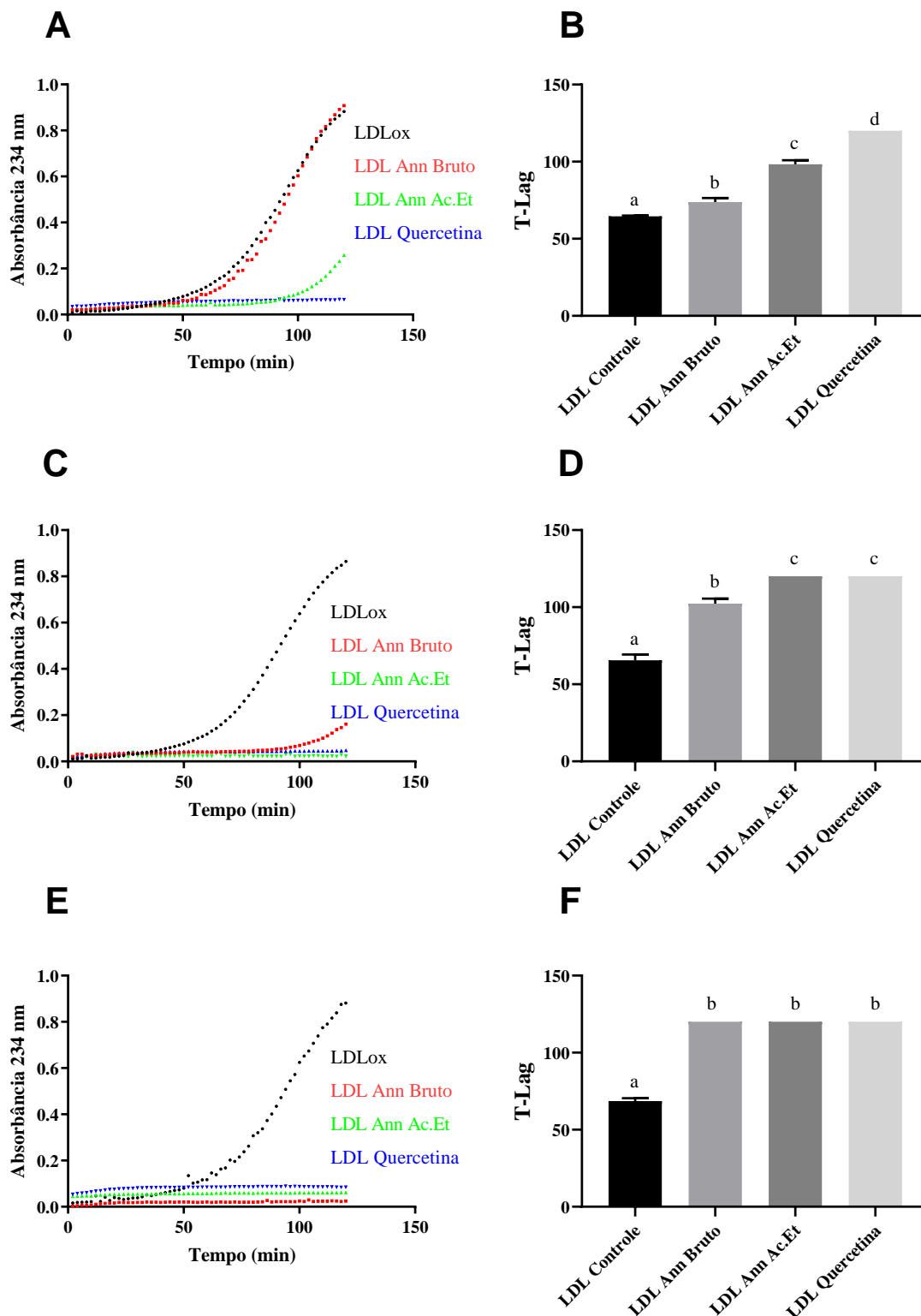


Figura 4. Efeito do extrato bruto e sua fração acetato de etila na formação de dienos conjugados da LDL oxidada, (A) representa a concentração de 0,5 µg/mL, (C) 1,0 µg/mL e (E) 2,0 µg/mL. Efeito do extrato bruto e sua fração acetato de etila nos valores de fase lag para formação de dienos conjugados, (B) representa a concentração de 0,5 µg/mL, (D) 1,0 µg/mL e (F) 2,0 µg/mL. A LDL (100 µg de proteína/mL) foi incubada em meio de reação com CuCl₂ (5µM) por 120 minutos a 37 °C. Valores expressos como média ± desvio padrão. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significantes (p < 0,05).

4.2 Produção de TBARS

A peroxidação lipídica da LDL avaliada pela medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) aumentou com a oxidação da LDL induzida por Cu(II). O extrato bruto, a fração acetato de etila e a quercetina, nas concentrações de (0,5, 1,0 e 2,0 µg/mL), foram eficazes na redução da produção de TBARS, como apresentado na (Figura 5). O tratamento com o extrato bruto mostrou melhor redução da peroxidação lipídica na concentração de 2,0 µg/mL (Figura 5A). Já no tratamento com a fração acetato de etila (Figura 5B) as concentrações não mostraram diferenças significativas entre si. Também foi observado no tratamento com a quercetina (Figura 5C) que as concentrações 1,0 e 2,0 µg/mL mostraram menor produção de TBARS quando comparadas com a concentração de 0,5 µg/mL.

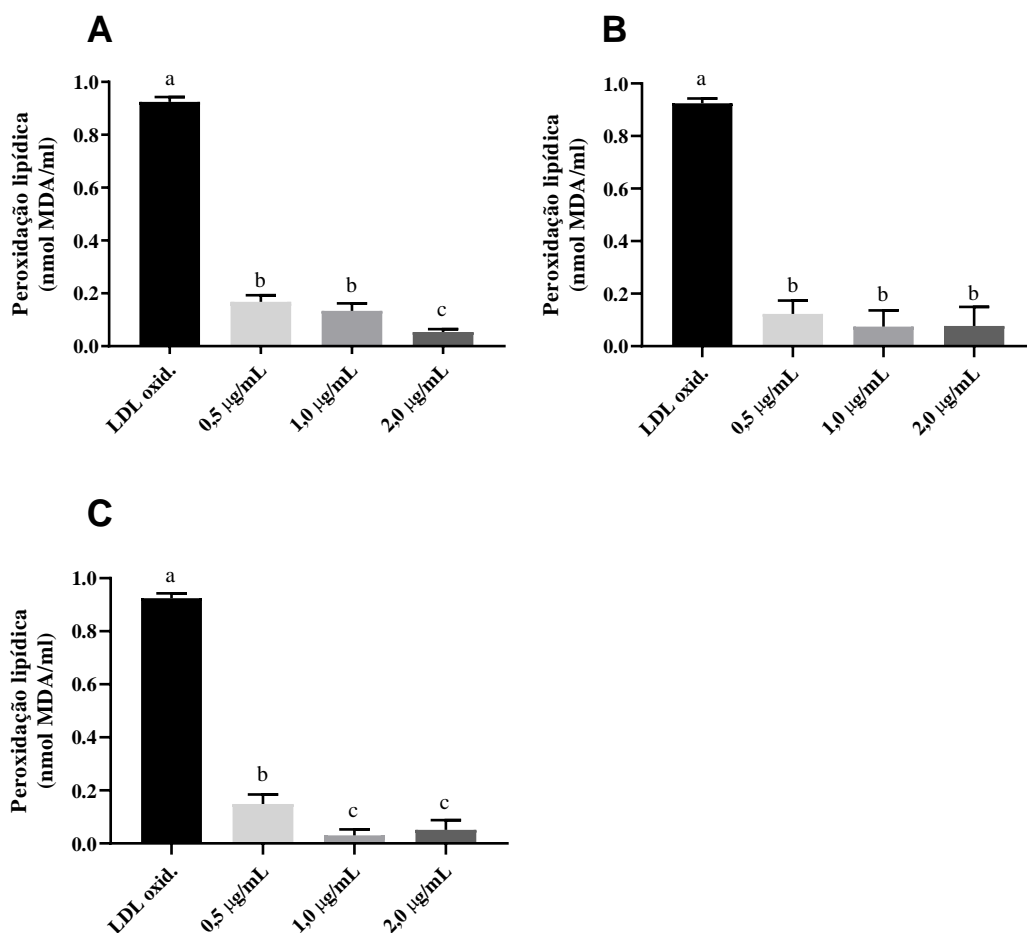


Figura 5. Efeito do extrato bruto (A), fração acetato de etila (B) e da quercetina (C), na produção de TBARS durante a oxidação induzida por CuCl₂ (5 µM). (A) LDL 100 µg proteína/mL foi incubada por 2 horas a 37 °C na presença de CuCl₂ (5 µM) com o extrato bruto. (B) LDL 100 µg proteína/mL foi incubada por 2 horas a 37 °C na presença de CuCl₂ (5 µM) com a fração acetato de etila. (C) LDL 100 µg proteína/mL foi incubada por 2 horas a 37 °C na presença de CuCl₂ (5 µM) com quercetina. Valores expressos como média ± desvio padrão. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significantes (p < 0,05).

4.3 Fluorescência Trp-LDL

Os dados da **Figura 6** mostram como o extrato bruto, a fração acetato de etila e a quercetina foram efetivos na redução da perda de fluorescência do resíduo de triptofano na ApoB-100 da LDL, induzida por CuCl₂. No tratamento com o extrato bruto (**Figura 6A**) as concentrações de 1,0 e 2,0 µg/mL mostraram melhor efeito contra a perda da fluorescência do Trp-LDL do que a concentração de 0,5 µg/mL. Já no tratamento com a fração acetato de etila (**Figura 6B**) as diferentes concentrações não mostram diferenças entre si, mostrando que todas são efetivas no combate a perda da fluorescência. Por fim, no tratamento com a quercetina (**Figura 6C**) as concentrações de 1,0 e 2,0 µg/mL foram mais efetivas contra a perda da fluorescência do Trp-LDL que a concentração 0,5 µg/mL.

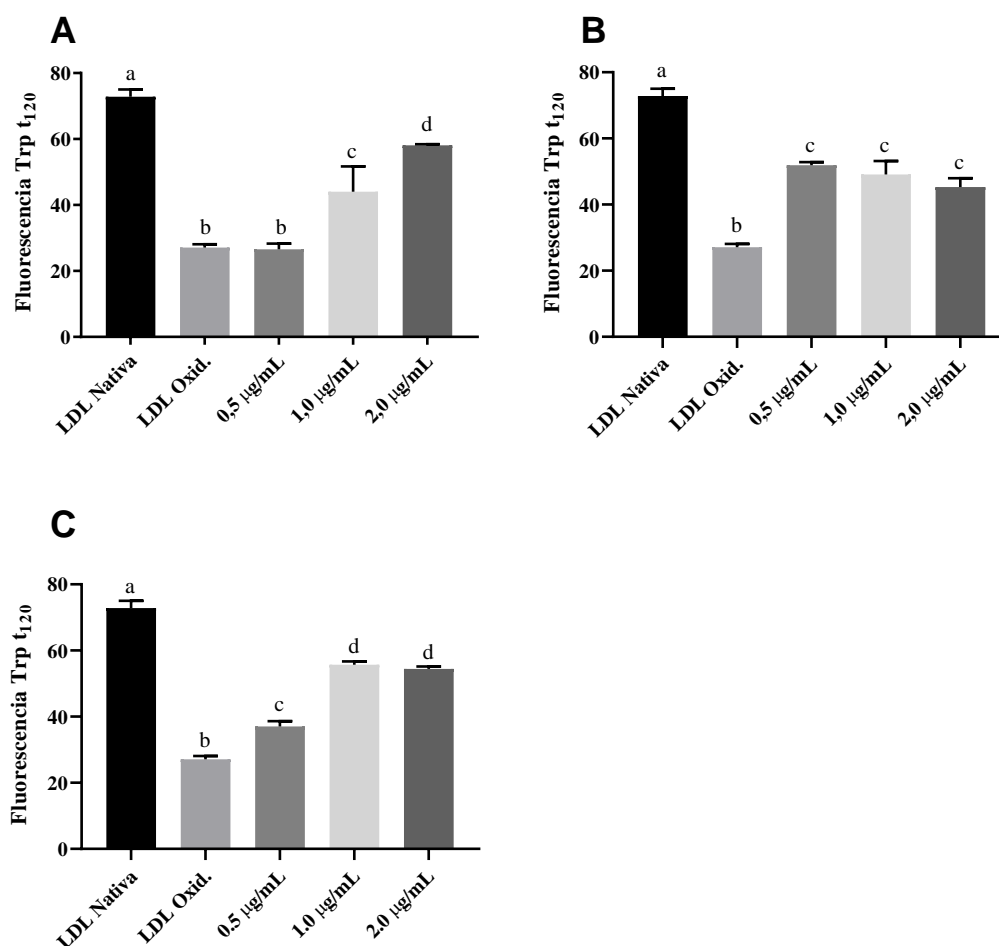
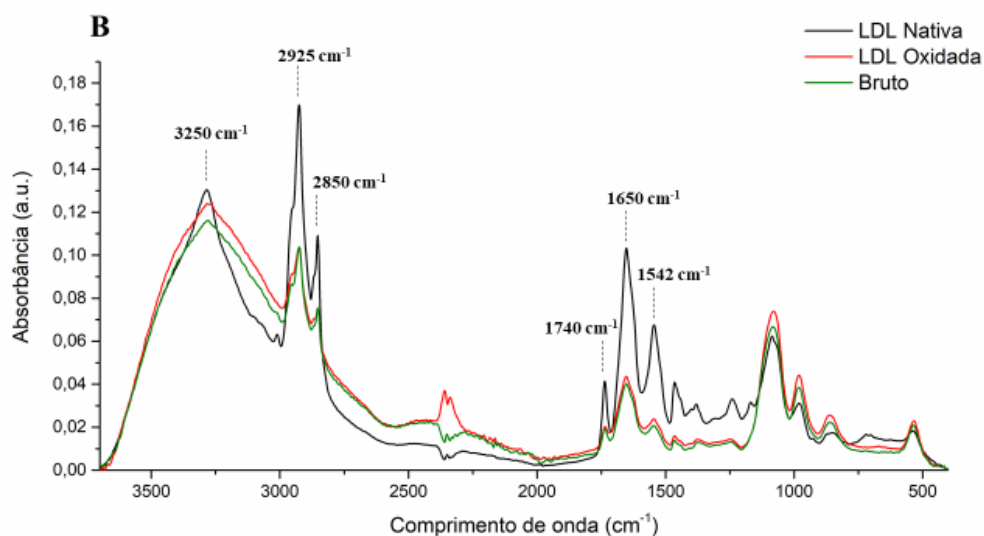
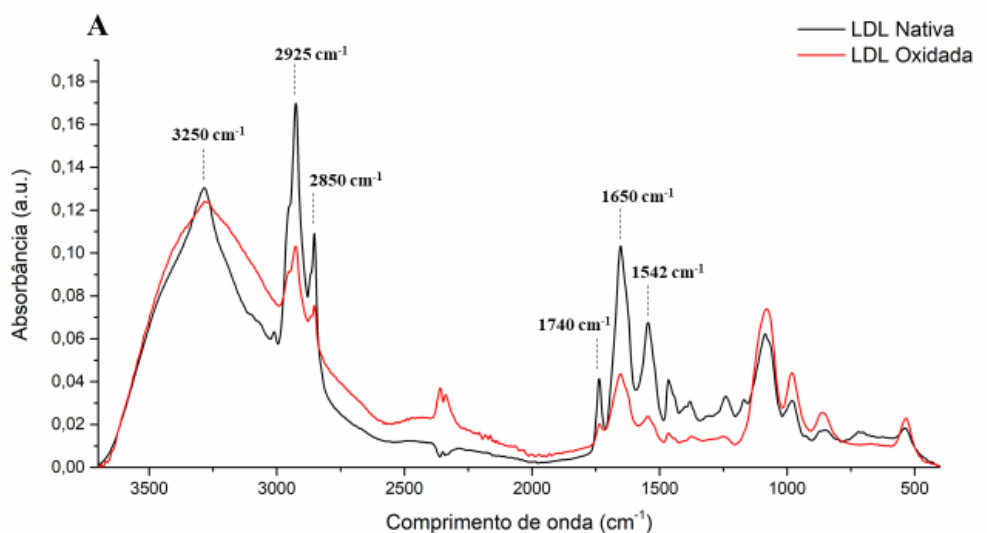


Figura 6. Efeito do extrato bruto, fração acetato de etila e quercetina na fluorescência do Trp na LDL. (A), (B) e (C) Valores de oxidação para a fluorescência do Trp da LDL incubada por 2 horas na presença e ausência do extrato bruto, acetato de etila, quercetina (0,5, 1,0 e 2,0 µg/mL) e CuCl₂ expressos ao final da oxidação (t₁₂₀). Valores expressos como média ± desvio padrão. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significantes (p < 0,05).

4.4 FTIR

Os picos analisados foram 2925 cm^{-1} (CH_2 de lipídeos); 2850 cm^{-1} (C-H de lipídeos e ácidos graxos); 1740 cm^{-1} (lipídeos e fosfolipídeos); 1650 cm^{-1} (amida I) e 1542 cm^{-1} (amida II) da concentração $2,0\text{ }\mu\text{g/mL}$ submetida ao FTIR. A oxidação da LDL diminuiu tanto a intensidade dos picos de lipídeos, quanto os de proteínas em relação a LDL nativa, havendo alguma perda desses compostos na estrutura da LDL decorrente da oxidação (**Figura 7A**). O extrato bruto não foi eficiente em reverter estes parâmetros (**Figura 7B**). Em contrapartida, a fração acetato de etila do extrato aumentou estes picos analisados em comparação com a LDL oxidada (**Figura 7C**), indicando ação de proteção contra o processo oxidativo da LDL. Já a quercetina aumentou levemente a intensidade de 2925 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} (**Figura 7D**).



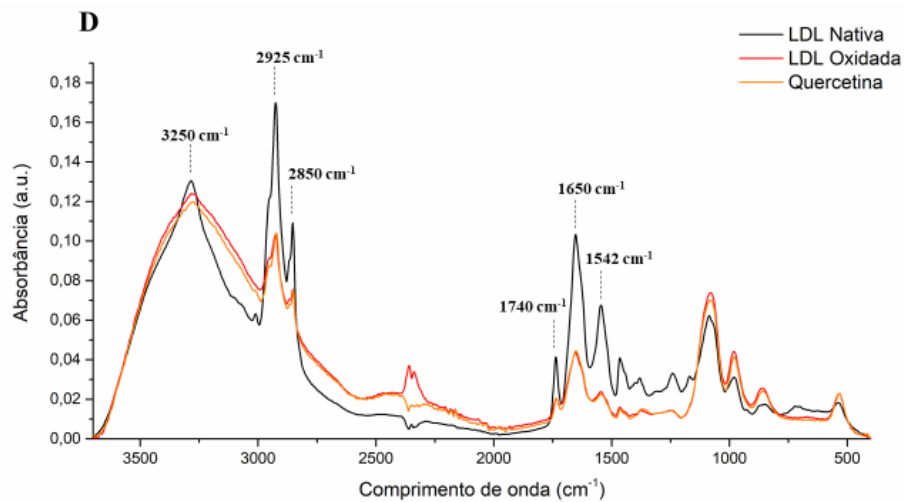
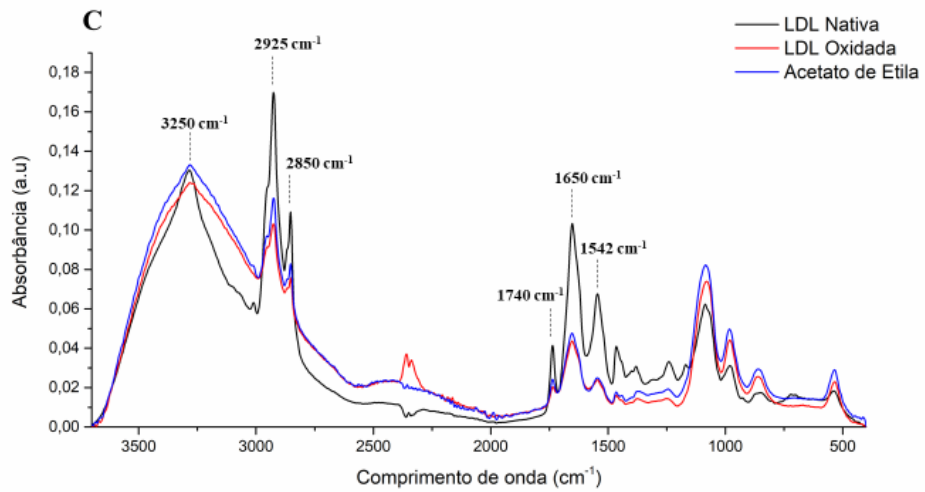


Figura 7. Espectro FTIR de (A) LDL nativa vs LDL oxidada. (B), (C) e (D) LDL nativa, LDL incubada com CuCl_2 ($5 \mu\text{M}$) extrato bruto, acetato de etila e quercetina, respectivamente a $2,0 \mu\text{g/mL}$.

4.5 Formação de produtos avançados de glicação

A exposição da LDL com metilgloxal por 72 horas resultou no aumento dos níveis de fluorescência de produtos avançados de glicação. Os tratamentos não foram efetivos em reduzir os níveis de produtos avançados de glicação da LDL, somente a quercetina mostrou efeito significativo com potencial anti-glicante (**Figura 8**).

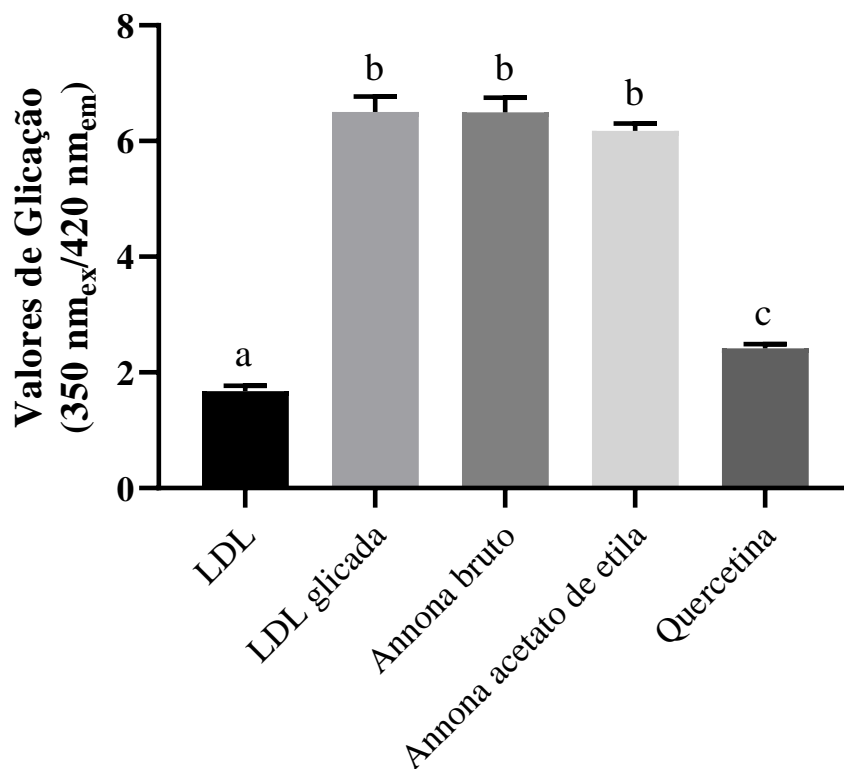


Figura 8. Efeito do extrato bruto, fração acetato de etila e quercetina na formação de produtos avançados de glicação da LDL. Valores de glicação da LDL incubada por 4 dias, a 37 °C na presença e ausência do extrato bruto, acetato de etila, quercetina (100 µg/ml) e CuCl₂ expressos em valores de glicação. Valores expressos como média ± desvio padrão. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

A LDL e suas modificações têm sido amplamente associadas ao desenvolvimento da patogênese da aterosclerose (WITZTUM, 1994; PARTHASARATHY et al., 2010; JEON & BLACKLOW., 2005). É importante ressaltar que as modificações oxidativas e glicativas influenciam fortemente na susceptibilidade da LDL aos eventos da aterosclerose (TORRES et al., 2018).

Para estudar os eventos que podem ocorrer na aterogênese o uso dos íons cobre para induzir a peroxidação da LDL *in vitro* é um método válido sendo a formação de dienos conjugados o mais utilizado para monitorar a oxidação da LDL *in vitro* (GIESEG e ESTERBAUER, 1994). A formação de dienos conjugados é considerada o primeiro evento da cadeia de reação, pois após o início da peroxidação lipídica ocorre um rearranjo nas ligações duplas dos lipídeos, levando a formação dos dienos conjugados (ESTERBAUER et al., 1992). Nos resultados obtidos mostramos que o extrato e a fração foram efetivos em retardar a formação de dienos conjugados durante a oxidação da LDL com efeito dose dependente, claramente observado na análise do aumento da t-Lag, indicando a resistência da LDL a oxidação. Entretanto o tempo de 2 horas de incubação foi insuficiente para definir o tempo de resistência a oxidação dos tratamentos, sendo estes, possivelmente maiores que 2 horas.

A produção das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico é uma ferramenta muito útil para dosar os níveis de malondialdeído (MDA) um produto final da cadeia de reação da peroxidação lipídica (OKHAWA et al., 1979). O extrato e sua fração também foram efetivos na inibição da formação de MDA, a fração mostrou que as diferentes concentrações tiveram efeito semelhante sobre a formação de MDA.

Também foram estudados o efeito do extrato e sua fração na oxidação da fração proteica da LDL pela perda de fluorescência do resíduo de triptofano. O espectro de fluorescência da LDL nativa é centrado em 332nm, que é atribuído aos resíduos de Trp presentes na apo-B100, então a perda de fluorescência do Trp é considerada um marcador de dano oxidativo da LDL (REYFTMANN et al., 1990). O extrato e sua fração preveniram a redução da fluorescência do Trp, causando um aumento no tempo de requerimento para o decréscimo da fluorescência do Trp para o máximo (t_{120}). Os testes mostraram que o extrato e sua fração protegerem o núcleo lipídico e proteico da LDL da oxidação induzida por Cu(II).

Para identificar as regiões específicas da apo-B100 afetadas pela oxidação da LDL com Cu(II) realizamos a análise de FTIR da LDL nativa e da LDLox na presença ou ausência do extrato bruto e da fração acetato de etila da *Annona crassiflora* Mart. As análises foram realizadas nas regiões com modificações de 3500 a 3200 cm^{-1} correspondente à vibração dos grupos hidroxila νOH (MAMARELIS et al., 2010). Os resultados mostrados no nosso estudo indicaram a presença de $\text{HO}\cdot$ em todos os cromatogramas, foi observado no tratamento com a fração, uma ação de proteção contra o processo oxidativo na banda $\text{HO}\cdot$. Como mostrado por ROBERFROID e BUC CALDERON, 1995, sabe-se que o Cu(II) catalisa a produção de $\text{HO}\cdot$ através da reação de Haber-Weiss, então há uma relação do aumento de $\text{HO}\cdot$ e as alterações nas absorções nas regiões 1660 a 1500 cm^{-1} . É possível observar nessas regiões as vibrações de alongamento C = O (1652 cm^{-1} , banda amida I) e flexão N-H (1550 cm^{-1} , banda amida II) do grupo peptídico em apo-B100. Somente a fração acetato de etila foi eficaz e aumentou estes picos em comparação a LDL oxidada, já a quercetina aumentou levemente a intensidade dos picos 2925 cm^{-1} (lipídeos) e 1650 cm^{-1} (amida I). Na LDLox houve uma diminuição notável na região entre 2925 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} de lipídeos e 1660 e 1500 cm^{-1} de amidas, o extrato entretanto não mostrou grande reversão da intensidade das bandas.

Como mostrado por WU et al., 2009 a hiperglicemia aumenta a produção dos produtos avançados de glicação a partir da oxidação e a glicação da LDL. Um trabalho realizado por GHAFARI e MOJAB, 2006 mostrou que a quercetina é um ótimo agente antiglicante e que outros flavonóides também podem ser usados para inibir a formação de produtos avançados de glicação e, conseqüentemente, prevenir o dano a LDL causado pela hiperglicemia. A glicação proteica mediada por glicose pode ocorrer tanto em condições oxidativas quanto em não oxidativas (JAIRAJPURI et al., 2015). O metilglioxal induz reações de glicação não oxidativa, apresentando uma vantagem em relação a glicação induzida por glicose, o que permite identificar agentes antiglicantes que atuam independente do seu potencial antioxidante (RABBANI et al., 2011). Este fato demonstrou que o papel protetivo do extrato bruto e a fração acetato de etila sobre a LDL não envolviam atividades antiglicantes.

Estudos mostram que o uso dos antioxidantes naturais são uma terapia alternativa para a aterogênese e demonstram também que estes inibem a formação de LDL oxidada e a progressão da aterosclerose (KIOKIAS et al., 2018; TSUI et al., 2018).

Além disso, diversos estudos *in vitro* com diferentes plantas mostram que o principal grupo de compostos naturais que retardam a oxidação da LDL são os polifenóis (PATEL et al., 2018; FANG et al., 2014; dos SANTOS et al., 2018). Desta forma os compostos polifenólicos têm sido escolhidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórios e anti-aterogênicos (FUHRMAN e AVIRAM., 2001; TASNEEM et al., 2018). Dentre polifenóis mais estudados com potencial antiaterogênico estão os flavonoides, os ácidos fenólicos as lignanas e os estilbenos, estes exibem grande potencial de inibição glicativa e oxidativa da LDL (LUTZ et al., 2019). Como demonstrado por ALISSON et al., 2016 o extrato etanólico e a fração acetato de etila da casca do fruto do *Araticum* apresentam altas concentrações de flavonoides (kaempferol e quercetina) e proantocianidinas; tais compostos podem explicar os excelentes resultados obtidos no presente estudo.

6 CONCLUSÃO

O extrato bruto e a fração acetato de etila da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart., inibiram a susceptibilidade da oxidação da LDL *in vitro* não tendo efeito na inibição da glicação. Tais dados reforçam a capacidade antioxidante do extrato e da fração acetato de etila e o potencial efeito na inibição da aterosclerose. Estudos complementares são necessários para avaliar os efeitos do extrato e da fração sobre a internalização da LDL oxidada por Macrófagos *in vitro* e formação da lesão aterosclerótica *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS

ARRUDA, Henrique Silvano; PEREIRA, Gustavo Araujo; MORAIS, Damila Rodrigues de; EBERLIN, Marcos Nogueira; PASTORE, Glaucia Maria. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, p. 738-749, abr. 2018.

BENJAMIN, Emelia J. et al.. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, p.67-492, 20 mar. 2018.

BHASKAR, Shobha; SHALINI, V.; HELEN, A. Quercetin regulates oxidized LDL induced inflammatory changes in human PBMCs by modulating the TLR-NF- κ B signaling pathway. **Immunobiology**, v. 216, n. 3, p.367-373, mar. 2011.

CHEN, C; MILBURY, P; CHUNG, S; BLUMBERG, J. Effect of almond skin polyphenolics and quercetin on human LDL and apolipoprotein B-100 oxidation and conformation. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 12, p. 785-794, dez. 2007.

CHUNG, Byung H. et al.. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. **Methods In Enzymology**, p.181-209, 1986.

EPSTEIN, Franklin H. et al.. Beyond Cholesterol. **New England Journal Of Medicine**, v. 320, n. 14, p.915-924, 6 abr. 1989.

ESTERBAUER, Hermann et al.. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 13, n. 4, p.341-390, out. 1992.

FALK, Erling et al.. Pathogenesis of Atherosclerosis. **Journal Of The American College Of Cardiology**, v. 47, n. 8, p.7-12, abr. 2006

FANG, Yongqi et al.. Ethanol extract of propolis protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury by inhibiting lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1-mediated oxidative stress. **Experimental Biology And Medicine**, v. 239, n. 12, p.1678-1687, 24 jun. 2014.

Florkowski C. HbA1c as a Diagnostic Test for Diabetes Mellitus - Reviewing the Evidence. **The Clinical biochemist. Reviews**, v.34,2, p.75–83, ago. 2013.

FUHRMAN, Bianca; AVIRAM, Michael. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Current Opinion In Lipidology**, v. 12, n. 1, p.41-48, fev. 2001.

Ghaffari, M.A. and Mojab, S. Influence of flavonols as in vitro on low density lipoprotein glycation. **Iranian Biomedical Journal**, v.11, p.185- 91, 2007.

Giese, S.P., Esterbauer, H. Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. **FEBS Letters**. V.343, p.188–194, 1994.

GIEBAUF, Andreas; STEINER, Ernst; ESTERBAUER, Hermann. Early destruction of tryptophan residues of apolipoprotein B is a vitamin E-independent process during

copper-mediated oxidation of LDL. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Lipids And Lipid Metabolism**, v. 1256, n. 2, p.221-232, maio 1995.

GKOGKOLOU, Paraskevi; BÖHM, Markus. Advanced glycation end products. **Dermato-endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 259-270, jul. 2012.

GLASS, Christopher K.; WITZTUM, Joseph L.. Atherosclerosis. **Cell**, v. 104, n. 4, p.503-516, fev. 2001.

GUNATHILAKE, K.d. Prasanna P.; RUPASINGHE, H.p. Vasantha. Inhibition of Human Low-Density Lipoprotein Oxidation In Vitro by Ginger Extracts. **Journal Of Medicinal Food**, v. 17, n. 4, p. 424-431, abr. 2014.

HANSSON, G. K. et al.. Inflammation and plaque vulnerability. **Journal Of Internal Medicine**, v. 278, n. 5, p.483-493, 11 ago. 2015.

HEVONOJA, Tiia; PENTIKÄINEN, Markku O; HYVÖNEN, Marja T; KOVANEN, Petri T; ALA-KORPELA, Mika. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified ldl: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, v. 1488, n. 3, p. 189-210, nov. 2000.

JAIRAJPURI, D. S.; FATIMA, S.; JAIRAJPURI, Z. S.. Glycation Induced Physicochemical Changes in Low-Density Lipoprotein and Its Role in Promoting Cholesterol Accumulation in Macrophages along with Antiglycation Effect of Aminoguanidine. **Advances In Biological Chemistry**, v. 05, n. 05, p. 203-214, 2015.

JEON, Hyesung; BLACKLOW, Stephen C. STRUCTURE AND PHYSIOLOGIC FUNCTION OF THE LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR. **Annual Review Of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p.535-562, jun. 2005.

JUSTINO, Allisson B. et al.. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart..) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p.167-182, dez. 2016.

JUSTINO, Allisson B.; FRANCO, Rodrigo R.; SILVA, Heitor C. G.; SARAIVA, André L.; SOUSA, Raquel M. F.; ESPINDOLA, Foued S. B procyanidins of *Annona crassiflora* fruit peel inhibited glycation, lipid peroxidation and protein-bound carbonyls, with protective effects on glycated catalase. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19183, dez. 2019.

JUSTINO, Allisson Benatti et al.. Hepatoprotective Properties of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* Mart.. Fruit Peel against Diabetes-Induced Oxidative and Nitrosative Stress. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 65, n. 22, p. 4428-4438, 25 maio 2017.

JUSTINO, Allisson Benatti et al.. Protective effects of a polyphenol-enriched fraction of the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart.. on acute and persistent inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, p. 1-13, 16 dez. 2019.

JUSTINO, Allisson Benatti et al.. Stephalagine, an aporphine alkaloid from *Annona crassiflora* fruit peel, induces antinociceptive effects by TRPA1 and TRPV1 channels modulation in mice. **Bioorganic Chemistry**, v. 96, p. 103562, mar. 2020.

KATTOOR, Ajoe John et al.. Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 19, n. 11, p.1-11, 18 set. 2017.

KETELHUTH, Daniel; HANSSON, Göran. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: Break of tolerance in the artery wall. **Thrombosis And Haemostasis**, v. 106, n. 11, p.779-786, 2011.

KIM, Jae-Yong; LEE, Jung Woo; LEE, Jin Soo; JANG, Dae Sik; SHIM, Sang Hee. Inhibitory effects of compounds isolated from roots of *Cynanchum wilfordii* on oxidation and glycation of human low-density lipoprotein (LDL). **Journal Of Functional Foods**, v. 59, p. 281-290, ago. 2019.

KIM, Jae-Yong; SHIM, Sang Hee. Anti-Atherosclerotic Effects of Fruits of *Vitex rotundifolia* and Their Isolated Compounds via Inhibition of Human LDL and HDL Oxidation. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 727-744, 12 nov. 2019.

KIOKIAS, Sotirios; PROESTOS, Charalampos; OREOPOULOU, Vassilki. Effect of Natural Food Antioxidants against LDL and DNA Oxidative Changes. **Antioxidants**, v. 7, n. 10, p.1-20, 3 out. 2018.

LAM, Henry S.; PROCTOR, Andrew; NYALALA, John; MORRIS, Manford D.; SMITH, W. Grady. Fourier transform infrared spectroscopy evaluation of low density lipoprotein oxidation in the presence of quercetin, catechin, and α -tocopherol. **Lipids**, v. 40, n. 6, p. 569-574, jun. 2005.

LUTZ, Mariane; FUENTES, Eduardo; ÁVILA, Felipe; ALARCÓN, Marcelo; PALOMO, Iván. Roles of Phenolic Compounds in the Reduction of Risk Factors of Cardiovascular Diseases. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 366, 21 jan. 2019.

LYONS, T. J. et al.. Glycosylation of low density lipoprotein in patients with Type I (insulin-dependent) diabetes: Correlations with other parameters of glycaemic control. **Diabetologia**, v. 29, n. 10, p.685-689, out. 1986.

MAMARELIS, I. et al.. Oxidative stress and atherogenesis an FT-IR spectroscopic study. **In Vivo**. v.24, p.883-888, 2010.

MESQUITA, Mariana Laundry de; DESRIVOT, Julie; BORIES; FOURNET, Alain; PAULA, José Elias de; GRELLIER, Philippe; ESPINDOLA, Laila Salmen. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, nov. 2005.

MOORE, Kathryn J.; FREEMAN, Mason W. Scavenger Receptors in Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, v. 26, n. 8, p.1702-1711, ago. 2006.

MOURA, Francielle de; JUSTINO, Allisson; FERREIRA, Bruno; ESPINDOLA, Foued; ARAÚJO, Fernanda; TOMIOSSO, Tatiana. Pro-Fibrogenic and Anti-Inflammatory Potential of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* in Skin Repair. **Planta Medica**, v. 85, n. 07, p. 570-577, 20 set. 2018.

NOWOTNY, Kerstin; JUNG, Tobias; HÖHN, Annika; WEBER, Daniela; GRUNE, Tilman. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 194-222, 16 mar. 2015.

ODJAKOVA, Mariela; POPOVA, Eva; AL, Merilin; MIRONOV, Roumyana. Plant-Derived Agents with Anti-Glycation Activity. **Glycosylation**, v. 10, n. 10, p. 223-256, 26 set. 2012.

OHKAWA, Hiroshi; OHISHI, Nobuko; YAGI, Kunio. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p.351-358, jun. 1979.

PARTHASARATHY, Sampath et al.. Oxidized Low-Density Lipoprotein. **Methods In Molecular Biology**, p.403-417, 25 nov. 2009.

PATEL, Rahul V. et al.. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 155, p.889-904, jul. 2018.

PEREIRA, Mariana Nunes; JUSTINO, Allisson Benatti; MARTINS, Mário Machado; PEIXOTO, Leonardo Gomes; VILELA, Danielle Diniz; SANTOS, Paula Souza; TEIXEIRA, Thaise Lara; SILVA, Cláudio Vieira da; GOULART, Luiz Ricardo; PIVATTO, Marcos. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart.. **Industrial Crops And Products**, v. 97, p. 324-329, mar. 2017.

PRASSL, Ruth; LAGGNER, Peter. Lipoprotein Structure and Dynamics: Low Density Lipoprotein Viewed as a Highly Dynamic and Flexible Nanoparticle. **Lipoproteins - Role In Health And Diseases**, p.3-20, 3 out. 2012.

RABBANI, N.; GODFREY, L.; XUE, M.; SHAHEEN, F.; GEOFFRION, M.; MILNE, R.; THORNALLEY, P. J.. Glycation of LDL by Methylglyoxal Increases Arterial Atherogenicity: a possible contributor to increased risk of cardiovascular disease in diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 7, p. 1973-1980, 26 maio 2011.

REIS, Samuel Cavalcante. Uma revisão bibliográfica sobre aterosclerose. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 3, p.1-6, 4 fev. 2019.

REYFTMANN, Jean-philippe et al.. Sensitivity of tryptophan and related compounds to oxidation induced by lipid autooxidation. Application to human serum low- and high-density lipoproteins. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Lipids And Lipid Metabolism**, v. 1042, n. 2, p.159-167, fev. 1990.

RICE-EVANS, Catherine A. et al.. The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, n. 4, p.375-383, jan. 1995.

RICE-EVANS, Catherine A.; MILLER, Nicholas J.; PAGANGA, George. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 20, n. 7, p.933-956, jan. 1996.

Roberfroid, M., Buc Calderon, P. Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems. **Marcel Dekker Inc**, New York, 1995.

ROSS, Russell et al.. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. **New England Journal Of Medicine**, v. 340, n. 2, p.115-126, 14 jan. 1999.

SADOWSKA-BARTOSZ, Izabela; BARTOSZ, Grzegorz. Prevention of Protein Glycation by Natural Compounds. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 3309-3334, 16 fev. 2015.

SANTHAKUMAR, Abishek B.; BATTINO, Maurizio; ALVAREZ-SUAREZ, José M.. Dietary polyphenols: structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. **Food And Chemical Toxicology**, v. 113, p. 49-65, mar. 2018.

- SANTOS, Matheus M. dos et al.. Syzygium cumini leaf extract inhibits LDL oxidation, but does not protect the lipoprotein from glycation. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 210, p.69-79, jan. 2018.
- SKILTON, M. R. Intrauterine Risk Factors for Precocious Atherosclerosis. **Pediatrics**, v. 121, n. 3, p.570-574, 1 mar. 2008.
- STEINBERG, Daniel; WITZTUM, Joseph L. Is the Oxidative Modification Hypothesis Relevant to Human Atherosclerosis? **Circulation**, v. 105, n. 17, p.2107-2111, 30 abr. 2002.
- TASNEEM, Shumaila et al.. Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, v. 139, p.126-140, jan. 2019.
- TORRES, Natália M. P. de O. et al.. The Chemistry of Advanced Glycation End-products. **Revista Virtual de Química**, p.375-392, 2018.
- TSUI, Pi-fen et al.. Spices and Atherosclerosis. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p.1-19, 10 nov. 2018.
- VILAR, Jb.; FERRI, Ph.; CHEN-CHEN, L. Genotoxicity investigation of araticum(*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. **Brazilian Journal Of Biology**, v. 71, n. 1, p. 197-202, fev. 2011.
- WITZTUM, J.I. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **The Lancet**, v. 344, n. 8925, p.793-795, set. 1994.
- WU, Chi-Hao; LIN, Jer-An; HSIEH, Wen-Ching; YEN, Gow-Chin. Low-Density-Lipoprotein (LDL)-Bound Flavonoids Increase the Resistance of LDL to Oxidation and Glycation under Pathophysiological Concentrations of Glucose in Vitro. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 5058-5064, 10 jun. 2009.
- YEH, Wan-Ju; HSIA, Shih-Min; LEE, Wei-Hwa; WU, Chi-Hao. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: a review of recent findings. **Journal Of Food And Drug Analysis**, v. 25, n. 1, p. 84-92, jan. 2017.
- YOSHIDA, Hiroshi; KISUGI, Reiko. Mechanisms of LDL oxidation. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23-24, p.1875-1882, dez. 2010.