



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências a Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal



Investigação de metabólitos com ação anti-amiloide pancreática em
espécies de *Lippia* (Verbenaceae) por LC-MS/MS

Mestranda: Thamirys Silva da Fonseca

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Suzana Guimarães Leitão

Rio de Janeiro

2023

Investigação de metabólitos com ação anti-amiloide pancreática em espécies de
Lippia (Verbenaceae) por LC-MS/MS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (PBV) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Mestranda: Thamirys Silva da Fonseca

Orientadora: Prof.^a Dr^a Suzana Guimarães Leitão

CIP - Catalogação na Publicação

S676i Silva da Fonseca, Thamirys
Investigação de metabólitos com ação anti-amiloide pancreática em espécies de Lippia (Verbenaceae) por LC-MS/MS / Thamirys Silva da Fonseca. -- Rio de Janeiro, 2023.
100 f.

Orientadora: Suzana Guimaraes Leitão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saude, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, 2023.

1. amilina. 2. diabetes. 3. L. organoides. 4. fenólicos. 5. flavonoides. I. Guimaraes Leitão, Suzana, orient. II. Título.

Investigação de Metabólitos com ação anti-amiloide pancreática em espécies de
Lippia (Verbenaceae) por LC-MS/MS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (PBV) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal.



Prof. Dr. Leandro Machado Rocha
Universidade Federal Fluminense – UFF



Profª. Drª. Ivana Correa Leal
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



Profª. Drª. Michelle Frazão Muzitano
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



Profª. Drª. Suzana Guimarães Leitão
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Rio de Janeiro, 23 de março de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo sustento e direção que permite continuar mesmo com incertezas e medos.

Agradeço à minha família. Todas as minhas conquistas só são possíveis por tê-los em minha vida, possuo infinitos motivos para agradecê-los. Particularmente, à minha mãe Luciane por aceitar participar das mais diversas aventuras como pesar extratos em pleno 2020 e em tantas outras idas ao Fundão, apenas para garantir que eu pudesse fazer o que era necessário, mas com segurança. Não posso deixar de destacar Márcia, Bruno, Clara, Benício e Theo que são minha família, ouvidos para reclamações e fonte de palavras doces e aconselhadoras. Vocês são fundamentais para minha vida.

Agradeço, especialmente, à Professora Suzana G. Leitão, Tia Su para muitos e mamãe para nós. Quando cheguei ao laboratório procurando um estágio de iniciação científica em 2016, não imaginava o quanto minha vida seria mudada. A senhora me apresentou a Farmacognosia, a importância da pesquisa e ciência brasileira, me fez descobrir habilidades e gostos que eu sequer sabia. Muito obrigada pelo carinho, cuidado, confiança e conselhos. Me orgulho muito de ser sua aluna e espero ser uma pesquisadora tão competente e inspiradora quanto a senhora.

Agradeço ao Professor Luís Maurício T.R. Lima pela parceria. Obrigada pelo ensino compartilhado.

Agradeço à professora Gilda G. Leitão, que me acolheu há tanto tempo nesse mundo da Cromatografia Contracorrente. Prometo que sempre teremos café.

À amada Professora Rosineide C. Simas, a nossa Rosy, que muda a vida de todos com quem se encontra. Obrigada por tanta ajuda, realizações e conselhos. A mulher de rosto tão sério que me assustou no início, mas se revelou a pessoa mais doce e acolhedora que já conheci. A senhora está presente desde a minha primeira viagem de avião à definição de escolhas importantes. Não irei esquecer seus ensinamentos e prometo continuar tentando ser tão compreensiva quanto você.

À família do Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia – LabFitoFar, por todo o companheirismo não apenas na vida acadêmica, mas em todos os aspectos. Simony, Brendo e Marcos, obrigada pelas risadas, conselhos, café, lanches e tudo mais. Sempre estarei torcendo pela alegria e conquistas de vocês em todas as áreas. Trabalhar com vocês é animador, sempre proporciona novos conhecimentos e o apoio de vocês é fundamental. Admiro muito a postura, a disposição em fazer tantas coisas e espero que possamos continuar um colaborando com o

outro. Obrigada pelas ajudas com as análises, por sempre serem meus revisores e por tanto mais que fazem por mim. Ray, obrigada por tanta ajuda e ser tão solícita. Você é minha vegana favorita. Aline, obrigada por ser a nosso ponto de calma mesmo que não acredite. Mari, obrigada por ter acompanhado as análises iniciais e sempre responder tantas dúvidas minhas. É sempre uma honra passar perrengue contigo. Diégina e Evelyn, é muito bom ter vocês no grupo. A dedicação de vocês é inspiradora. Um agradecimento especial a todos os alunos de iniciação científica do laboratório. Sem dúvida, vocês são fonte de alegria. Espero que possamos seguir em uma ótima troca de ensinamentos e conselhos. E não poderia deixar de agradecer aos pequenos que são parte desta família: Caio, Davi, Nina e Catarina. Prometo sempre ter pipetas de plástico para brincar de cientistas com vocês. Existe um pedacinho de cada um não apenas neste trabalho, mas na minha formação como pessoa.

Às minhas amigas Brenda, Darlene, Rebeca, Fernanda, Thainá e Lilia. Nossa ligação iniciou no ensino médio, tanta coisa já passou e mudou, mas não consigo me imaginar sem compartilhar as vitórias e derrotas com vocês. Tenho muito orgulho das mulheres que são. Raphaela, obrigada por ser a amiga da casa com piscina. Obrigada pelas risadas, por sempre me ajudar a relaxar mesmo sem saber e por tanto mais que faz por mim, muitas vezes, sem se dar conta.

Marcela e Camila, ou melhor, Pan e Milla. Obrigada por, mesmo em outros estados, sempre serem aquelas dispostas a ouvir e apoiar mesmo sem entender o que estou falando. Jamais poderia imaginar criar um elo tão poderoso apenas por um gosto em comum. E assim, espero que possamos seguir. Compartilhando nossas vidas, podendo sempre contar umas com as outras.

Agradeço a toda a equipe de docentes e servidores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, bem como aos colegas do curso, por todo auxílio e ensinamentos passados durante toda a minha formação. Minha entrada no programa foi rodeada de incertezas, com os efeitos da pandemia, as terríveis ondas de aumento de casos que sempre retornavam e um governo que desprezava a ciência. Mesmo assim, nunca vi nenhum membro do programa esmorecer e isso se reflete nas conquistas alcançadas por todos os membros.

Agradeço à banca examinadora por aceitar o convite, de forma tão rápida e entusiasmada, para participar deste momento tão importante para mim e minha orientadora.

Por último e não menos importante, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES e também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ, pelas bolsas concedidas e financiamento desta pesquisa.

RESUMO

Fonseca, Thamirys Silva. Investigação de Metabólitos com ação anti-amiloide pancreática em espécies de *Lippia* (Verbenaceae) por LC-MS/MS. Rio de Janeiro, 2023. Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, 2023.

O gênero *Lippia* apresenta-se amplamente distribuído nas Américas, com destaque para o Brasil, e apresenta diversas espécies empregadas tradicionalmente para fins medicinais. A presença de agregados amiloides está correlacionada à graves patologias, como a diabetes, onde há presença de depósitos de amilina nas ilhotas pancreáticas de 90% dos pacientes com diabetes mellitus tipo 2. A amilina é um produto secretório das células β pancreáticas, cossintetizado e cossecretado com a insulina. A inibição desta via amiloidogênica é importante fator para retardar o avanço do quadro patológico, além dos benefícios na homeostase glicêmica devido à ação fisiológica da amilina. Com isso, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade inibitória da amilina humana por extratos de espécies do gênero *Lippia* e investigar o perfil químico dos mesmos, buscando melhor compressão da atividade observada. Os ensaios de fibrilação amiloide indicaram melhor perfil de inibição pelos extratos em etanol, diclorometano e acetato de etila. O extrato etanólico de *L. organoides* promoveu estabilização da amilina na fase inicial da agregação, apresentando sinal de fluorescência inferior ao encontrado para a curcumina, utilizada como controle positivo. Os resultados obtidos para os diversos extratos de *Lippia* estão ligados a diferenças em suas composições químicas. A presença de flavonoides tais como as agliconas genkwanina, naringenina e pinocembrina no extrato mais ativo, indica a importância de substâncias fenólicas e hidroxiladas para a interação com a amilina, estabilizando-a em sua forma monomérica. Flavonoides C-glicosilados e fenilpropanoides glicosilados também podem estar influenciando a atividade observada. Dessa forma, foi demonstrado que espécies do gênero *Lippia* se caracterizam como possível fonte de substâncias fenólicas com ação anti-amiloide pancreática podendo ser empregadas para estabilização da amilina humana.

Palavras-chave: amilina, diabetes, *L. organoides*, fenólicos, flavonoides.

ABSTRACT

Fonseca, Thamirys Silva. Investigação de Metabólitos com ação anti-amiloide pancreática em espécies de *Lippia* (Verbenaceae) por LC-MS/MS. Rio de Janeiro, 2023. Dissertação – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, 2023.

The genus *Lippia* is widely distributed in the Americas, with emphasis on Brazil, with several species traditionally employed for medicinal purposes. The presence of amyloid aggregates is correlated with severe pathologies, such as diabetes, where amylin deposits are present in the pancreatic islets of 90% of patients with type 2 diabetes mellitus. Amylin is a secretory product of pancreatic β cells, co-synthesized and co-secreted with insulin. The inhibition of this amyloidogenic pathway is an important factor to slow the progress of the pathological condition, in addition to the benefits in glycemic homeostasis due to the physiological action of amylin. Thus, the objective of this work is to evaluate the inhibitory activity of human amylin by extracts of species of the genus *Lippia*, assess the chemical profile of the extracts employed and seek better comprehension of the observed activity. Amyloid fibrillation tests indicated a better inhibition profile from ethanol, dichloromethane, and ethyl acetate extracts. The ethanolic extract of *L. origanoides* promoted stabilization of amylin in the initial phase of aggregation, presenting a lower fluorescence signal than that found in curcumin, used as a positive control. The difference between the results obtained for the various extracts of *Lippia* are linked to differences in their chemical compositions. The presence of flavonoids such as genkwanin, naringenin, and pinocembrine in the most active extract, indicates the importance of phenolic and hydroxylated substances for the interaction with amylin, stabilizing it in its monomeric form. C-glycosylated flavonoids and glycosylated phenylpropanoids may also be influencing this activity. Therefore, we conclude that species of the genus *Lippia* can be characterized as an important source of phenolic substances with amyloid inhibition and may be used for human amylin stabilization.

Palavras-chave: amylin, diabetes, *L. origanoides*, phenolic, flavonoid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Amiloides no ser humano: fisiológico e patológico. Adaptado de STROO et al., 2017.	17
Figura 2 - Sequências de aminoácido da amilina em diferentes mamíferos.	20
Figura 3 - Efeitos fisiológicos e propostas de vias de ação da amilina. Adaptado de RAIMUNDO et al., 2020 e MATHIESEN et al., 2022.....	21
Figura 4 - Linha do tempo da descoberta da amilina.	22
Figura 5 - Representação do processo de agregação amiloide (adaptado de RALEIGH et al., 2017).....	23
Figura 6 - Mecanismos de toxicidade dos agregados amiloides. Adaptado de MARMENTINI et al., 2022.	25
Figura 7 - Ocorrência da diabetes no mundo (adaptado de IDF, 2021).	28
Figura 8 - Sequência de aminoácidos do pramlintida e da amilina humana	31
Figura 9 - Substâncias com atividade na inibição da fibrilação de amilina humana.....	33
Figura 10 - Fenilpropanoides isolados de <i>L. lucidus</i> : A - schizotenuiuna A , B - ácido licopico A , C - ácido licópico B	34
Figura 11 - Distribuição do gênero <i>Lippia</i> pelo mundo: ocorrência na América Central, do Sul e do Norte, África, regiões da Europa, Ásia e Oceania.....	37
Figura 12 - Distribuição de <i>L. aristata</i> pelo mundo e no Brasil: A – ocorrência de <i>L. aristata</i> nos países: Bolívia e Brasil, B – ocorrência no território brasileiro.....	38
Figura 13 - Distribuição de <i>L. brasiliensis</i> e <i>L. rubella</i> no Brasil: A – mapa de ocorrência de <i>L. brasiliensis</i> no Brasil; B – mapa de ocorrência de <i>L. rubella</i> no Brasil.....	39
Figura 14 - Substâncias isoladas de <i>L. rubella</i> : A - lippiarubelosideo A , B - lippiarubelosideo B , C - (1S,2S,4R)-1-Metil-4-(prop-1-en-2-il)ciclohexano-1,2-diol, D - (1S,2R,4R)-1-Metil-4-(prop-1-en-2-il)ciclohexano-1,2-diol.....	40
Figura 15 - Distribuição de <i>L. rotundifolia</i> e <i>L. lacunosa</i> pelo mundo e no Brasil: A - ocorrências nos países: Brasil e Bolívia, B - distribuição de <i>L. lacunosa</i> no Brasil, C - distribuição de <i>L. rotundifolia</i> no Brasil.....	41
Figura 16 - Distribuição de <i>L. organoides</i> pelo mundo e no Brasil: A - ocorrência de <i>L. organoides</i> no mundo, B – distribuição no Brasil.....	42
Figura 17 -. Esquema com as informações dos extratos produzidos e aplicados ao estudo para cada espécie.	47

Figura 18 - Perfil de agregação em ensaios com ThT (adaptado de BATZLI; LOVE, 2015): A – curva cinética obtida nos ensaios de agregação amiloide com uso do cromóforo tioflavina T; B – estrutura do ThT.....	51
Figura 19 - Gráficos do ensaio fibrilação amiloide frente aos extratos de <i>L. aristata</i> e <i>L. brasiliensis</i>	52
Figura 20 - Gráficos do ensaio fibrilação amiloide frente aos extratos de <i>L. rubella</i>	53
Figura 21 - Gráficos do ensaio de fibrilação amiloide frente aos extratos de <i>L. lacunosa</i> e <i>L. rotundifolia</i>	54
Figura 22 - Gráficos do ensaio de fibrilação amiloide frente à extratos de <i>L. origanoides</i>	55
Figura 23 - Cromatogramas do extrato etanólico de <i>L. aristata</i> em ESI e APCI: A - cromatograma do extrato etanólico de <i>L. aristata</i> obtido com fonte ESI modo positivo, (B) modo negativo; C - com fonte APCI modo positivo e (D) APCI no modo negativo.	57
Figura 24 - Estrutura do verbascosídeo (A) e do isoverbascosídeo (B).....	60
Figura 25 - Cromatogramas dos extratos de <i>L. origanoides</i> em APCI positivo	61
Figura 26 - <i>Scores plot</i> por PCA dos agrupamentos dos extratos após processamento em APCI positivo.	62
Figura 27 - Análises PLS-DA dos íons obtidos após processamento dos dados no modo positivo.	63
Figura 28 – Estrutura do β -sitosterol e perfil de fragmentação do íon $[M+H]^+ m/z$ 397	64
Figura 29 – Perfil de fragmentação do sinal de $[M+H]^+ m/z$ 315.....	65
Figura 30 - Espectro ultravioleta do sinal de $[M+H]^+ m/z$ 315 (A) e estrutura da cirsimarina (B).....	66
Figura 31 – Perfil de fragmentação do íon de $[M+H]^+ m/z$ 449 no modo positivo: A – amostra LOPC; B – padrão orientina/isorientina.	66
Figura 32 - Perfil de fragmentação do íon de $[M+H]^+ m/z$ 433 no modo positivo: A - amostra LOPC; B - padrão vitexina/isovitexina.	67
Figura 33 - Estrutura dos flavonoides C-glicosilados: A - orientina/vitexina, B – isovitexina/ isorientina, C – fragmentação da unidade glicosídica em orientina, D – fragmentação da unidade glicosídica em isovitexina.....	68
Figura 34 – Perfil de fragmentação do íon $[M+H]^+ m/z$ 285 e estrutura da genkwanina.....	69
Figura 35 - Cromatogramas dos extratos de <i>L. origanoides</i> em APCI negativo.....	70
Figura 36 - <i>Scores plot</i> por PCA dos agrupamentos dos extratos após processamento em APCI negativo.	71

Figura 37 - Análises PLS-DA dos íons obtidos após processamento dos dados no modo negativo	72
Figura 38 - Perfil de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 447 e 431 no modo negativo: A - Fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 447 na amostra LOPC; B - Fragmentação no padrão; C - Fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 431 na amostra LOPC; D - Fragmentação no padrão.	73
Figura 39 – Perfil de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 623: A - Fragmentação na amostra LOPC; B - Fragmentação no padrão; C – estrutura verbascosideo.....	74
Figura 40 – Perfil de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 271 e estrutura da naringenina: A – Fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 271 em LOVV; B – no padrão de naringenina; C - estrutura naringenina	75
Figura 41 – Perfil de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 255 e estrutura da pinocembrina: A – fragmentação do íon de $[M-H]^-$ m/z 255 no extrato de LOVV; B - no padrão de pinocembrina; C - estrutura do flavonoide pinocembrina.....	76
Figura 42 - Perfil de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 283 e estrutura da genkwanina.....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Proteínas fibrilares amiloides e seus precursores em humanos (adaptado de BUXBAUM et al., 2022).....	17
Quadro 2 - Classes de medicamentos utilizados no tratamento da diabetes (adaptado de TAN et al., 2018 e WAUGH et al., 2010).	30
Quadro 3 - Dados da coleta das espécies utilizadas no trabalho.....	46
Quadro 4 - Gradiente utilizado nas análises cromatográficas.	49

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Perfil obtido com análise dos padrões por APCI no modo positivo e negativo	58
Tabela 2 – Detecção de sinais dos padrões localizados nas análises dos extratos por APCI modo positivo e negativo.....	59
Tabela 3 - Substâncias destacadas no PLS-DA identificadas nos extratos de <i>L. origanoides</i> .	78
Tabela 4 - Proporção das substâncias identificadas com os padrões nos extratos de <i>L. origanoides</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Associação americana de diabetes
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> /Trifosfato de adenosina
C	Concentração
DAD	<i>Diode-Array Detector</i> / Detector de Arranjo de Diodos
d.i.	Diâmetro interno
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EGCG	<i>epigallocatechin gallate</i> /galato de epigallocatequina
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FFFB	Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HbA1c	Hemoglobina glicada
hIAPP	<i>Human islet amyloid polypeptide</i> (Poli-peptídeo Amiloide da Ilhota Humana)
IC₅₀	Concentração Inibitória Média
IDF	<i>International Diabetes Federation</i> /Federação Internacional do Diabetes
°GL	Grau Gay Lussac
GLP-1	Peptídeo tipo glucagon 1
LC	<i>Liquid chromatography</i>
MM	Massa molecular
MS	<i>Mass spectrometry</i>

MS/MS ou MSn	Espectrometria de massas sequencial
m/z	Razão massa carga
OMS	Organização mundial de saúde
PC1/3	<i>prohormone convertasel 1/3</i>
PC2	<i>prohormone convertase 2</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis/ Análise de Componentes Principais</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis /Análise Discriminante por Mínimos Quadrados</i>
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts/Receptor para produtos finais de glicação avançada</i>
Rpm	Rotações por minuto
ThT	Tioflavina T
Tr	Tempo de retenção
Trm	Tempo de retenção médio
v/v	Volume/ volume

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 AMILOIDOSES	16
1.1.1 Amilina	19
1.1.2 Agregação amiloide da amilina	21
1.1.3 Diabetes mellitus.....	26
1.1.4 Tratamento da diabetes	29
1.1.5 Produtos naturais inibidores da agregação amiloide.....	32
1.2 GÊNERO <i>Lippia</i>	36
1.2.1 <i>L. aristata</i> Schauer, <i>L. brasiliensis</i> (Link) T. Silva e <i>L. rubella</i> (Moldenke) T. Silva & Salimena	38
1.2.2 <i>L. lacunosa</i> Mart. & Schauer e <i>L. rotundifolia</i> Cham.	40
1.2.3 <i>L. origanoides</i> Kunth	42
2. JUSTIFICATIVA	44
3. OBJETIVOS	45
3.1 GERAL	45
3.2 ESPECÍFICOS.....	45
4. METODOLOGIA	46
4.1 COLETA E EXTRAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	46
4.2 ENSAIOS DE FIBRILAÇÃO DE AMILINA <i>in vitro</i>	47
4.3 PREPARO DOS EXTRATOS E PADRÕES PARA ANÁLISE POR LC- MS/MS.....	48
4.3 ANÁLISES DOS EXTRATOS POR LC-MS/MS	48
4.4 ANÁLISE MULTIVARIADA DOS PERFIS DE MASSAS DOS EXTRATOS E IDENTIFICAÇÃO PUTATIVA	49
5. RESULTADOS	51
5.1 ENSAIOS DE FIBRILAÇÃO AMILOIDE	51
5.2 ANÁLISES DOS EXTRATOS POR LC-MS/MS	56
5.2.1 ANÁLISE POR LC-MS DOS EXTRATOS DE <i>L. origanoides</i> NO MODO POSITIVO	61
5.2.2 ANÁLISE POR LC-MS DOS EXTRATOS DE <i>L. origanoides</i> NO MODO NEGATIVO.....	70
5.2.3 PERFIL DOS EXTRATOS DE <i>L. origanoides</i>	77
6. CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 AMILOIDOSES

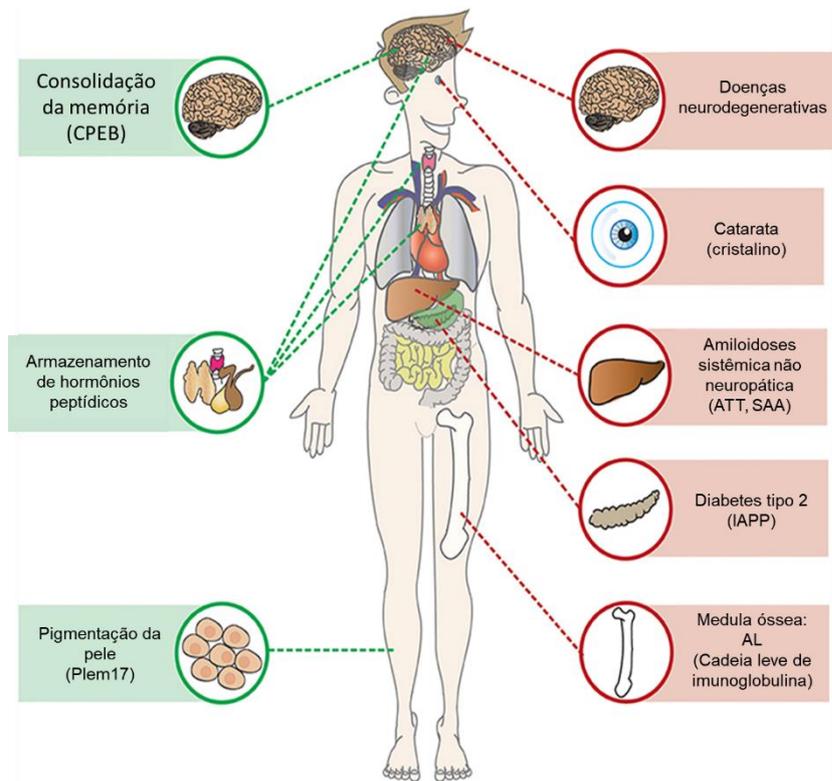
A primeira descrição de um tecido contendo “pedra branca” foi realizada em 1639, mas o termo amiloide (derivado de "*amylon*" e "*amylum*") foi introduzido por Rudolf Virchow em 1854, descrevendo uma substância patológica considerada relacionada à celulose ou amido, sendo logo depois caracterizada como proteica (BENSON et al., 2020; LADANZA et al., 2018; KABER; RICE, 2012).

De acordo com a Sociedade Internacional de Amiloidose (ISA), amiloide se refere ao material depositado, e amiloidose é a doença originada pelas fibrilas amiloides ou durante o processo de sua formação. Assim, este termo é usado apenas para os resultados da agregação proteica patológica da qual humanos e animais podem sofrer (BENSON et al., 2020). Nesta agregação, as moléculas assumem a conformação de folha β e se ligam umas às outras por ligação de hidrogênio e outras interações (ROCHET; LANSBURY, 2000). Essa agregação leva a formação de fibrilas finas e estáveis (WESTERMARK et al., 2011). Assim, a estrutura básica do amiloide é a fibrila. Esta é construída por protofilamentos torcidos, que nada mais são do que camadas de proteínas na conformação de folha β . Além disso, outros componentes como P-amiloide sérico e proteoglicanos sulfatos de heparano são encontrados nos depósitos amiloides (BUXBAUM et al., 2022).

Na natureza, as fibrilas de folha β são adaptadas para muitos propósitos. Como é o caso de diferentes estruturas bacterianas, como biofilmes, que possuem composições fibrilares de folha β . No ser humano, há diversos exemplos como a melanina, que está ligada ao transportador fibrilar de folha β (p-mel) nos melanossomas, as proteínas de ligação ao elemento de poliadenilação citoplasmática (CPEB) relacionadas ao processo de consolidação da memória, além do armazenamento de hormônios proteicos em grânulos secretores do sistema endócrino como hipófise (**Fig. 1**), sendo estas as organelas onde ocorrem a síntese e deposição da melanina. Nesses quadros, caracteriza-se a amiloide funcional (BUXBAUM et al., 2022; STROO et al., 2017; MACINDOE et al., 2012). No entanto, a amiloidose se relaciona às diferentes doenças sistêmicas potencialmente letais como amiloidose AL (ou amiloidose primária) causada, dentre outros fatores, pela superprodução de uma cadeia leve de imunoglobulina amiloidogênica tendo intensa relação com o mieloma múltiplo. Há diversas doenças para as quais a amiloide ou agregados de proteína amiloide (oligômeros citotóxicos, protofibrilas) são característicos, mas ainda não são denominadas como tais na prática clínica como doença de Alzheimer (DA; proteína amiloide: A β), doença de Parkinson (DP; proteína

amiloide: α Syn) e diabetes tipo 2 (DMT2; proteína amiloide hIAPP) (BENSON et al., 2020).

Figura 1- Amiloides no ser humano: fisiológico e patológico. Adaptado de STROO et al., 2017.



Ao todo, há 45 proteínas amiloides reconhecidas até o momento, dispostas no **Quadro**

1.

Quadro 1- Proteínas fibrilares amiloides e seus precursores em humanos (adaptado de BUXBAUM et al., 2022).

Nº	Proteína fibrilar	Proteína Precursora	S e/ou L	A ou H	Órgãos Alvos
1	AL	Cadeia Leve de Imunoglobulina	S, L	A, H	Todos os órgãos, exceto, geralmente, SNC
2	AH	Cadeia Pesada de Imunoglobulina	S, L	A	Todos os órgãos, exceto SNC
3	AA	(Apo) Amiloide A sérica	S	A, H	Todos os órgãos, exceto SNC
4	ATTR	Transtirretina, tipo selvagem	S	A	Coração principalmente em homens, pulmão, ligamentos, tenossinovite
5		Transtirretina, variantes	S		SNP, SNA, coração, olhos, rins, leptomeninges (aracnoide e pia-máter)
6	A β 2M	β 2-microglobulina, tipo selvagem	S		Sistema musculoesquelético

7		β 2-microglobulina, variantes	S		SNA, coração, língua
8	AApoAI	Apolipoproteína A I, variantes	S		Coração, fígado, rins, SNP, testículos, laringe (variantes C-terminal), pele (variantes C-terminal)
9	AApoAII	Apolipoproteína A II, variantes	S	H	Rins
10	AApoAIV	Apolipoproteína A IV, tipo selvagem	S	A	Medula renal e sistêmica
11	AApoCII	Apolipoproteína C II, variantes	S	H	Rins
12	AApoCIII	Apolipoproteína C III, variantes	S	H	Rins
13	AGel	Gelsolina, variantes	S	H	Rins, SNP, córnea
14	ALys	Lisozima, variantes	S	H	Rins
15	ALECT2	Fator Quimiotático de Leucócitos-2	S	A	Rins, principalmente
16	AFib	Fibrinogênio α , variantes	S	H	Rins, principalmente
17	ACys	Cistatina C, variantes	S	H	SNP, pele
18	ABri	ABriPP, variantes	S	H	SNC
19	ADanb	ADanPP, variantes	L	H	SNC
20	A β	Precursor da proteína A β tipo selvagem, Precursor da proteína A β , variante	L L	A H	SNC SNC
21	A α Syn	α -Synucleína	L	A	SNC
22	ATau	Tau	L	A	SNC
23	APrP	Proteína Prion tipo selvagem Proteína Prion variantes	L L	A H	Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), insônia fatal CJD, Doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), insônia fatal
24		Proteína Prion variante	S	H	SNP
25	ATMEM106B	Transmembrana 106B (TMEM106B)	L	A	Doenças de degeneração do lobo frontotemporal
26	ACal	(Pro)calcitonina	L S	A A	Tumores tireoides Rins
27	AIAPP	Polipeptídeo Amiloide da Ilhota Pancreática ou Amilina	L	A	Ilhotas de Langerhans, insulinomas
28	AANP	Peptídeo Natriurético Atrial	L	A	Átrio cardíaco
29	APro	Prolactina	L	A	Prolactinoma, Hipófise (associado à idade)
30	ASom	(Pro)somatostatina	L	A	Somatostatinomas
31	AGluc	Glucagon	L	A	Glucagonomas
32	APTH	Hormônio Paratireoide	L	A	Tumor paratireoide, Glândulas paratireoide (associado à idade)
33	AIns	Insulina	L	A	Iatrogênico, injeção local
34	AEnf	Enfurvitida	L	A	Iatrogênico, injeção local
35	AGLP1	Análogo do peptídeo 1 semelhante ao Glucagon	L	I	Iatrogênico, injeção local
36	AIL1RAP	Proteína antagonista do receptor de Interleucina-1	L		Iatrogênico, injeção local
37	ASPCd	Proteína surfactante de Pulmão	L	A	Pulmão
38	ACor	Corneodesmosina	L	A	Epitélio córneo, folículos capilares

39	AMed	Lactaderina (MFG-E8)	L	A	Aorta (associado à idade), artérias elásticas
40	AKer	Cerato-epitelina	L	A	Córnea, hereditário
41	ALac	Lactoferrina	L	A	Córnea
42	AOAAP	Proteína odontogênica associada a ameloblastos	L	A	Tumores odontogênico
43	ASem1	Semenogelina 1	L	A	Vesícula seminal
44	ACatKe	Catepsina K	L	A	Tumor associado
45	AEFEMP1e	Proteína da matriz extracelular semelhante a fibulina contendo EGF (EFEMP1)	L	A	Veias (associado à idade)

Legenda: S: sistêmica, L: localizada, H: hereditária, S: sistêmica, I: iatrogênica, SNC: Sistema Nervoso Central, SNP: Sistema Nervoso Periférico, SNA: Sistema nervoso autônomo.

Diversos hormônios polipeptídicos podem ser depositados como amiloides. Considerando-se a importância secretora do pâncreas, é importante notar a capacidade dos hormônios glucagon, insulina e amilina de formar agregados amiloides. O glucagon foi descrito como a principal proteína amiloide em um paciente com tumor pancreático produtor de glucagon (“glucagonoma”), além de ter sido verificada a formação de fibrilas amiloides *in vitro* (BUXBAUM et al., 2022; ICHIMATA et al., 2021; GLENNER et al., 1974).

A presença de agregados amiloides de insulina também têm sido relatada tanto em indivíduos saudáveis, devido ao envelhecimento, quanto em pacientes com diabetes, estando intimamente relacionada às repetidas injeções subcutâneas de insulina (NILSSON, 2016). Esses agregados estão relacionados à diminuição do controle glicêmico e resistência à insulina, dentre outros efeitos negativos (NAGASE, et al., 2014; ALBERT et al., 2006)

A amilina é um hormônio com importante papel fisiológico, mas que forma agregados tóxicos nas células β -pancreáticas. Estes são observados em cerca de 70 a 90% dos pacientes DMT2, gerando processos inflamatórios e formação de espécies oxidativas, culminando na morte celular (KANATSUKA et al., 2018; PITHADIA et al., 2016).

1.1.1 Amilina

A amilina ou polipeptídeo amiloide da ilhota humana (*human islet amyloid polypeptide* – hIAPP) é um hormônio cossecretado com a insulina pelas células β -pancreáticas com diferentes impactos na fisiologia humana (MARMENTINI et al., 2021).

A amilina pertence à família de peptídeos da calcitonina, que apresentam ponte dissulfeto próximo ao terminal N e resíduo aromático amidado no terminal C (ABEDINI et al., 2018). Em sua forma monomérica, consiste em um peptídeo de 37 aminoácidos que é clivado

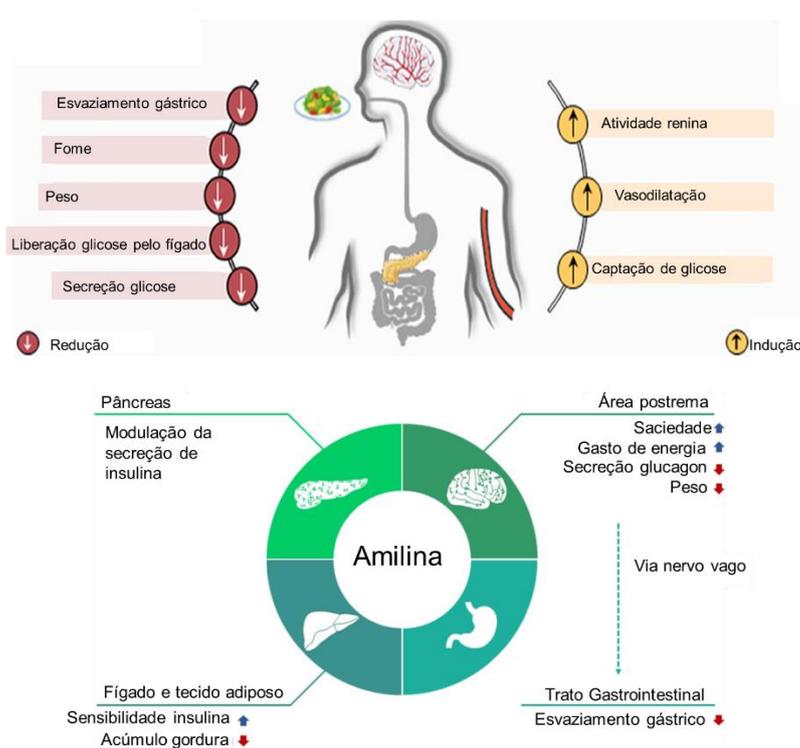
de um precursor pré-pró-proteína com 89 resíduos. Nas células β -pancreáticas, a proteína precursora é processada no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi, sendo acondicionada em grânulos secretores, juntamente com insulina. Esta proteína já foi caracterizada em diferentes mamíferos, aves e peixes teleósteos (WESTERMARK et al, 2011). A sequência de aminoácidos da amilina é altamente conservada em mamíferos, mas diferenças importantes ocorrem em relação à dita "região amiloidogênica" (aminoácidos 20-29) da amilina humana (**Fig. 2**). A amilina humana, de primatas e gatos é altamente amiloidogênica, enquanto a de roedores, por exemplo, não apresenta esta característica. Essa diferença parece estar associada à presença do aminoácido prolina, na sequência proteica de roedores (Pro25, Pro28 e Pro29) que estabiliza melhor a amilina em sua conformação funcional (LUTZ, 2022; LE FOLL; LUTZ, 2020; ABEDINI et al., 2018).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Amilina humana	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	H	S	S	N	N	F	G	A	I	L	S	S	T	N	V	G	S	N	T	Y
Amilina murina	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	R	S	S	N	N	L	G	P	V	L	P	P	T	N	V	G	S	N	T	Y
Amilina gato	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	I	R	S	S	N	N	L	G	A	I	L	S	P	T	N	V	G	S	N	T	Y
Amilina macaco	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	R	S	S	N	N	F	G	T	I	L	S	S	T	N	V	G	S	D	T	Y

Figura 2 - Sequências de aminoácido da amilina em diferentes mamíferos.

Dentre as diferentes ações fisiológicas, podemos citar a relação deste hormônio com a regulação de massa óssea e de pressão sanguínea, levando ao efeito de vasodilatação. A forma monomérica solúvel da amilina madura ativa o receptor de amilina (AMY) no cérebro produzindo efeitos hormonais no metabolismo da glicose (inibição da secreção de glucagon, controle do esvaziamento gástrico) e ingestão de nutrientes (indução da saciedade), estando muito relacionada à redução de peso benéfica e efeitos antidiabéticos (LUTZ, 2022). Além da ação no tecido cerebral, é descrita ação via nervo vago, em tecidos como fígado e tecido adiposo e localmente nas células β -pancreáticas (**Fig. 3**).

Figura 3. Efeitos fisiológicos e propostas de vias de ação da amilina. Adaptado de RAIMUNDO et al., 2020 e MATHIESEN et al., 2022



Os mesmos estímulos fisiológicos que levam à liberação da insulina estão relacionados com a liberação da amilina, visto o armazenamento conjunto desses hormônios nas vesículas secretoras. Assim, os valores de amilina plasmática variam de 3 a 5 pM no estado de jejum e aumentam para concentrações entre 15–25 pM pós-prandialmente em ratos (WESTERMARK et al., 2011; BOYLE; ROSSIER; LUTZ, 2010). Além disso, substâncias como a incretina não estão relacionados apenas ao aumento da secreção da insulina, mas também ao aumento dos níveis de amilina (INOUE et al., 1991). Outras fontes de amilina, além da pancreática, são células neuroendócrinas ao longo do trato gastrointestinal e gânglios da raiz dorsal, mas carecem de maiores estudos acerca da liberação e relevância fisiológica (LUTZ, 2022).

1.2.2 Agregação amiloide da amilina

A identificação da amilina está intimamente associada à descoberta de seus agregados amiloides em pâncreas de pacientes diabéticos em 1901 (OPIE, 1901). A caracterização completa desta proteína só foi alcançada no final dos anos 80, quase simultaneamente, por dois pesquisadores independentes, como demonstrado na **Fig. 4**, e prossegue como importante alvo

de investigação (LUTZ, 2022; WESTERMARK et al., 2011).

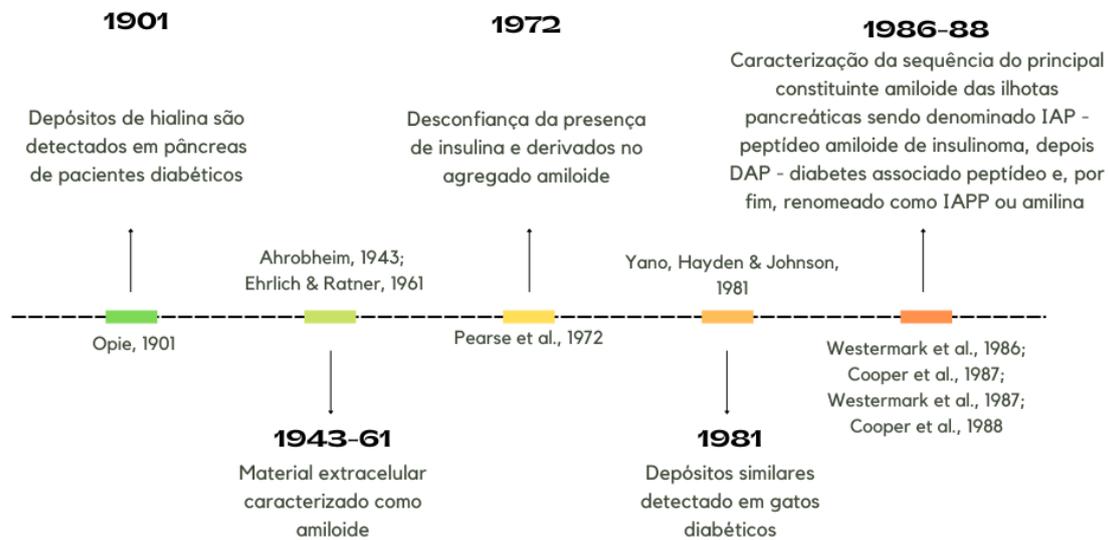


Figura 4 - Linha do tempo da descoberta da amilina.

O processo da formação amiloide é similar para todas as proteínas amiloidogênicas e pode ser dividido em 3 fases (**Fig. 5**):

1. Fase lag - onde os monômeros malformados se juntam em oligômeros;
2. Fase alongação ou de crescimento - onde os oligômeros se juntam, formando protofibrilas ou protofilamentos, que serão os principais componentes das fibras;
3. Fase platô - onde se atinge o estado estacionário, e a massa fibrilar é constante.

No ser vivo, a terceira fase provavelmente não ocorre, pois novas moléculas da proteína amiloide, como a amilina, continuarão a ser secretadas, unindo-se à massa fibrilar existente, levando ou ao aumento do depósito amiloide ou, ainda, à criação de novos pontos de formação amiloide. (WESTERMARK et al., 2011; MARMENTINI ET AL., 2022). Nos ensaios *in vitro* com uso da Tioflavina T (ThT), cromóforo com afinidade pelas fibras amiloides, a cada fase há um acréscimo da fluorescência, indicando o aumento da agregação até atingir o estado platô (PITHADIA *et al.*; 2016).

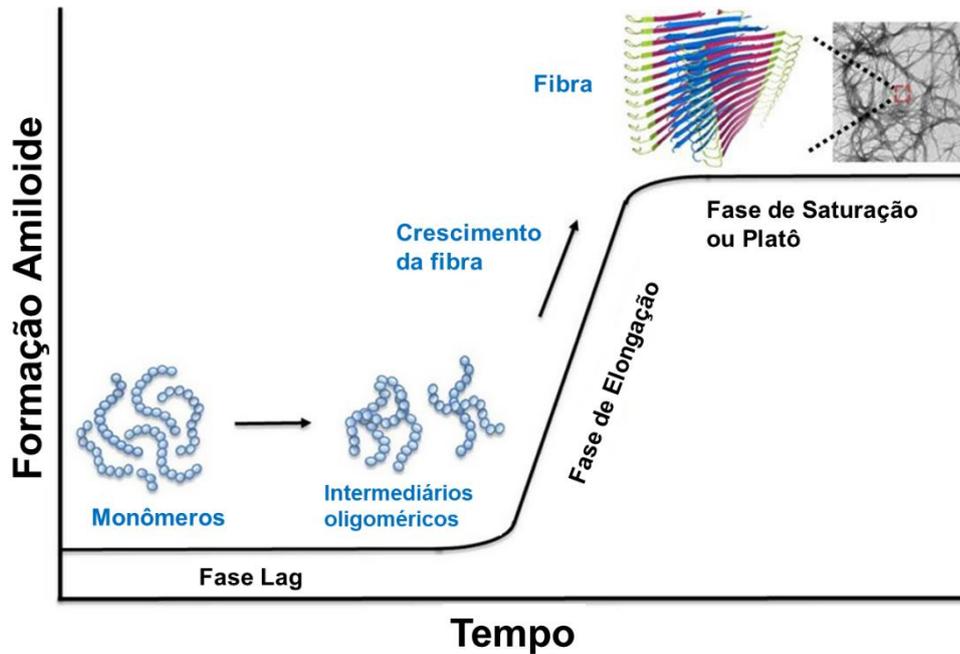


Figura 5 - Representação do processo de agregação amiloide (adaptado de RALEIGH et al., 2017).

A compreensão dos pontos críticos que atuam na indução da agregação amiloide da amilina é um importante alvo de estudos. Há indícios que superprodução, falhas de processamento e degradação, outros componentes dos grânulos secretores, distúrbios nos ambientes intra e extracelular estão intimamente relacionados (MARMENTINI et al., 2022).

A superprodução parece estar relacionada aos quadros de hiperglicemia e hiperlipidemia. Assim, observa-se um aumento plasmático inicial da amilina, como resposta à estes quadros (GASA et al., 2001; KRIZHANOVSKII et al., 2017). Esse aumento também pode estar relacionado a prejuízos na degradação da amilina devido a alterações na expressão ou atividade das enzimas degradantes (ZRAIKA et al., 2007). O processamento da proIAPP humana para IAPP ou amilina é realizado pela clivagem pelas enzimas PC1/3 e PC2 (*prohormone convertases*) e carboxipeptidase E, em processo similar ao visto com a proinsulina (MATHIESEN et al. 2022). Desequilíbrio nos níveis dessas enzimas está relacionado ao comprometimento da formação de amilina madura, o que por sua vez leva à indução da formação amiloide (MARZBAN et al., 2004; COURTADE et al., 2017). Os grânulos de secreção são constituídos por mais de 100 componentes e esse complexo equilíbrio é essencial para a estabilização da amilina (HUTTON et al., 1982). Isso inclui a proporção entre a insulina e a amilina, que notavelmente atua inibindo a formação amiloide (WESTERMARK, 1996).

A toxicidade dos agregados amiloides como depósitos intracelulares ou ainda sua interação com membranas e receptores celulares levam a diversos danos como estresse do

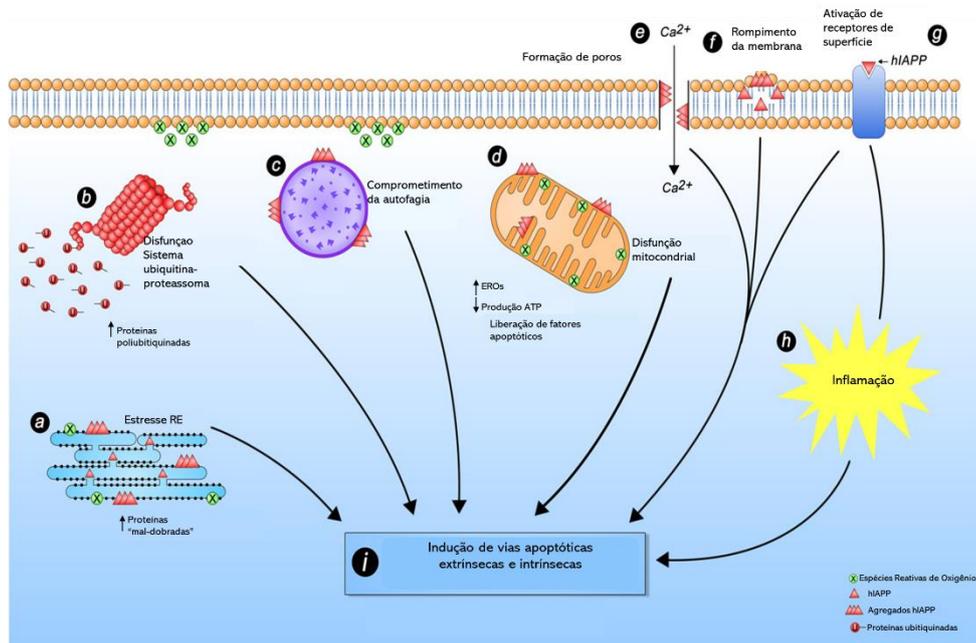
retículo endoplasmático (RE), interrupção da autofagia, disfunção mitocondrial, inflamação e apoptose (MARMENTINI et al., 2022). É notável que as células β -pancreáticas são as mais afetadas pelos agregados amiloides do que as células α ou δ adjacentes, inclusive estudos com células alfa apresentam maior taxas de sobrevivência na presença de amilina (LEI et al., 2010). Esses achados indicam que as células β são mais suscetíveis em comparação com as células α (RALEIGH et al., 2017).

Com a maior demanda da síntese da amilina, a hiperamilinemia pode levar ao estresse do RE (HULL et al., 2009). Nesses casos, a resposta de proteína desdobrada (UPR) ocorre para resgatar a homeostase da organela. Assim, as proteínas são marcadas com ubiquitina para serem degradadas, mas o mau funcionamento desse sistema leva ao acúmulo de proteínas ubiquitinadas, provocando apoptose (COSTES et al., 2011; CHU et al., 2012). Além deste mecanismo, a autofagia também leva à remoção de agregados de proteínas e organelas incorretas. Apesar de estudos demonstrarem que este mecanismo prossegue ativo na presença de agregados amiloides, parece estar relacionado a defeitos que prejudicam a degradação e provocam a morte celular (RIVERA et al., 2011; SHIGIHARA et al., 2014).

A disfunção mitocondrial também está associada com o acúmulo amiloide, pois leva ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por sua vez, provocam diversos danos como queda na produção de ATP, perda de massa mitocondrial e liberação de fatores apoptogênicos (LI et al., 2011; LI et al., 2015). A interação dos agregados amiloides com as membranas das células também parece afetar a integridade estrutural e permeabilidade das membranas. A amilina provoca formação de poros que levam ao vazamento de íons e também pode se adsorver nas membranas celulares (ANGUIANO et al., 2002; ENGEL et al., 2006; RALEIGH et al., 2017). Fibrilas amiloide são encontradas em invaginações das células β , incluindo em indivíduos portadores da diabetes melitus do tipo 2 (WESTERMARK, 1973) e em amostras humanas *post-mortem* relacionando a quantidade de agregado amiloide extracelular com a morte celular (JURGENS et al., 2011).

A amilina também possui capacidade de interagir com receptores celulares de superfície ativando mecanismos de indução de morte celular, bem como induzindo maior entrada de íons de cálcio que levam a apoptose (CASAS et al., 2008; ABEDINI et al., 2018). Seja através da interação com receptores ou fagocitação por macrófagos, a amilina também leva ao aumento de fatores inflamatórios como maior produção de citocinas e montagem do inflamossoma que estão relacionados à perda de células β -pancreáticas (WESTWELL-ROPER et al., 2016; PARK et al., 2017). Um resumo destes mecanismos está representado na **Fig. 6**.

Figura 6 - Mecanismos de toxicidade dos agregados amiloides. Adaptado de MARMENTINI et al., 2022.



Estes agregados estão intimamente relacionados à piora do quadro do diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2), bem como parecem agravar quadros de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA) e doença de Parkinson (DP). Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma maior concentração de amilina plasmática em pacientes portadores de doenças neurodegenerativas como DP e DA, além de elevada prevalência de DA em pacientes com DMT2 (PEILA et al., 2002; LU et al., 2014; SANCHEZ-GOMEZ et al., 2021). Vale ressaltar que em DA, a deposição A β está relacionada ao aumento da resistência à insulina que por sua vez também desempenha importante papel na agregação da amilina (NASSAR et al., 2018; LUTZ, 2022). Além disso, evidências histológicas demonstram a presença de proteínas amiloidogênicas como tau e A β (DA), α -sinucleína (DP) e amilina (DMT2) em células β -pancreáticas, bem como depósitos de amilina no cérebro reforçando a correlação entres esses quadros patológicos (MARTINEZ-VALBUENA et al., 2019; MARTINEZ-VALBUENA et al., 2021). Cada vez mais está se tornando claro que amilina e A β compartilham agregação e características tóxicas semelhantes, indicando mecanismos patogênicos comuns (GOTZ et al., 2013).

Apesar de haver lacunas na compreensão de alguns mecanismos ligados ao acúmulo amiloide da amilina, é consenso que as anormalidades no processamento, bem como sua deposição como amiloide nas ilhotas contribuem para a perda progressiva das células β pancreáticas no DMT2 e no diabetes felino. Os agregados amiloides são considerados um

importante marcador da DMT2 sendo observado em 90% dos portadores e o aumento da produção seguindo pelo inadequado envelhecimento da amilina são induzidos pela resistência à insulina. (LUTZ, 2022). Além dos fatores associados a DMT2, também foram identificados agregados amiloides nos pâncreas de pacientes DMT1 (BEERY et al., 2019). Os níveis séricos de amilina estão reduzidos nestes pacientes resultantes da perda das células β -pancreáticas. A amilina e suas formas imaturas parecem desenvolver um papel de autoantígeno contendo epítomos que ativam células T induzindo o ataque autoimune e inflamação no pâncreas de pacientes TD1 (OUYANG et al., 2006; DENROCHE; VERCHERE, 2018). Também foi observado a presença de agregados amiloides relacionados a falhas de enxertos após transplantes de ilhotas pancreáticas. Em estudo com *post-mortem* com 4 pacientes que passaram pelo transplante, apenas o indivíduo que não apresentou agregado amiloide nas ilhotas observadas apresentou os menores níveis de hemoglobina glicada (WESTERMARK et al., 2012).

1.1.3 Diabetes mellitus

De acordo com a Associação Americana de diabetes (ADA), o diabetes mellitus é um grupo de doenças metabólicas caracterizada pela hiperglicemia resultante da redução da ação da insulina, ou da sua secreção ou, ainda, a somatória desses dois fatores (ADA, 2014).

O diabetes pode ser diagnosticado com base nos critérios de glicose plasmática, seja o valor da glicose plasmática em jejum ou o valor da glicose plasmática de 2 h durante um teste oral de tolerância à glicose, também conhecido como curva glicêmica, ou critérios hemoglobina glicada (HbA1C) (ADA, 2023).

Ela é subdividida em 4 categorias (ADA, 2023):

1. Diabetes tipo 1 (DMT1): relacionada à destruição autoimune das células β , geralmente levando à deficiência absoluta de insulina, incluindo diabetes autoimune latente da idade adulta;
2. Diabetes tipo 2 (DMT2): relacionado à perda progressiva da secreção adequada de insulina das células β frequentemente no contexto de resistência à insulina;
3. Tipos específicos de diabetes devido a outras causas, por exemplo, síndromes de diabetes monogênicas (como diabetes neonatal), doenças do pâncreas exócrino (como fibrose cística e pancreatite) ou induzida por drogas ou produtos químicos (como com o uso de glicocorticoides, no tratamento de HIV/AIDS ou após transplante de órgãos);
4. Diabetes mellitus gestacional: diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, sem uma relação de diabetes evidente antes da gestação.

Dentre essas subcategorias, destacam-se a do tipo 1 e do tipo 2. A DMT1 é ainda dividida em duas formas. A forma imuno-mediada representa 5 a 10% dos casos de diabetes e está relacionada à destruição autoimune das células β , com presença de marcadores autoimunes bem caracterizados (ZIEGLER et al., 2013; LYNAM et al., 2019; ADA, 2023). DMT1 é a diabetes mais comum na infância e adolescência, mas pode ocorrer em qualquer idade, mesmo em indivíduos com 80 ou 90 anos, tendo variada taxa de destruição das células β em cada indivíduo (BOGUN et al., 2020; ADA, 2023). Outra forma possível é o DMT1 idiopático que se caracteriza por pacientes com insulinopenia permanente, mas sem evidência de fatores autoimune. É um quadro clínico raro e com relação fortemente hereditária (ADA, 2023).

DMT2 representa 90-95% dos casos de diabetes. Os portadores apresentam deficiência relativa de insulina e resistência periférica a este hormônio. Mesmo com níveis de insulina normais ou elevados, há uma ineficiência no controle da glicemia. Sendo assim, a secreção de insulina nestes indivíduos é deficiente para compensar a resistência à insulina. Muitos fatores estão relacionados à ocorrência da DMT2 e ao maior risco de desenvolver a doença, como sobrepeso ou obesidade, idade, falta de atividade física, hipertensão ou dislipidemia (IDF, 2021; ADA, 2023).

Em extenso trabalho da Federação Internacional do Diabetes (*International Diabetes Federation* - IDF) considerando dados de 215 países, pesquisadores realizaram análises tanto do número de portadores de diabetes quanto estimaram a prevalência para os próximos anos, bem como os impactos dessa doença economicamente. Para os anos 2000, a estimativa global de prevalência de diabetes na faixa etária de 20 a 79 anos era de 151 milhões, próxima à estimativa de 150 milhões da OMS (KING et al., 1995). No último trabalho realizado, estima-se que 537 milhões de adultos entre 20 e 79 anos em todo o mundo (10,5% de todos os adultos nessa faixa etária) tenham diabetes. A projeção indica que até 2030, serão 643 milhões de adultos, e até 2045, 783 milhões de adultos (**Fig. 7**). Os dados demonstram uma maior prevalência entre indivíduos mais velhos, uma ligeira prevalência maior em homens e predominância em centro urbanos (IDF, 2021).

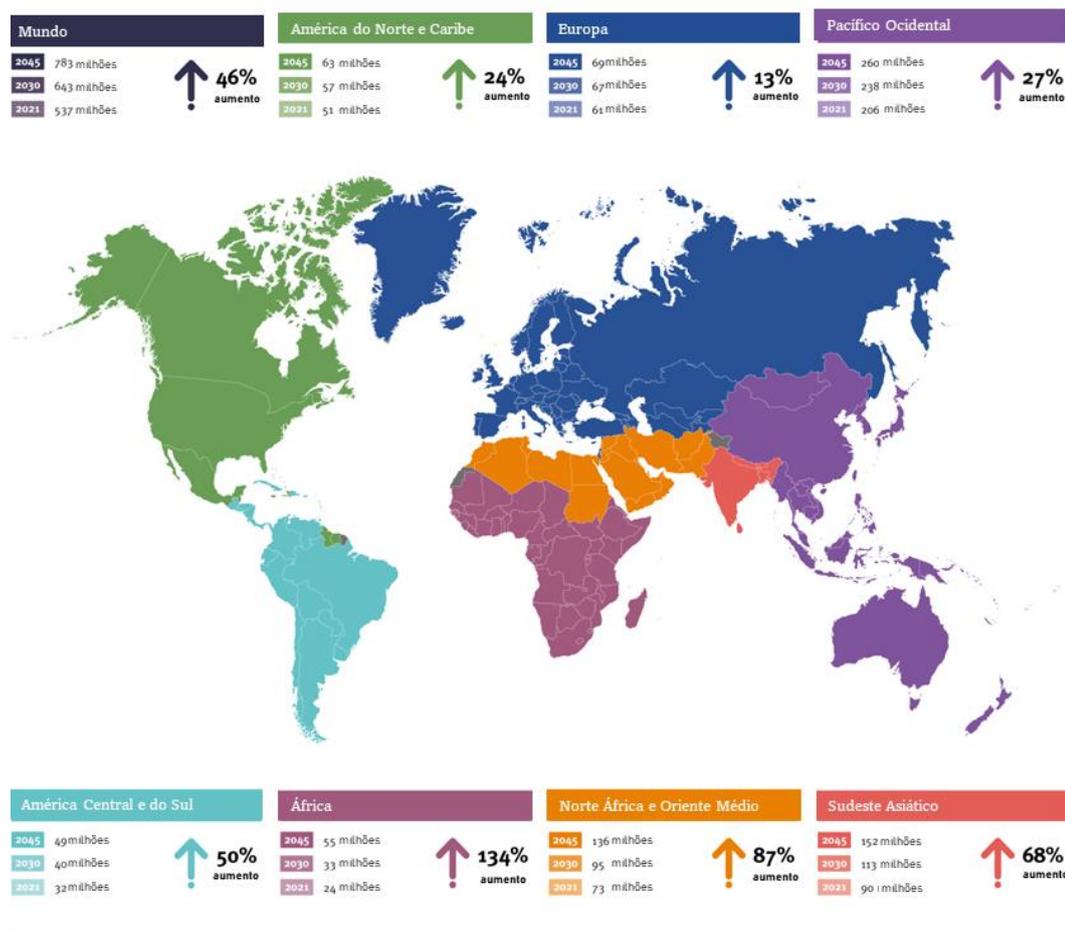


Figura 7 - Ocorrência da diabetes no mundo (adaptado de IDF, 2021).

Na região da América do Sul e Central, são estimados que 1 em cada 11 adultos possuem diabetes, com um número de 33 milhões de pessoas afetadas por essa doença, além de ao menos 121 mil crianças e adolescentes vivendo com TD1. O Brasil se apresenta como o sexto país em relação ao número de adultos com diabetes em 2021. Apesar do elevado número de casos, estima-se que 1 em cada 3 pessoas possuam diabetes não diagnosticada na América do Sul e Central, o que corresponde a mais de 10 milhões de pessoas. Mundialmente, estima-se que 240 milhões de pessoas vivam com diabetes não diagnosticada (IDF, 2021). Do ponto de vista clínico, a demora no diagnóstico pode levar ao favorecimento de complicações micro e macrovasculares que impactam mais gravemente a vida do indivíduo, bem como geram gastos públicos mais consideráveis (OGURTSOVA et al., 2022).

O aumento nos gastos globais com saúde devido ao diabetes tem sido considerável, crescendo de US\$ 232 bilhões em 2007 para US\$ 966 bilhões em 2021, para adultos de 20 a 79 anos. Isso representa um aumento de 316% em 15 anos. Na região da América do Sul e Central, foram gastos US\$ 65 bilhões em 2021. Parte desse aumento é atribuída à crescente prevalência da doença, mas também pode ser atribuída à melhora da qualidade dos dados, o que auxilia nas

medidas públicas e melhora do diagnóstico, bem como no tratamento (IDF, 2021).

Tanto na DMT1 quanto DMT2, diversos fatores genéticos e ambientais contribuem para a perda progressiva da massa e/ou função das células β que se manifesta clinicamente como hiperglicemia. Uma vez que a hiperglicemia ocorre, as pessoas com todas as formas de diabetes correm o risco de desenvolver as mesmas complicações crônicas, embora as taxas de progressão possam diferir (ADA, 2023). Dentre as complicações micro e macrovasculares decorrentes do diabetes destacam-se neuropatia, nefropatia, retinopatia, doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica (CHAWLA, 2016).

O diabetes é um dos principais fatores de mortalidade em todo o mundo. Excluindo os riscos de mortalidade associados à pandemia de COVID-19, estima-se que aproximadamente 6,7 milhões de adultos entre 20 e 79 anos tenham morrido devido ao diabetes ou suas complicações em 2021. Isso corresponde a 12,2% das mortes globais por todas as causas nesta faixa etária. Considerando a América Central e do Sul, foram 410.000 mil mortes em 2021 (IDF, 2021).

1.1.4 Tratamento da diabetes

Para portadores da DMT1, o tratamento consiste na reposição da insulina exógena visando garantir concentrações adequadas para recriar perfil fisiológicos evitando quadros de cetoacidose e outras complicações geradas pela hiperglicemia (UMPIERREZ; KORYTKOWSKI, 2016).

Para os portadores da DMT2, ou ainda aqueles se caracterizam em estado de pré-diabetes, a primeira abordagem é uma mudança do estilo de vida focado em uma alimentação equilibrada e exercícios. Caso não se obtenha o controle glicêmico, inicia-se a abordagem farmacológica com hipoglicemiantes (**Quadro 2**) e, caso necessário, reposição de insulina (TAN et al., 2018).

Quadro 2 - Classes de medicamentos utilizados no tratamento da diabetes (adaptado de TAN et al., 2018 e WAUGH et al., 2010).

Classe de medicamento	Exemplo	Mecanismo
Biguanidas	Metformina	↑ sensibilidade da insulina ↓ gliconeogênese hepática
Sulfoniluréias	Glibenclamida, glipizida, glimepirida, gliclazida	↑ secreção da insulina
Glitazonas ou Tiazolidineionas	Pioglitazona	↑ sensibilidade da insulina
Meglitinidas	Repaglinida, nateglinida	↑ secreção da insulina
Inibidores da α glicosidase	Acarbose	Retarda absorção de carboidratos
Gliptinas (inibidores DDP-4)	Sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina	↑ tempo de ação do GLP-1, ↑ secreção da insulina
Mimético e análogo GLP-1	Exenatida, liraglutida	↑ secreção da insulina
Inibidores SGLT-2 ou glifozinas	Canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina	Aumentam eliminação de glicose pelos rins com inibição da absorção pelos túbulos proximais.

Em relação à terapia com insulina, as injeções subcutâneas frequentes são bastante incômodas e o equilíbrio entre alimentação, administração da insulina e controle da glicemia é bastante sensível. A administração subcutânea de insulina não se assemelha ao papel da fisiológica, uma vez que não está disponível no fígado, através da veia porta, em concentração e tempo adequados (BOSCARI; AVOGARO, 2021). Visando o melhor controle glicêmico, novas insulinas foram introduzidas no mercado. Análogos basais com maior duração que contribuem para melhor controle durante a noite, análogos ultrarrápidos que levam ao melhor controle pós-prandial e bombas de insulina com infusão constante de insulina (PAL et al., 2021); JANEŽ et al., 2020; NIMRI et al., 2020)

Com base nas ações metabólicas da amilina, a manutenção da ação deste hormônio pode contribuir para o melhor controle glicêmico. Assim, o primeiro análogo completo da amilina, pramlintida (do inglês, *pramlitide*), foi desenvolvido entre 1995-96 (KONG et al., 1997; THOMPSON et al., 1997), autorizado pelo FDA em 2005 (RYAN et al., 2005) e, ainda hoje, é o único medicamento à base de amilina aprovado (SymlinR®) para o tratamento de DMT1 e DMT2 (LUTZ, 2022).

A pramlintida (**Fig. 8**) é um análogo sintético e equipotente da amilina humana, sendo utilizada como terapia adjuvante em pacientes tratados com insulina na hora das refeições. Difere-se do peptídeo natural por ter prolinas nas posições 25, 28 e 29, visando melhorar a estabilidade em solução e minimizar a propensão a agregação (HAY et al., 2015).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Amilina humana	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	H	S	S	N	N	F	G	A	I	L	S	S	T	N	V	G	S	N	T	Y
Pramlintida	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	H	S	S	N	N	F	G	P	I	L	P	P	T	N	V	G	S	N	T	Y

Figura 8 - Sequência de aminoácidos do pramlintida e da amilina humana

É demonstrado que o tratamento com pramlintida melhora os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c), reduz a glicose pós-prandial em relação apenas à terapia com insulina, permite reduções na dosagem de insulina nas refeições, inibe a secreção do glucagon pós-prandial e melhora o controle glicêmico geral. O tratamento também é associado com a perda de peso sustentada e significativa. Náusea (leve a moderada) é o evento adverso relatado com mais frequência e o aumento de injeções subcutâneas a maior causa para a baixa adesão ao tratamento (HAY et al., 2015; RYAN et al., 2005).

A estabilidade de análogos de amilina é uma questão ainda a ser superada. Diversas abordagens são descritas como a peguilação, ou seja, a conjugação com polietileno glicol (PEG) (BÖTTGER et al., 2018), uso de lipossomas (BRAGA et al., 2015) ou partículas poliméricas (GUERREIRO et al., 2012). Há, ainda, a busca por outros análogos de amilina ou agonistas de receptores, como o cangrilintide da empresa Novo Nordisk, que está em fase de ensaio clínico, e davanlintide, da empresa Amylin Pharmaceuticals, que foi descontinuado por não apresentar resultados superiores na perda de peso em comparação à pramlintida. Vale ressaltar que, devido a ação da amilina em induzir a perda de peso, muitos desses análogos acabam apresentando esta como uma de suas principais indicações. (Mathiesen et al., 2022; KRUSE et al., 2021; MACK et al., 2010).

Apesar dos benefícios da pramlintida, ainda não há uma formulação que permita sua união com a insulina devido a fatores físico-químicos. Estudos visam estabelecer formulações estáveis em pH adequado de análogos de insulina, como LisPro, com o pramlintida (SILVA; LIMA, 2018), ou ainda, a associação de derivados peguilados de amilina com análogos de insulina (NASCIMENTO et al., 2019).

Além dos desafios na elaboração de uma formulação estável de amilina ou uma formulação com a combinação entre amilina e insulina, extensos estudos de qualidade e segurança da formulação de insulina pura demonstram a formação de fibrilas amiloides

indesejáveis após armazenamento prolongado (FROKJAER; OTZEN 2005). Então, apesar de todo o conhecimento adquirido, ainda há limitações no armazenamento a longo prazo das formulações de insulina pura, bem como o desenvolvimento biotecnológico de novas formulações análogas, visto o risco da formação desses agregados amiloides, além dos desafios da formulação de amilina (LIMA; ICART, 2022).

1.1.5 Produtos naturais inibidores da agregação amiloide

Considerando a importância na inibição da formação de agregados amiloides, tanto do ponto de vista clínico quanto farmacológico, a busca por substâncias a partir de produtos naturais se mostra promissora. Visando o controle terapêutico da minimização dos efeitos tóxicos dos agregados amiloides no organismo, substâncias promissoras podem atuar em diferentes níveis (DHOUAFLI et al., 2018):

1. Eliminando ou reduzindo a síntese da proteína amiloidogênica ou gerando modificação pós-traducional que impeça o dobramento incorreto;
2. Bloqueando mudanças conformacionais no momento inicial impedindo formação de oligômeros;
3. Destruindo agregados pré-formados ou potencializando mecanismos naturais de depuração;
4. Atenuando a toxicidade dos agregados, convertendo estruturas tóxicas em espécies sem efeito deletério, ou atuando na minimização dos efeitos causados pela agregação (por exemplo, controle do nível de espécies reativas de oxigênio).

Diversos trabalhos relatam a ação de produtos naturais atuando em um desses níveis. Partição em acetato de etila de *Acer okamotoanum*, rico em flavonoides, como isoquercitrina e afzelina foram avaliadas em relação ao seu papel na inibição de proteínas amiloides envolvidos na DA. Tanto a partição, quanto a isoquercitrina isolada foram capazes de diminuir a expressão de enzimas relacionadas à liberação de $A\beta$ no cérebro, além de demonstrar proteção ao estresse oxidativo em células neuronais (KIM et al., 2018; KIM et al., 2020). Ehrnhoefer et al. (2008) demonstraram o redirecionamento da formação de fibrilas amiloides constituídas por α -sinucleína e $A\beta$ por meio da ação de galato de epigallocatequina (EGCG). Em concentrações equimolares, o EGCG liga-se preferencialmente ao terminal C da α -sinucleína (Asp119,

Ser129, Glu130 e Asp135) promovendo a formação de α -sinucleína não tóxica e não estruturada.

Considerando a medicina tradicional chinesa, foi avaliado o potencial benéfico frente a DA do Danggui-Shaoyao-San (DSS), fitoterápico chinês que consiste em uma mistura de 6 ervas. O estudo avaliou os efeitos do DSS em déficits cognitivos e degeneração neuronal em camundongos APP/PS1, encontrando melhora nos déficits cognitivos, redução da amiloidose e modulação na expressão de receptores que atuam no transporte da $A\beta$ (YANG et al., 2021). Huo-Luo-Xiao-Ling-Dan (HLXL) é um medicamento em Fase II aprovado pela FDA baseado em uma combinação de 11 ervas utilizadas na medicina tradicional chinesa para tratamento de artrite. Em análises acerca do seu potencial terapêutico frente a DA, os resultados demonstram uma redução do depósito amiloide em cérebro de camundongos tratados com o medicamento, diminuição da oligomerização de $A\beta$ em células e regulação de citocinas pró-inflamatórias (LIANG et al., 2022).

Em relação à amilina, estudos *in vitro* indicam a atividade inibitória de diversas substâncias fenólicas como galato de epigalocatequina, resveratrol, epicatequina, rutina, quercetina, curcumina, baicaleína, ácido caféico, ácido rosmarínico e oleuropeína (Fig. 9) (NIER; COOPER, 2021).

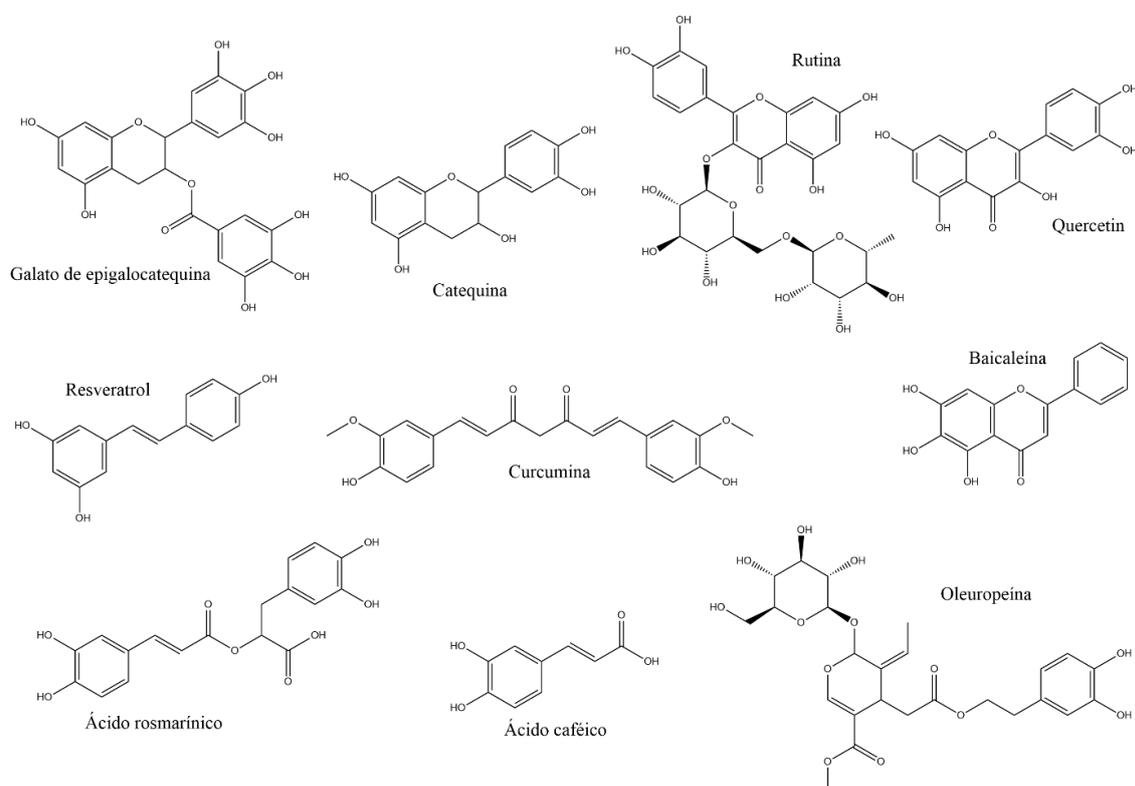


Figura 9 - Substâncias com atividade na inibição da fibrilação de amilina humana.

Análises de *docking* molecular indicam que a interação entre as catequinas e a estrutura da amilina se dá por meio de interações de ligações de hidrogênio, interações π - π e/ou interações hidrofóbicas com diferentes resíduos de aminoácidos. A comparação da interação das catequinas com e sem o grupo galoil indicaram que este grupo aumenta a afinidade de ligação envolvendo ligação apolar (PATEL et al., 2017). Em outro trabalho foi demonstrado que EGCG interage com a amilina através de ligações de hidrogênio e interações π - π , inibindo a interação interpeptídica entre monômeros, impedindo a fibrilação (XU et al., 2017). Ensaios *in vivo* com camundongos reforçam a capacidade de inibir a oligomerização, fibrilação e diminuir, assim, a toxicidade nas células devido à agregação da amilina (FRANKO et al., 2018).

Ensaios *in silico* demonstram que o resveratrol interage com a amilina em solução aquosa formando uma estrutura estável que minimiza a interação com as membranas carregadas negativamente, como de fosfolipídeos (LOLICATO et al., 2015). Esta capacidade de interromper a agregação amiloide e danos à membrana também foi demonstrada *in vitro* (SCIACCA et al., 2018).

Três fenilpropanóides – schizotenuina A e os ácidos licópico A e B (**Fig. 10**) -, isolados de *Lycopus lucidus* (Lamiaceae) apresentaram atividade inibitória em ensaios com ThT, com redução do valor de fluorescência encontrados, sendo corroborados em análises de microscopia eletrônica de transmissão frente agregação da amilina e A β (SUN et al., 2020).

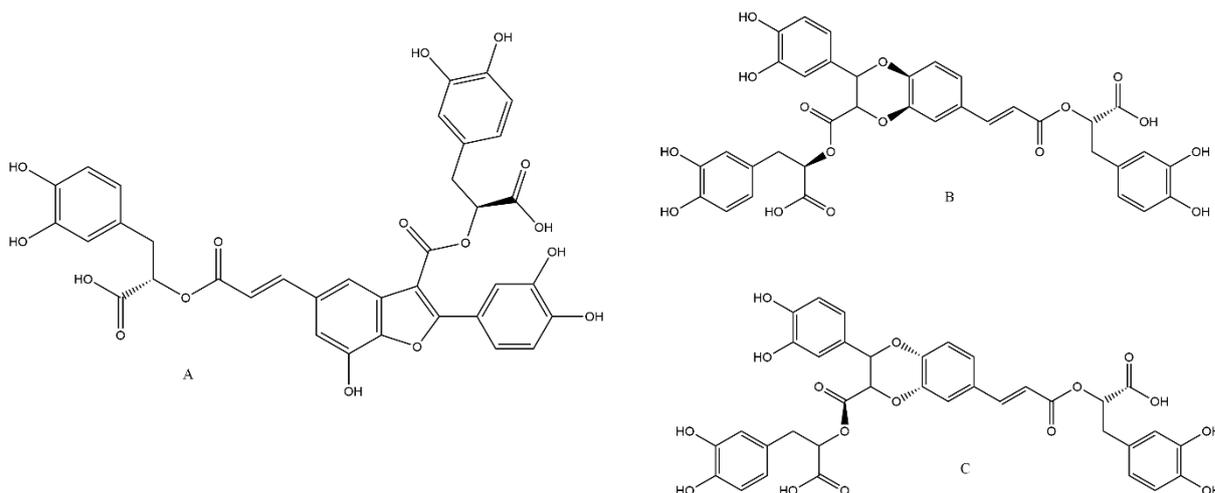


Figura 10 - Fenilpropanóides isolados de *L. lucidus*: **A**- schizotenuina A, **B** - ácido licópico A, **C**- ácido licópico B.

Os flavonóides apresentam significativo destaque na inibição da agregação amiloide. Análises de inibição da agregação amiloide da amilina pelo flavonóide crisina (5,7-

dihidroflavona) foi verificada tanto *in silico* quanto *in vitro*. Foi visto que resíduos de arginina (Arg11) e asparagina (Asn14) ancoram a crisina no sítio de ligação ativo da amilina. Mais especificamente, o flavonoide forma ligações hidrogênio fortes com a amilina através das interações entre as posições O3 da crisina com Arg11 da amilina, e O4 com Asn14, respectivamente. Em ensaios de turbidez, o flavonoide apresentou capacidade de inibir a agregação. Análises de células tratadas com crisina e expostas à amilina demonstraram a menor presença de fibrilas, quando analisadas pelo nível de fluorescência com ThT e por coloração das células com vermelho de congo, reforçando a ação positiva deste flavonoide na inibição da agregação amiloide (ALKAHTANE et al., 2021).

O flavonoide rutina demonstrou inibir a agregação amiloide em análises de fluorescência com ThT e microscopia eletrônica de transmissão. Além disto, células neuronais incubadas com amilina e rutina apresentaram menor nível de espécies reativas de oxigênio e citocinas, indicando um papel protetor da rutina frente a toxicidade causada pelos agregados amiloides (YU et al., 2015).

O flavonoide miricetina foi capaz de promover a inibição da agregação de amilina e a desagregação de fibrilas, formando espécies não tóxicas em ensaios *in vitro*. Essa proteção foi acompanhada pela inibição do estresse oxidativo no citoplasma e nas mitocôndrias, redução da peroxidação lipídica e do dano de membrana associado, e restauração do potencial da membrana mitocondrial. A suplementação com o flavonoide também reverteu a perda de funcionalidade em ilhotas pancreáticas de camundongos expostas à amilina, restaurando a secreção de insulina estimulada por glicose. Estudos de simulação de dinâmica molecular sugeriram que miricetina interage na região central amiloidogênica e, assim, evita a agregação distorcendo as fibrilas (DUBEY et al., 2021).

Avaliação de dinâmica molecular dos flavonoides morina, quercetina, miricetina, dihidroquercetina e epicatequina com a amilina demonstram que a interrupção da interação com o resíduo fenilalanina (Phe23) é crítico na inibição da formação do agregado. Estas substâncias contêm de dois a três sistemas de anéis aromáticos capazes de interagir com esse aminoácido através do empilhamento π - π . Considerando cálculo de frequências de contato, a probabilidade de interação mostra-se maior para a quercetina (quercetina 0,92 > dihidroquercetina 0,78 > miricetina 0,62 > morina 0,57 > epicatequina 0,39) (KING et al., 2022).

Dentre os estudos *in vivo* e de caso clínico, a suplementação dietética com curcumina se destaca como benéfica frente a resistência à insulina, diabetes tipo 2 (DMT2) e doença de Alzheimer (DA). A administração oral de curcumina em ratos levou à diminuição da glicemia,

aumento dos níveis de insulina e sensibilidade à insulina (SEO et al., 2008; NA et al., 2011). O tratamento também reduziu os níveis de Hb1Ac em diferentes modelos animais (SEO et al., 2008; ARUN; NALINI, 2002). A curcumina também melhorou a resistência à insulina e a tolerância à glicose em camundongos (HE et al., 2012; SEO et al., 2008).

Estudos em humanos demonstram que há redução nos níveis de amilina plasmática em indivíduos com maior risco de desenvolver DMT2 utilizando curcumina (180 mg/dia) por 12 semanas em relação ao grupo placebo (THOTA et al., 2020). Um estudo de 9 meses com pacientes com pré-diabéticos demonstrou que a suplementação com curcuminoide diminuiu o risco de desenvolver DMT2 e melhorou outros parâmetros como função de células β (HOMA- β) e níveis de peptídeo C (CHUENG SAMARN et al., 2012). Outro trabalho envolvendo o tratamento de pacientes com DMT2 e pacientes com pré-diabetes, por 3 meses, com curcuminoide, resultou em diminuição da glicemia de jejum, dos níveis de HbA1c e da resistência à insulina (KARANDISH et al., 2021; NA et al., 2013). Além disso, os níveis de AGL e triglicerídeos foram reduzidos em pacientes com diabetes (NA et al., 2013) e a insulina sérica diminuiu em indivíduos pré-diabéticos (KARANDISH et al., 2021).

Assim, a pesquisa com produtos naturais visa atingir mais de um mecanismo, pois grande parte das substâncias apresentam ações antioxidantes, antiinflamatórias e antiagregantes. O mecanismo molecular na inibição de agregação amiloide a partir de polifenóis parece estar mais relacionado à ruptura de ligações hidrofóbicas, aromáticas e/ou de hidrogênio por seus grupos hidroxila doadores de elétrons que, por sua vez, desestabilizam a folha β ou a estrutura secundária helicoidal e, conseqüentemente, a oligomerização e fibrilação de hIAPP (BHOWMICK et al., 2022). Embora sejam necessários mais estudos visando elucidar os mecanismos de ação e a confirmação dessas respostas clínicas, os resultados já presentes na literatura demonstram o potencial de substâncias fenólicas na inibição da agregação da amilina, além de importantes modulações de marcadores com significativo impacto no DMT2.

1.2 GÊNERO *Lippia*

O gênero *Lippia* pertence à família Verbenaceae e compreende cerca de 140 espécies, sendo um dos gêneros mais ricos da família. Se apresenta como arbustos e subarbustos, tendo maior distribuição em regiões tropicais e subtropicais, com destaque para as Américas (**Fig. 11**) (SALIMENA; MÚLGURA, 2015; CARDOSO *et al.*, 2021).

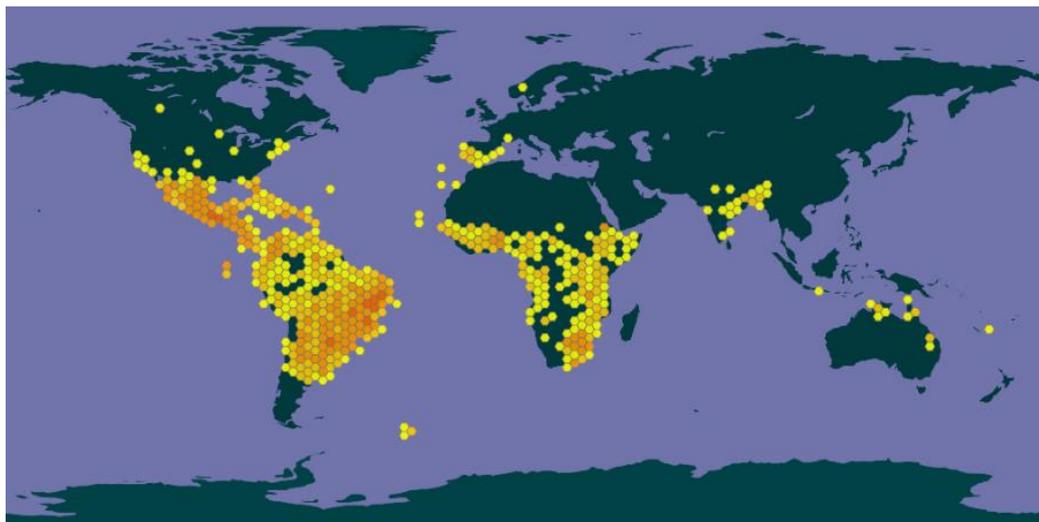


Figura 11 - Distribuição do gênero *Lippia* pelo mundo: ocorrência na América Central, do Sul e do Norte, África, regiões da Europa, Ásia e Oceania.

Adaptado de *Global Biodiversity Information Facility*. Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/2925383>>. Acesso em: 02 Mar.2023a.

O Brasil se destaca como centro de diversidade de *Lippia*, com 87 espécies e alta porcentagem de endemismos - superior a 70% (SALIMENA; CARDOSO, 2023a), com a maior concentração de populações, principalmente no bioma cerrado (SALIMENA; MÚLGURA, 2015).

Espécies do gênero são usadas tradicionalmente, principalmente, para tratamento de doenças respiratórias. Além dos usos para fins medicinais, espécies também são utilizadas em preparações alimentícias (PASCUAL et al., 2001). Por isso, grande parte dos trabalhos envolvendo a caracterização química destas espécies está relacionada à composição do óleo essencial ou frações voláteis, devido às suas características aromáticas (SILVA et al., 2021; BARROS et al., 2022).

Ademais espécies como exemplo *L. graveolens* é utilizada por populações no México visando o tratamento da diabetes, além de trabalhos descrevendo a atividade do extrato e de substâncias isoladas, como o flavonoide hispidulina (IC₅₀: 37,2 µM) na inibição da enzima α -glucosidase que se constitui em um importante alvo terapêutico no tratamento da diabetes (AMADOR et al., 2020; PASCUAL et al., 2001). Demonstrando o potencial de espécies do gênero para busca de substâncias promissoras no tratamento da diabetes.

1.2.1 *L. aristata* Schauer, *L. brasiliensis* (LINK) T. Silva e *L. rubella* (Moldenke) T. Silva & Salimena

Estas três espécies antes eram classificadas como pertencentes ao gênero *Lantana*, também parte da família Verbenaceae. Após revisão taxonômica das espécies brasileiras de *Lantana* por Silva (1999), estas espécies foram transferidas para o gênero *Lippia* (SILVA; SALIMENA, 2002).

L. aristata ocorre em diferentes biomas brasileiros, como Amazônia, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica e Pantanal, e, além do Brasil, apenas a Bolívia possui relato desta espécie (Fig. 12).

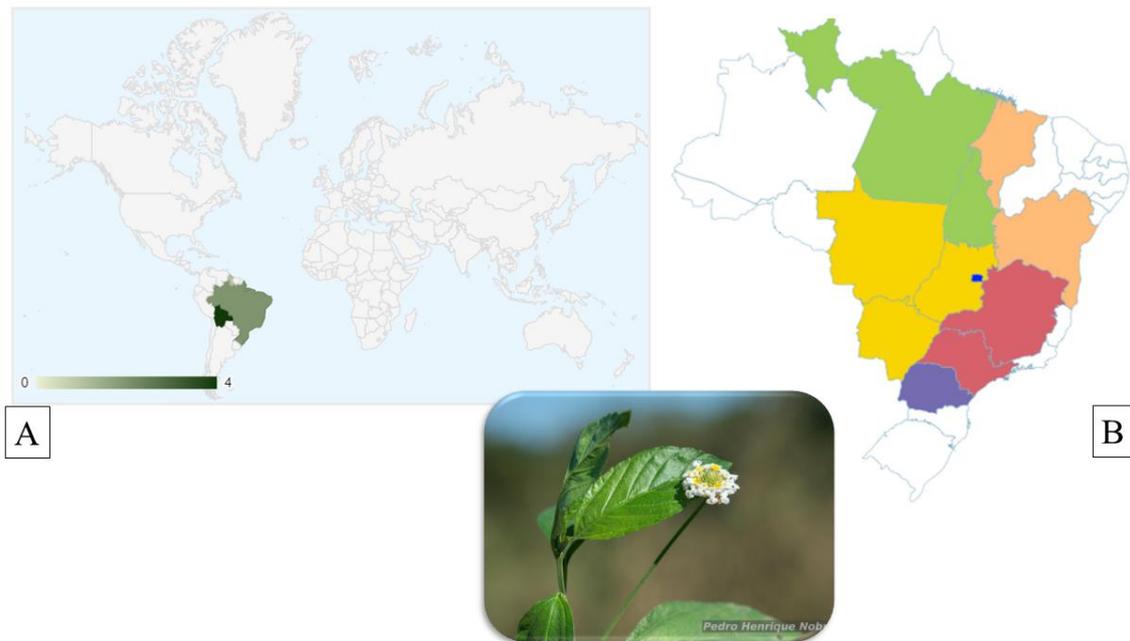


Figura 12 - Distribuição de *L. aristata* pelo mundo e no Brasil: **A** – ocorrência de *L. aristata* nos países: Bolívia e Brasil, **B** – ocorrência no território brasileiro.

Adaptado de Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<https://tropicos.org/name/33702803>> Acesso em: 03 Mar 2023a. Adaptado de Salimena, F.R.G.; Cardoso, P.H. *Lippia in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB21430>>. Acesso em: 03 Mar. 2023b

L. brasiliensis apresenta significativa distribuição no território brasileiro, sendo encontrada nos biomas Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica e Pampa (Fig. 13). Há relatos do uso tradicional desta espécie como antiespasmódica por populações, principalmente indígenas, no Paraguai (SORIA, 2020). *L. rubella*, possui uma distribuição mais restrita, sendo endêmica do Brasil e com ocorrência apenas em Minas Gerais nas regiões de campos rupestres (Fig. 13).

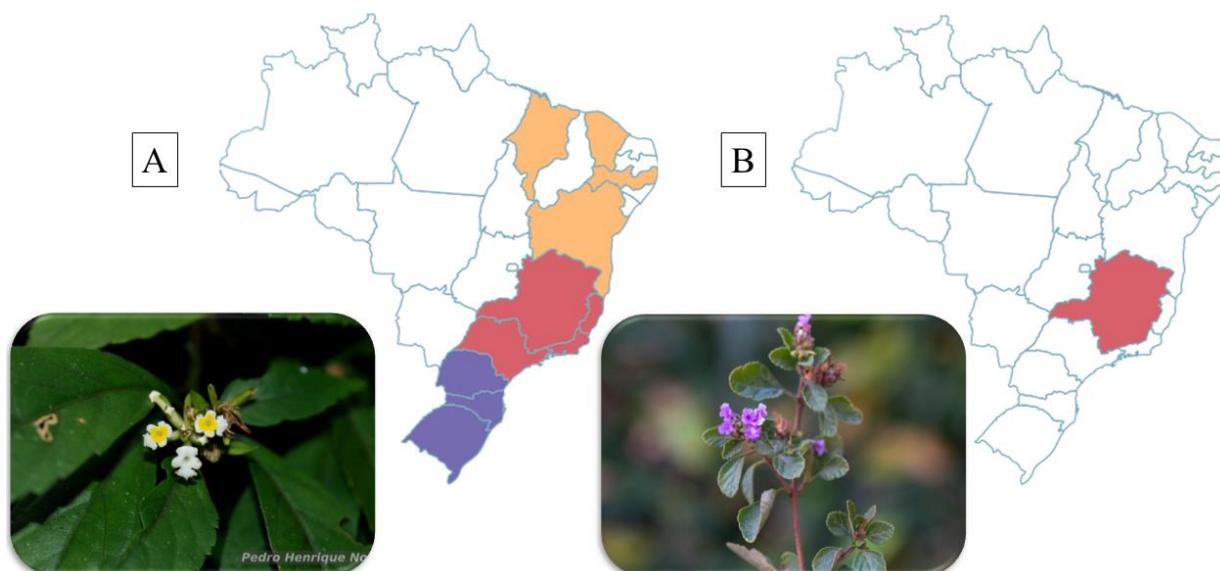


Figura 13 - Distribuição de *L. brasiliensis* e *L. rubella* no Brasil: **A** – mapa de ocorrência de *L. brasiliensis* no Brasil; **B** – mapa de ocorrência de *L. rubella* no Brasil.

Adaptado de Salimena, F.R.G.; Cardoso, P.H. Lippia in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB33207>>. Acesso em: 03 Mar. 2023c.

Há poucos registros de estudos fitoquímicos para estas três espécies, especialmente acerca dos constituintes fixos. Para *L. brasiliensis* e *L. aristata*, os únicos registros encontrados na literatura se referem ao estudo dos óleos essenciais e componentes voláteis de suas folhas (CRAVEIRO *et al.*, 1981; TERBLANCHÉ *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2010; MONTANARI *et al.*, 2011).

No trabalho de Singulani (2012), foi realizada a avaliação da composição dos extratos hexânicos de diversas espécies de *Lippia*. Neste trabalho destaca-se epóxido de *cis*-limoneno como mais abundante em *L. rubella* e α -pineno como substância mais abundante em *L. aristata*. Além disso, o extrato etanólico desta espécie apresentou o menor valor de IC₅₀ (4,9 μ g/mL) na avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH, em comparação com os demais extratos testados.

Para *L. rubella*, constam na literatura o trabalho de Fabri e colaboradores (2011), onde realizaram a caracterização de extratos metanólicos de folhas, além de duas publicações acerca do isolamento e purificação de substâncias do extrato em butanol, acetato de etila e em diclorometano. Para o extrato em butanol, foram descritos os fenilpropanoides glicosilados poliumosideo, forsitosideo A e verbascosideo. Destes, forsitosideo A e verbascosideo também foram detectados no extrato em acetato de etila, bem como isoverbascosideo. Também foram descritos dois fenilpropanóides glicosilados inéditos, o lippiarubelosideo A e o lippiarubelosideo B (**Fig. 14A e B**), e os flavonoides linarina e pectolarina (MARTINS *et al.*,

2019). Também foi realizado o isolamento de dois diastereoisômeros de limoneno-1,2,-diol, a partir do extrato em diclorometano (**Fig. 14C e D**) (LEITÃO *et al.*, 2020). Todas estas substâncias foram avaliadas quanto a sua atividade antifúngica frente às cepas de *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida parasilopsis* (ATCC 22019), *Cryptococcus neoformans* T1444 e *Cryptococcus neoformans* 24067, fungos que desempenham papel importante em infecções oportunistas, como a candidíase e criptococose. Os melhores resultados foram observados frente à cepa de *C. neoformans*, com destaque para o lippiarubelosideo A, que apresentou a menor CIM (15,6 µg/mL) (MARTINS *et al.*, 2019; LEITÃO *et al.*, 2020).

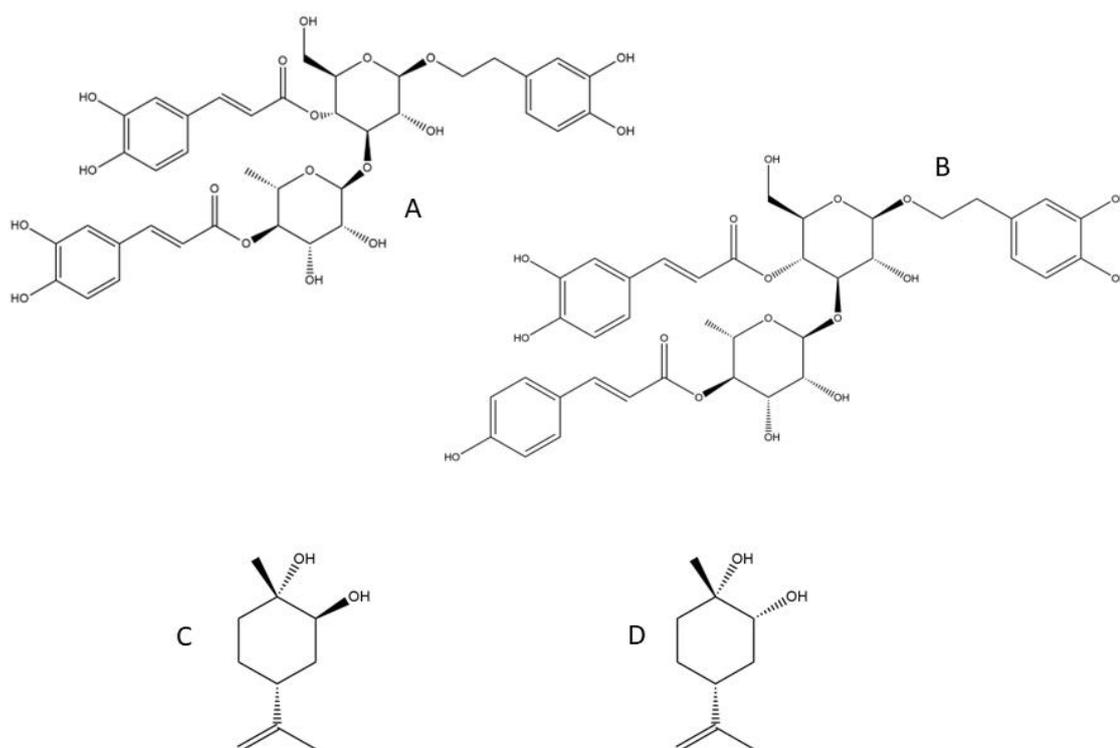


Figura 14 - Substâncias isoladas de *L. rubella*: **A**- lippiarubelosideo A, **B** - lippiarubelosideo B, **C** - (1S,2S,4R)-1-Metil-4-(prop-1-en-2-il)ciclohexano-1,2-diol, **D** - (1S,2R,4R)-1-Metil-4-(prop-1-en-2-il)ciclohexano-1,2-diol.

1.2.2 *L. lacunosa* Mart. & Schauer e *L. rotundifolia* Cham.

As espécies *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* possuem significativa semelhança botânica, o que torna sua delimitação taxonômica complexa. Ambas ocorrem no Cerrado, sendo que *L. lacunosa* tem ocorrência descrita também na Caatinga, e *L. rotundifolia* na Floresta Atlântica (SALIMENA; CARDOSO, 2022e,f). Além do Brasil, essas espécies também são relatadas para a Bolívia (**Fig. 15**).



Figura 15 - Distribuição de *L. rotundifolia* e *L. lacunosa* pelo mundo e no Brasil: **A** - ocorrências nos países: Brasil e Bolívia, **B**- distribuição de *L. lacunosa* no Brasil, **C**- distribuição de *L. rotundifolia* no Brasil.

Adaptado de Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<https://tropicos.org/name/50293324>> Acesso em: 04 Mar 2023b. Adaptado de Salimena, F.R.G.; Cardoso, P.H. *Lippia in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB26162>>. Acesso em: 04 Mar. 2023d,e.

Trabalhos de nosso grupo focaram na composição química dos óleos essenciais destas duas espécies, avaliando folhas e flores. Foi visto que, nas flores de *L. lacunosa*, as substâncias majoritárias são mirceno e (*E*)-ocimenona, enquanto nas folhas, a mircenona foi identificada como o componente majoritário. Em *L. rotundifolia* foram observados o limoneno e o mirtenal como substâncias majoritárias nas flores, sendo o mirtenal o mais abundante também nas folhas (LEITÃO *et al.*, 2008).

Da partição em diclorometano de *L. lacunosa* foram isoladas e identificadas 8 substâncias– o triterpeno ácido oleanólico; e os flavonoides metoxilados salvigenina, cirsimaritina, 3'-*O*-metil-eupatorina, eupatilina, eupatorina, 3',7-dimetoxi-5,6,4'-trihidroxi-flavona e 7'-*O*-metilapigenina. Essas substâncias foram avaliadas frente à inibição da replicação de *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇-Rv ATCC – 27294), causador da tuberculose. O menor valor de concentração inibitória mínima (CIM) foi obtido para a 3'-*O*-metil-eupatorina (25 µg/mL) (CASTELLAR *et al.*, 2011). A atividade antimicobacteriana (H₃₇-Rv ATCC – 27294) também foi avaliada para os extratos etanólicos e partições de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*, sendo que os menores valores de CIM (25 µg/mL) foram apresentados pelas partições em diclorometano de ambas as espécies (LEITÃO *et al.*, 2006).

1.2.3 *L. origanoides* Kunth

A espécie *L. origanoides* distribuiu-se em cinco biomas brasileiros, sendo eles Amazônia, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica e Pantanal (SALIMENA; CARDOSO, 2023f). Além de apresentar significativa distribuição nas Américas (**Fig. 16**).



Figura 16 - Distribuição de *L. origanoides* pelo mundo e no Brasil: **A**- ocorrência de *L. origanoides* no mundo, **B** – distribuição no Brasil.

Adaptado de *Global Biodiversity Information Facility*. Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/7297353>>. Acesso em: 04 Mar.2023b. Adaptado de Salimena, F.R.G.; Cardoso, P.H. *Lippia* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB21449>>. Acesso em: 04 Mar. 2023f.

Esta espécie é utilizada por diversos povos tradicionais no Brasil, possuindo uma monografia relacionada ao Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, onde destacam-se os usos como antisséptico ou antimicrobiano relacionados a lesões externas, doenças e desconfortos respiratórios e intestinais, bem como para cólicas de bebês e dores de origem menstrual, dentre outros (BRASIL, 2018). No Formulário de fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB), 2º edição, há indicações do uso da tintura como antisséptico orofaríngeo e em afecções da pele, e de sabonete líquido para afecções no couro cabeludo (BRASIL, 2021).

Devido sua semelhança ao aroma do orégano (*Origanum vulgare*, Lamiaceae), esta espécie, juntamente com *L. graveolens* e *L. palmeri*, são utilizadas em preparações alimentícias no México (BAUTISTA-HÉRNANDEZ *et al.*, 2021).

No Brasil, comunidades quilombolas de Oriximiná, no estado do Pará, a utilizam para tratamento de distúrbios gastrointestinais, como antisséptico, antiespasmódico, antitérmico, além de ser utilizada para saúde da mulher como em casos de inflamação do útero, corrimentos vaginais e cólicas menstruais (OLIVEIRA *et al.*; 2007). Em ensaios que avaliaram a atividade analgésica exercida pela espécie foi visto que doses de 10, 30 e 100 mg/kg de extrato etanólico foram capazes de reduzir a algia em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Também foi demonstrada a ação antinociceptiva central em modelo de *hot plate* (placa quente) (OLIVEIRA *et al.*; 2014).

Em trabalho recente do nosso grupo, foi avaliada a inibição frente à enzima α -glucosidase por extratos de *L. origanoides* coletadas em regiões distintas do Brasil. O valor de IC₅₀ encontrado para o extrato coletado na Floresta Atlântica, em região de altitude, foi de 94,2 μ g/mL, em contraste com o valor de 48,4 μ g/mL, encontrado para o extrato da mesma espécie coletada na região amazônica. As substâncias anotadas no extrato do espécime amazônico, e que não se encontrou no extrato do espécime da Floresta Atlântica, foram os flavonoides isoorientina e isovitexina. Ambos possuem relatos de atividade de inibição da α -glucosidase (LIANZA *et al.*, 2022).

Considerando atividades biológicas já relacionadas ao gênero *Lippia*, bem como resultados satisfatórios nos estudos visando alvos terapêuticos relacionados ao diabetes, tornam estas espécies importantes alvos de estudos acerca do potencial na inibição da agregação da amilina e positivo impacto no DMT2

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a relevância dos produtos naturais na pesquisa de novos candidatos a fármacos, a capacidade de inibição de agregados amiloides, com destaque para substâncias advindas de espécies vegetais como a curcumina, bem como a ausência na literatura de registro da atividade de espécies de *Lippia* em atividade anti-amiloide em amilina humana, nos propomos a contribuir com a descrição química de espécies do gênero *Lippia*. Em estudos preliminares do grupo, parte da biblioteca de extratos do Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia foi ensaiada frente à agregação amiloide da amilina humana, através de uma parceria estabelecida com o professor Luis Mauricio T. R. Lima, coordenador do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, tendo sido realizada a triagem de cerca de 68 extratos de espécies nativas brasileiras. Dentre os extratos ativos, destacaram-se espécies de *Lippia*, para algumas das quais são escassos os registros fitoquímicos (*L. artistata*, *L. brasiliensis*, *L. rubella*, *L. rotundifolia*), revelando a importância de se relacionar seus perfis químicos e a atividade biológica demonstrada nos ensaios preliminares de inibição da agregação da amilina humana.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

O objetivo geral deste projeto é a determinação do perfil químico de extratos ativos de espécies do gênero *Lippia* buscando investigar os aspectos químicos e farmacológicos da atividade inibitória de agregação do hormônio amilina promovida pelos extratos e frações.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil químico de extratos e partições de *L. rotundifolia*, *L. lacunosa*, *L. rubella*, *L. aristata*, *L. brasiliensis* e *L. origanoides* por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (DAD) acoplado à espectrômetro de massas, nos modos positivo e negativo;
- Avaliar a atividade inibitória de agregação da amilina promovida pelos extratos e frações das espécies em estudo;
- Utilizar estatística multiparamétrica para compreensão da distribuição de metabólitos secundários e possível relação com a atividade tanto nos extratos brutos quanto nas partições através de análises por LC-MS;
- Identificação putativa (anotação) das estruturas presentes nos extratos ativos de *Lippia*, utilizando banco de substâncias próprio do grupo (*Custom database*) e GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*).

4. METODOLOGIA

4.1 COLETA E EXTRAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram utilizados os extratos de espécies do gênero *Lippia* presentes no banco de extratos do Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia. O detalhamento acerca da coleta está descrito na **Quadro 3**. Todos os indivíduos eram cultivados, com exceção do espécime de *L. origanoides*, coletado no estado selvagem no Vale das Videiras, em Petrópolis, RJ.

Quadro 3 - Dados da coleta das espécies utilizadas no trabalho.

Espécie	Localização	Órgão Vegetal	Número de Registro (Voucher)	Trabalhos relacionados
<i>L. aristata</i> Schauer	Horto da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Minas Gerais (22°46'48.6"S e 43°22'24.5"W) a partir de indivíduo coletado na Cadeia do Espinhaço – MG	Partes aéreas	CESJ 56944	NC
<i>L. brasiliensis</i> Link.T.R.S.Silva	Horto da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Minas Gerais (22°46'48.6"S e 43°22'24.5"W) a partir de indivíduo coletado na Cadeia do Espinhaço – MG	Folhas e inflorescência	CESJ 56951	NC
<i>L. rubella</i>	Horto da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Minas Gerais (22°46'48.6"S e 43°22'24.5"W) a partir de indivíduo coletado na Cadeia do Espinhaço – MG	Partes aéreas	CESJ 56942	FONSECA, 2019
<i>L. lacunosa</i>	Horto da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Minas Gerais (22°46'48.6"S e 43°22'24.5"W) a partir de indivíduo coletado em Diamantina – MG	Folhas e flores	CESJ 41.691	DUARTE, 2010
<i>L. rotundifolia</i>	Horto da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Minas Gerais (22°46'48.6"S e 43°22'24.5"W) a partir de indivíduo coletado em Diamantina – MG	Folhas e flores	CESJ 31.376	DUARTE, 2010
<i>L. origanoides</i>	Vale das Videiras, Petrópolis – Rio de Janeiro (22°25'11" S, 43°17'02.6" W, 1364 m)	Partes aéreas	CESJ 64030	LIANZA et al., 2022
<i>L. origanoides</i>	Casa de cultivo, Embrapa Oriental, Manaus – Amazônia	Partes aéreas	NC	LEITÃO et al., 2017
<i>L. origanoides</i>	Casa de cultivo, Petrópolis – Rio de Janeiro a partir do indivíduo coletado em Oriximiná, PA.	Partes aéreas	CESJ 39532	NC

Legenda: NC – não consta.

Todo o material vegetal foi submetido ao procedimento de secagem, sendo posteriormente moído em moinho de facas. O material resultante foi submetido à percolação em etanol 96°GL, com exceção de um dos extratos obtidos de *L. origanoides*. Neste as partes

aéreas foram extraídas por decocção a uma diluição de 5% p/v, obtendo-se um extrato aquoso, que foi posteriormente seco por atomização (*spray-drying*) modelo B-290, da marca Büchi (Büchi Laboratorius-Technik AG, Switzerland) com os parâmetros de temperatura à 160°C, bomba e aspirador ajustados em 20% e 80%, respectivamente. O rendimento da extração, calculado como a razão percentual entre o extrato seco obtido e o material vegetal usado para a extração, foi de 8,48 % p/p.

Parte dos extratos etanólicos, bruto, obtido foi suspenso em água: etanol (9:1, v/v) e fracionado por partição líquido-líquido em solventes orgânicos com diferentes polaridades, sendo obtidos as partições em hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e resíduo aquoso, com exceção dos extratos de *L. organoides*. Os solventes utilizados foram evaporados em evaporador rotativo. Extratos provenientes de flores, bem como a partição em diclorometano de *L. lacunosa*, não foram avaliados por ausência de massa suficiente para análise. Ao todo, foram utilizados 8 extratos e partições neste trabalho totalizando 27, **Fig. 17**.

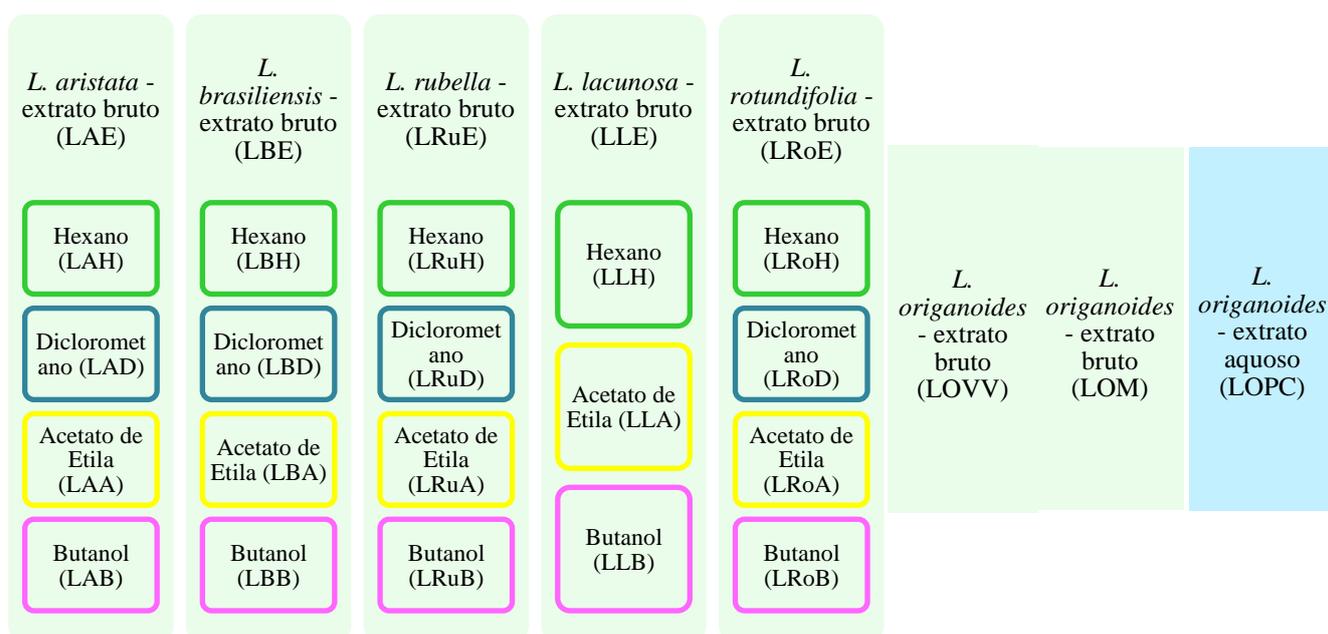


Figura 17 - Esquema com as informações dos extratos produzidos e aplicados ao estudo para cada espécie.

4.2 ENSAIOS DE FIBRILAÇÃO DE AMILINA *in vitro*

Nos ensaios de fibrilação de amilina, utilizou-se placa de 96 poços preta com volume de 200 µL por poço. Foi adicionado em cada poço 50 µM (C: 0,069 µg/µL) de amilina humana sintética (Genscript; >95% pureza; estoque 2,5 mM em DMSO 100%; MM: 13,786), foi incubada juntamente a 0,002 mg/mL (C: 200 µg/µL) dos extratos e partições (estoque 20

mg/mL em DMSO), 30 μ M de Tioflavina T (ThT), um cromóforo fluorescente com elevado tropismo por fibras amiloides, utilizado para monitorar cinética de agregação. O volume total foi completado com tampão de fosfato de sódio (Na_2HPO_4 , pH 7,0).

O ensaio de agregação foi realizado em espectrofluorímetro Synergy H1 (Biotek) com excitação ajustada a 440 nm e emissão a 480 nm, com um filtro de corte de 475 nm. Após ciclos de agitação orbital por 10 segundos, as medidas foram coletadas por leituras a cada 3 minutos por 72h. Os experimentos foram conduzidos a 25 °C. O controle negativo de inibição foi realizado com a amilina em tampão e como controle positivo foi utilizado 50 μ M curcumina (C: 0,018 μ g/ μ L; MM: 368,38) como substância de comparação da inibição da agregação amiloide (SPARKS *et al.*, 2012; DAVAL *et al.*, 2010).

Os dados obtidos no equipamento foram exportados e processados através do software *GraphPad Prism 8*.

4.3 PREPARO DOS EXTRATOS E PADRÕES PARA ANÁLISE POR LC-MS/MS

Foram pesados 1 mg dos extratos e padrões em balança analítica, sendo solubilizados em 1 mL de metanol (1 mg/mL). Posteriormente, foi levado ao vórtex por 1 minuto e centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e transferido para recipiente adequado.

Foram utilizados padrões isolados e caracterizados pelo grupo em outros trabalhos, bem como alguns adquiridos na Merck (Darmstadt, Alemanha): apigenina 7-O-glicosídeo (97%), eriodictiol (>98%), naringenina (>95%), pinocembrina (>95%), sakuranetina (98%) e verbascosídeo (99%). A mistura de isovitexina/vitexina e isoorientina/orientina foi obtida de *Vitex polygama* (LEITAO; DELLE MONACHE, 1998).

4.3 ANÁLISES DOS EXTRATOS POR LC-MS/MS

Foi utilizado o cromatógrafo de fase líquida Dionex UltiMate 3000 UHPLC Focused com detecção por arranjo de diodos (DAD) associado ao espectrômetro de massas LCQ Fleet, ambos da Thermo Scientific (UHPLC-DAD-MS/MS). A coluna utilizada foi a Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm X 100mm d.i., 1.7 μ m, 100Å), com fluxo de 0,450 mL/min e fase móvel composta por (A) água com 0,1% ácido fórmico e formiato de amônio e (B) acetonitrila nas proporções apresentadas no **Quadro 4**. Os comprimentos de onda monitorados no DAD foram: 254 nm, 270nm, 330nm, 365nm.

Quadro 4 - Gradiente utilizado nas análises cromatográficas.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	95	5
5	95	5
25	-	100
30	-	100
31	95	5
36	95	5

Foi monitorada a faixa de massa 100 a 1000 m/z, obtidos por *electrospray* (ESI) e por *atmospheric-pressure chemical ionization* (APCI). As análises com ESI utilizaram os parâmetros de temperatura do capilar 350 °C, fluxo *sheat gas* 20 U.A., fluxo *aux gas* 10 U.A., fluxo *sweep gas* 10 U.A. Para o modo positivo foi empregada voltagem na fonte 4 kV, corrente na fonte 100 µA, voltagem do capilar 10V. Para o modo negativo foi empregada a voltagem na fonte 5.5kV, corrente na fonte 100 µA e voltagem do capilar -12V.

As análises com APCI utilizaram os parâmetros de temperatura do capilar 150°C, temperatura do vaporizador 350°C, fluxo *sheat gas* 20 U.A., fluxo *aux gas* 10 U.A., fluxo *sweep gas* 0 U.A., voltagem da fonte 6 kV, corrente na fonte 20 µA, voltagem do capilar 27 V, modo positivo. E para as análises no modo negativo foram aplicados os mesmos parâmetros com exceção da voltagem do capilar 25 V.

Em todas as análises foi empregado branco de solvente no início, meio e fim da análise. As análises dos extratos ocorreram em triplicata e foram injetadas em ordem aleatória. As análises dos padrões foram realizadas em unicata em ambas as polaridades, utilizando a fonte de ionização APCI. Os dados adquiridos foram tratados e processados nos *softwares* XCALIBUR versão 2.2 SP1 e MZmine versão 2.53.

4.4 ANÁLISE MULTIVARIADA DOS PERFIS DE MASSAS DOS EXTRATOS E IDENTIFICAÇÃO PUTATIVA

Os dados obtidos por LC-MS/MS foram processados utilizando o *software* MZmine. A partir da lista total dos íons resultantes deste tratamento foram realizadas as análises multivariadas e identificação putativa.

Utilizando o *software MetaboAnalyst – statistical, functional and integrative analysis of metabolomics data*, versão 5.0 (PANG *et al.*, 2021), foram realizadas a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e análise discriminante por quadrados mínimos (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*). Os dados foram inseridos no formato .csv, contendo a informação de *m/z* e área de cada íon, e aplicado o escalonamento do tipo pareto. Não foi aplicado o tratamento de normalização ou transformação.

A identificação putativa (anotação) dos íons foi realizada através do *software Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS - <http://gnps.ucsd.edu>) (WANG *et al.*, 2016). Os dados foram exportados a partir do *MZmine* no formato .mgf e inseridos na plataforma. Os parâmetros utilizados foram: *precursor ion mass tolerance* 1 Da, *product ion (fragment ion) tolerance* 0,5 Da, *matched peaks* 5 e *cosine score* 0,7. Também foi utilizado o banco de dados construído por nosso grupo (*Custom database*) utilizando o *software MZmine*.

5. RESULTADOS

5.1 ENSAIOS DE FIBRILAÇÃO AMILOIDE

O protocolo padrão para o estudo do comportamento amiloide das proteínas, bem como a busca por inibidores é o ensaio de fluorescência da tioflavina T (ThT). Este é um ensaio que pode ser realizado com praticidade, onde o aumento da fluorescência está associado à formação de folhas β no agregado (SPARKS *et al.*, 2012; DAVAL *et al.*, 2010).

A medição de fluorescência de ThT geralmente apresenta uma curva sigmoideal como resultado da agregação. No tempo inicial, normalmente não há fluorescência detectada. Conforme o tempo de incubação aumenta, inicia-se a desnaturação e agregação de proteínas, visto que a temperatura e agitação usadas no ensaio contribuem para o processo de formação amiloide e, assim, o sinal de fluorescência aumenta até atingir um platô. No caso de uma substância ou conjunto de substâncias que sejam capazes de inibir a agregação, esse perfil sigmoideal será afetado, assumindo um perfil mais retilíneo (**Fig. 18**) (BATZLI; LOVE, 2015).

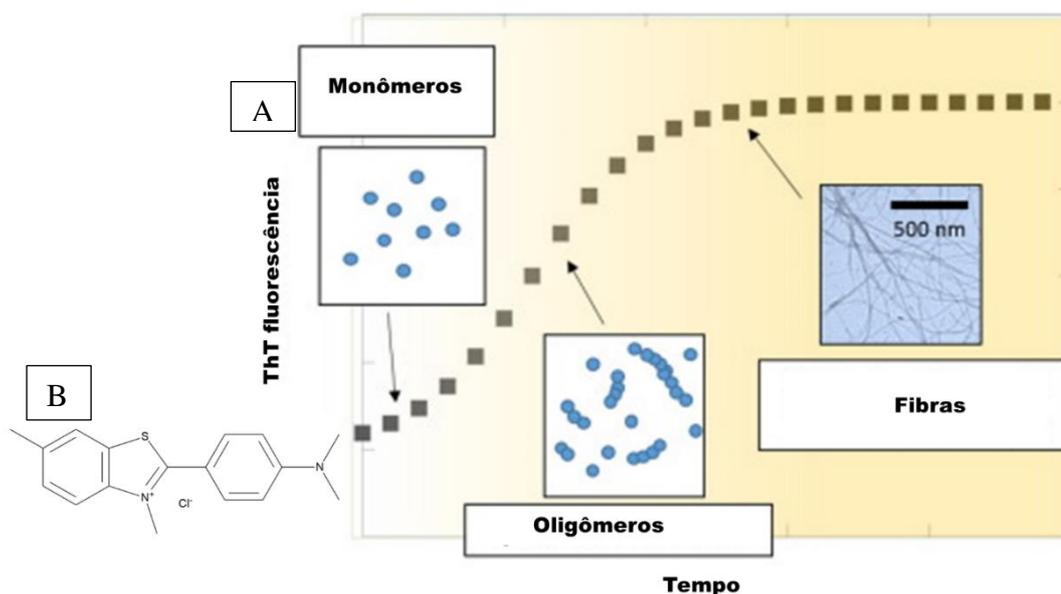


Figura 18 - Perfil de agregação em ensaios com ThT (adaptado de BATZLI; LOVE, 2015): A – curva cinética obtida nos ensaios de agregação amiloide com uso do cromóforo tioflavina T; B – estrutura do ThT.

Em nossas análises, todos os extratos de *L. aristata* e *L. brasiliensis* apresentam um comportamento que indica certo grau de inibição (**Fig. 19**), com exceção dos extratos em hexano (**Fig. 19B** e **15G**). Para estes, a estabilização da curva já no estágio platô apresenta tempo similar ao visto com o controle positivo constituído da amilina humana sem adição de

aditivos (tampão fosfato). Vemos um perfil mais retilíneo para as amostras da partição em diclorometano, principalmente para *L. brasiliensis* (Fig. 19H), com pequenos incrementos de fluorescência, entretanto com valores abaixo do observado para o controle de amilina (em tampão fosfato) e de curcumina em mesmo tempo de análise, o que indica um potencial de inibição da agregação amiloide.

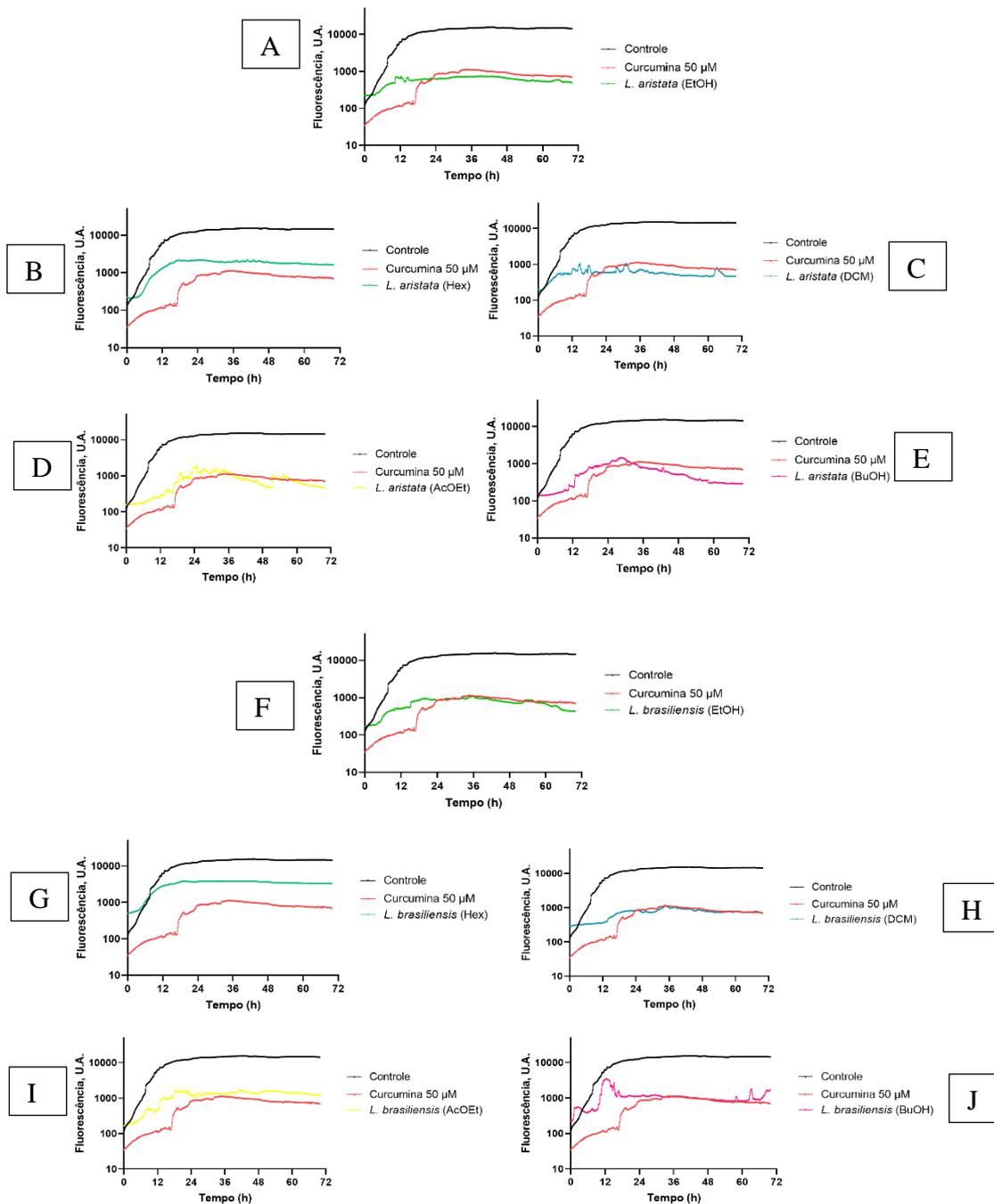


Figura 19 - Gráficos do ensaio fibrilação amiloide frente aos extratos de *L. aristata* e *L. brasiliensis*: **A** - *L. aristata* (etanol) - verde; **B** - *L. aristata* (hexano) – verde-água; **C** - *L. aristata* (diclorometano) – azul; **D** - *L. aristata* (acetato de etila) – amarelo; **E** - *L. aristata* (butanol) – rosa. **F** - *L. brasiliensis* (etanol) - verde; **G** - *L. brasiliensis* (hexano) – verde-água;

H - *L. brasiliensis* (diclorometano) – azul; **I** - *L. brasiliensis* (acetato de etila) – amarelo; **J** - *L. brasiliensis* (butanol) – rosa. Amilina em tampão: controle negativo em preto; curcumina: controle positivo em vermelho.

Para a espécie *L. rubella*, nota-se um perfil similar aos obtidos com os extratos de *L. aristata* e *L. brasiliensis* com destaque para o extrato em diclorometano, que apresenta incremento de fluorescência nas primeiras 20h, com posterior redução e estabilização até ao final do ensaio apresentando perfil linear e com nível de fluorescência inferior ao visto com o controle de curcumina (**Fig. 20C**).

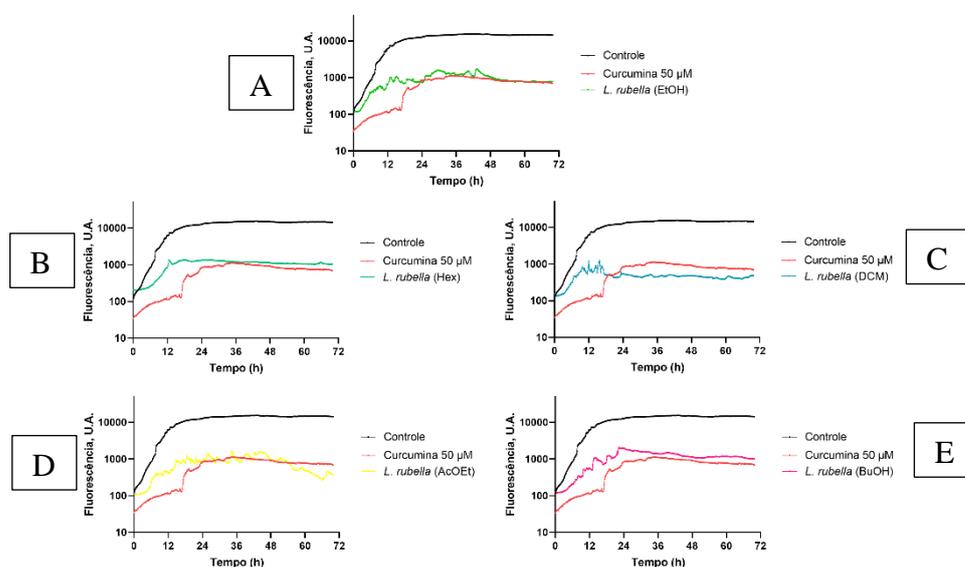


Figura 20 - Gráficos do ensaio fibrilação amiloide frente aos extratos de *L. rubella*: **A** - *L. rubella* (etanol) - verde; **B** - *L. rubella* (hexano) – verde-água; **C** - *L. rubella* (diclorometano) – azul; **D** - *L. rubella* (acetato de etila) – amarelo; **E** - *L. rubella* (butanol) – rosa. Amilina em tampão: controle negativo em preto; curcumina: controle positivo em vermelho.

Os extratos das espécies *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* apresentam respostas similares no ensaio de fibrilação amiloide (**Fig. 21**), os extratos em hexano alcançam o estágio platô em menos de 12h de ensaio, sendo semelhante ao tempo e nível de fluorescência observado com o controle de amilina sem aditivos. O extrato em diclorometano de *L. rotundifolia* (**Fig. 21G**) apresenta um incremento de fluorescência nas primeiras 12h de ensaio, com aparente redução e estabilidade do sinal de fluorescência até ao fim do ensaio apresentando nível inferior ao visto com o controle de curcumina. Este perfil pode indicar a manutenção de fase anterior ao estágio das fibras amiloides. Além disso, os extratos em acetato de etila de ambas as espécies (**Fig. 21C** e **H**) apresentam perfil similar ao da curcumina, substância utilizada como padrão de referência de inibição.

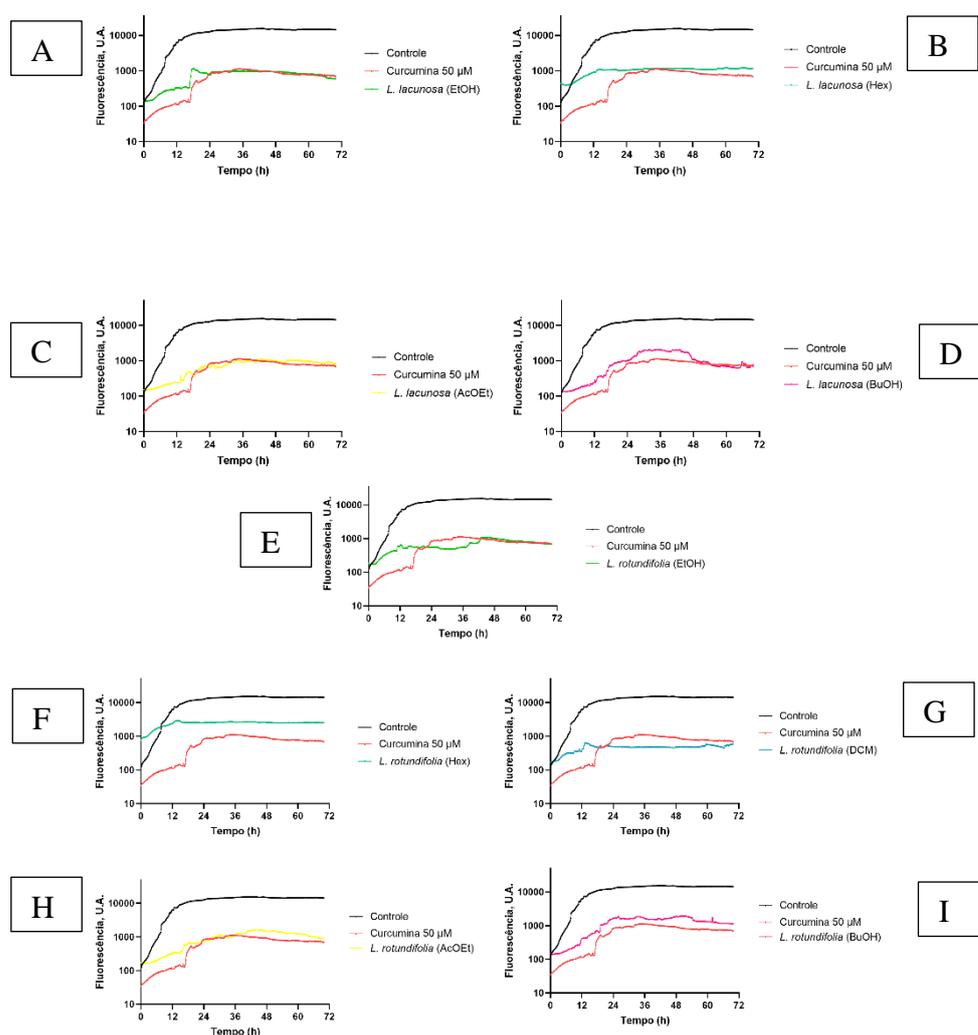


Figura 21 - Gráficos do ensaio de fibrilação amiloide frente aos extratos de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*: **A** - *L. lacunosa* (etanol) - verde; **B** - *L. lacunosa* (hexano) – verde-água; **C** - *L. lacunosa* (acetato de etila) – amarelo; **D** - *L. lacunosa* (butanol) – rosa. **E** - *L. rotundifolia* (etanol) - verde; **F** - *L. rotundifolia* (hexano) – verde-água; **G** - *L. rotundifolia* (diclorometano) – azul; **H** - *L. rotundifolia* (acetato de etila) – amarelo; **I** - *L. rotundifolia* (butanol) – rosa. Amilina em tampão: controle negativo em preto; curcumina: controle positivo em vermelho.

Os extratos de *L. organoides* apresentaram diferentes perfis (**Fig. 22**). O extrato etanólico de *L. organoides* coletado no Vale das Videiras, LOVV (**Fig. 22A**), apresenta um incremento de fluorescência nas primeiras 12h, entretanto há uma redução deste valor e estabilidade da curva cinética até o final do ensaio. O nível de fluorescência observado se mostrou inferior ao controle negativo, amilina sem aditivo, e ao controle positivo, curcumina, indicando significativa ação deste extrato na inibição da agregação amiloide. O extrato obtido na região Norte, LOM (**Fig. 22B**), e o extrato aquoso, LOPC (**Fig. 22C**), apresentam o mesmo perfil de incremento da fluorescência em tempo inicial com aparente estabilização posterior,

entretanto com nível de fluorescência similar à vista com a curcumina, o que indica presença de substâncias com potencial capacidade inibitória da agregação, porém não apresentando resultado tão satisfatório ao visto em LOVV.

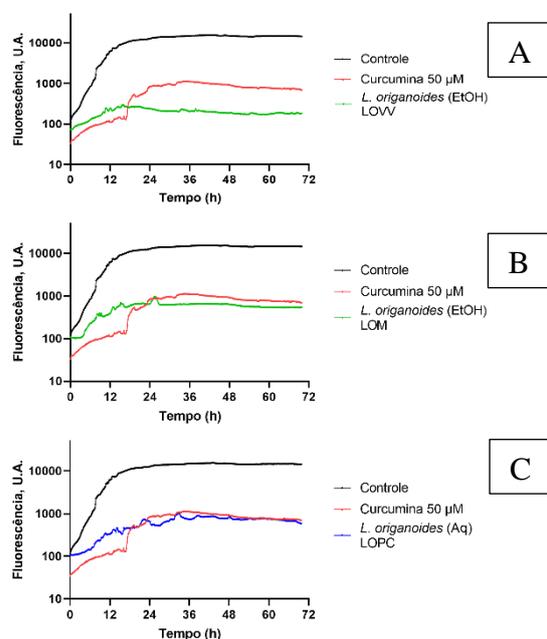


Figura 22 - Gráficos do ensaio de fibrilação amiloide frente à extratos de *L. origanoides*: **A** - LOVV: *L. origanoides* (etanólico) coletado no Vale das Videiras - verde; **B** - LOM: *L. origanoides* (etanólico) coletado em Manaus. **C** - LOPC: *L. origanoides* (aquoso) coletado em Petrópolis. Amilina em tampão: controle negativo em preto; curcumina: controle positivo em vermelho.

Em resumo, ao analisarmos todos os extratos de *Lippia*, nota-se que os extratos em hexano não apresentaram bom perfil de inibição, mostrando uma resposta de incremento de fluorescência muito próxima à do controle negativo constituído da amilina humana em tampão fosfato (ausente de aditivos). Não se encontram relatos acerca da atividade de substâncias com característica lipofílica frente a agregação amiloide. Um exemplo de substância presente em óleo vegetal é a aglicona oleuropeína (**Fig. 9**, página 50), um secoiridoide comum em azeite de oliva extravirgem, quando ensaiado no modelo da tioflavina T foram capazes de interferir na agregação da amilina, evitando a formação de agregados tóxicos (RIGACCI et al., 2010). Trabalhos relatam a redução de agregados amiloides de A β em camundongos tratados com extrato de folhas de oliveira, onde a oleuropeína, se revelou um dos principais agentes anti-amiloidogênicos (OMAR et al., 2019). Entretanto ainda é uma substância com presença de muitos grupos oxigenados que possibilitam a formação e ligações de hidrogênio entre substância e proteína.

Substâncias polares com mais de uma unidade glicosídica são relatadas como inibidores de agregação como a rutina (YU et al., 2015). Entretanto, os extratos mais polares empregados na análise, como os butanólicos, apresentaram incremento de fluorescência do ThT próximo ao encontrado com a curcumina, entretanto com variações entre as espécies. O extrato butanólico de *L. brasiliensis* (LBB) apresenta uma elevação do nível de fluorescência ao final do tempo de análise indicando um retorno à agregação amiloide após 50 h de estabilidade. Um perfil oposto é observado em *L. aristata*, LAB, onde o nível final de fluorescência ao final do tempo da análise é similar ao visto no início do ensaio.

Avaliando o conjunto de extratos de *Lippia*, as melhores respostas foram obtidas para os extratos em diclorometano e em acetato de etila, além do extrato etanólico de *L. organoides* (LOVV), o que reforça que a atividade anti-amiloide, nestes extratos, está especialmente relacionada à participação de substâncias fenólicas.

5.2 ANÁLISES DOS EXTRATOS POR LC-MS/MS

De um modo geral, na literatura há um predomínio do emprego da fonte de ionização ESI nas análises de produtos naturais realizadas por LC-MS. Esta fonte é universalmente empregada em diversos estudos, apresentando uma capacidade de ionizar substâncias de ampla faixa de polaridade e de diferentes pesos moleculares. A fonte APCI apresenta uma capacidade de ionizar substâncias mais apolares, sem atingir uma faixa de peso molecular tão amplo quanto a ESI, mas suficiente para as análises em produtos naturais (BRECHT et al., 2020). Nosso grupo de pesquisa vem utilizando esta fonte com frequência e tem verificado sua versatilidade no estudo de extratos vegetais complexos, apresentando maior abundância de íons e maior intensidade observada (ALBINO et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2020; MENDONÇA et al., 2020).

Inicialmente, a fim de selecionar as melhores respostas analíticas, todos os extratos foram analisados com as duas fontes de ionização - ESI e APCI. A título de exemplo, na **Fig. 23**, estão representados os cromatogramas obtidos do extrato etanólico de *L. aristata* analisados tanto em ESI quanto por APCI. As diferenças nas respostas dos espectros e cromatogramas se mostraram similares para todos os extratos: os resultados obtidos com fonte de ionização ESI no modo positivo apresentaram menor intensidade dos sinais e menor definição cromatográfica, com o ruído apresentando-se mais intenso do que os constituintes do extrato. A análise no modo negativo apresentou melhor perfil, com maior intensidade, apesar do pequeno número de sinais visualmente identificados. Nas análises por APCI, em ambos os modos de ionização, foi visto

menor sinal de ruído, maior abundância de sinais e intensidade superior. Portanto, para este trabalho demos preferência ao uso da fonte APCI.

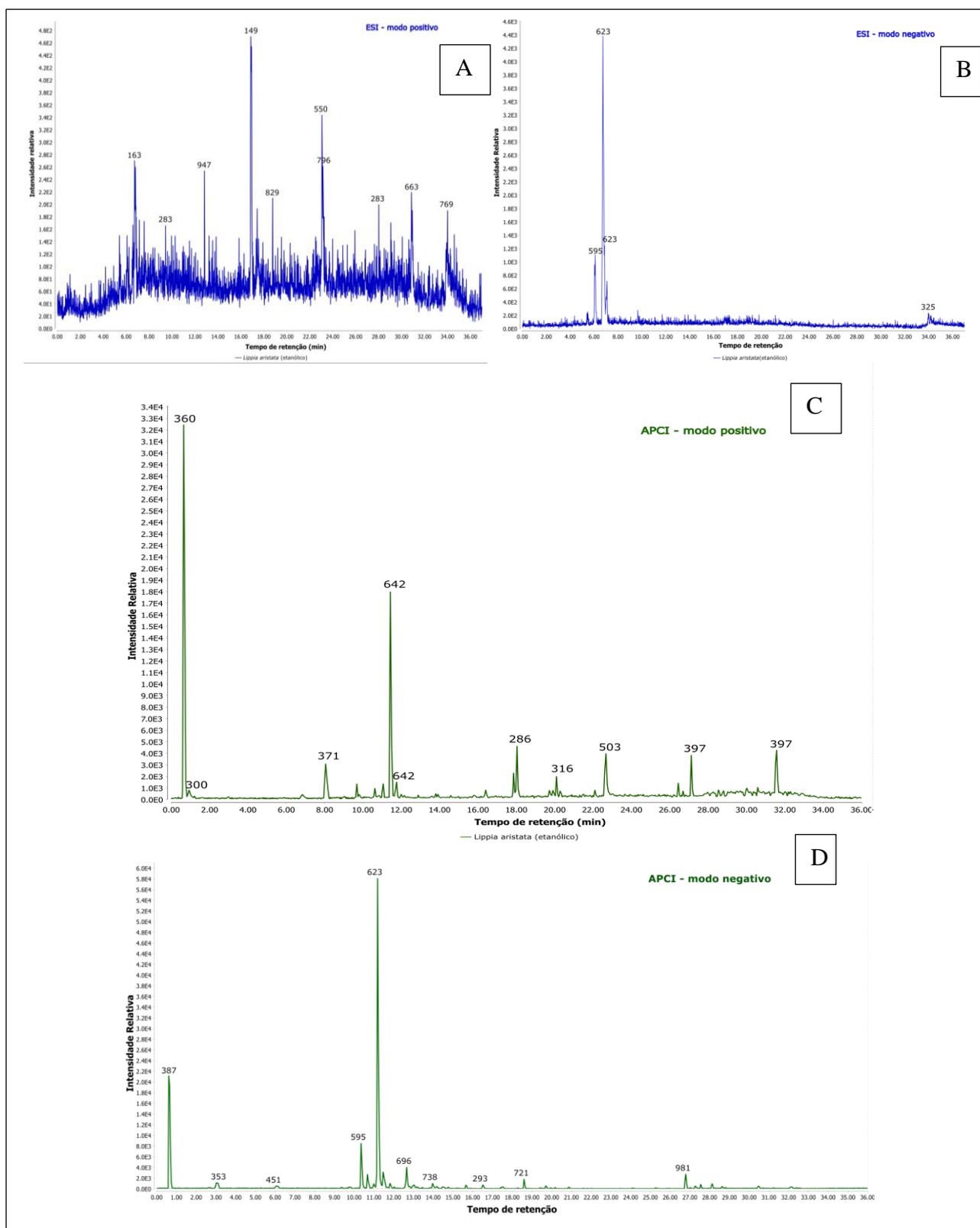


Figura 23 - Cromatogramas do extrato etanólico de *L. aristata* em ESI e APCI: **(A)** - cromatograma do extrato etanólico de *L. aristata* obtido com fonte ESI modo positivo, **(B)** modo negativo; **(C)** - com fonte APCI modo positivo e **(D)** APCI no modo negativo.

Visando melhor compreensão da composição química destes extratos, realizamos análises em mesmo método com padrões de substâncias descritas para o gênero *Lippia*. O fenilpropanoide glicosilado verbascosideo apresenta-se distribuído em toda família Verbenaceae, sendo frequentemente identificado em espécies do gênero *Lippia* (ALIPIEVA et al., 2014). A flavona glicosilada apigenina-7-*O*-glicosídeo, bem como as flavanonas agliconas naringenina, pinocembrina, sakuranetina e eriodictiol são descritos para espécies do gênero *Lippia*, principalmente, para espécies relacionadas ao orégano como *L. origanoides*, *L. palmeri*, e *L. graveolens* (FUNARI et al., 2012; STASHENKO et al., 2013; BARRETO et al., 2014; GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2017). As flavonas C-glicosiladas vitexina, isovitexina e isoorientina também são descritas para *L. origanoides*, orientina é relatada para a família Verbenaceae e putativamente identificada com base em dados de espectrometria de massas em *L. origanoides* (MARI et al., 2015; LEITÃO et al., 2017; LIANZA et al., 2022).

As análises com os padrões demonstraram maior prevalência de fragmentos a partir dos sinais detectados no modo positivo como demonstrado na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Perfil obtido com análise dos padrões por APCI no modo positivo e negativo

Padrão	R _t (min)	m/z	Aduto	MS ²
Apigenina-7- <i>O</i> -glucosídeo	11,62	433	[M+H] ⁺	271 (100)
	11,61	431	[M-H] ⁻	311 (5), 269 (100)
Vitexina/ Isovitexina	10,81	433	[M+H] ⁺	415 (100); 397 (55), 379 (20), 367 (40), 313 (20)
	10,78	431	[M-H] ⁻	341 (6), 311 (100), 283 (5)
Orientina/ Isoorientina	10,37	449	[M+H] ⁺	431 (100), 413 (55), 383 (50), 353 (20), 329 (25)
	10,33	447	[M-H] ⁻	369 (10), 357 (50), 327 (100)
Naringenina	13,60	273	[M+H] ⁺	-
	13,56	271	[M-H] ⁻	177 (30), 151 (100)
Pinocembrina	16,04	257	[M+H] ⁺	213 (100), 129 (20)
	16,04	255	[M-H] ⁻	255 (10), 213 (100), 187 (15), 169 (10), 151 (35)
Sakuranetina	15,98	287	[M+H] ⁺	299 (20), 285 (100), 203 (10)
	15,93	285	[M-H] ⁻	268 (100)
Eriodictiol	12,67	289	[M+H] ⁺	289 (100), 271, 247, 179, 163 (80), 153 (45)
	12,65	287	[M-H] ⁻	269 (6), 151 (100), 135 (8)
Verbascosideo	11,17	642	[M+NH ₃] ⁺	470 (100), 325 (50), 309 (20)
	11,15	623	[M-H] ⁻	461 (100), 315 (5)

Utilizando a comparação com o padrão foi possível indicar a presença de algumas substâncias nos extratos de espécies de *Lippia* envolvidos no trabalho. Foi considerada a

variação máxima de 0,5 minutos em relação ao tempo de retenção observado na amostra e no padrão (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Detecção de sinais dos padrões localizados nas análises dos extratos por APCI modo positivo e negativo.

Extrato	Vitexina/ Isovitexina	Orientina/ Isoorientina	Naringenina	Pinocembrina	Verbascosideo
LAA	P	-	-	-	P
LAB	-	-	-	-	P
LBA	-	-	-	-	P
LBB	-	-	-	-	P
LRuE	-	-	-	-	P
LRuA	P	-	-	-	P
LRuB	-	-	-	-	P
LRoE	-	-	-	-	P
LRoA	-	-	-	-	P
LRoB	-	-	-	-	P
LLE	-	-	-	-	P
LLA	-	-	-	-	P
LOVV	-	-	P	P	P
LOM	P	P	P	P	-
LOPC	P	P	P	-	P

Legenda: P: presente, ND: não detectado; LAA: *L. aristata* (acetato de etila); LAB: *L. aristata* (butanol); LBA: *L. brasiliensis* (acetato de etila); LBB: *L. brasiliensis* (butanol); LRuE: *L. rubella* (etanol) LRuA: *L. rubella* (acetato de etila); LRuB: *L. rubella* (butanol); LRoE: *L. rotundifolia* (etanol); LRoA: *L. rotundifolia* (acetato de etila); LRoB: *L. rotundifolia* (butanol); LLE: *L. lacunosa* (etanol); LLA: *L. lacunosa* (acetato de etila); LOVV: *L. origanoides* (etanol) coletado no Vale das Videiras; LOM: *L. origanoides* (etanol) coletado em Manaus; LOPC: *L. origanoides* (resíduo aquoso) coletado em Petrópolis.

Como esperado, o verbascosideo se mostrou presente nos extratos em etanol, em acetato de etila ou em butanol de todas as espécies, incluindo para espécies de *L. brasiliensis* e *L. aristata* que não possuem trabalhos sobre a composição química fixa ou da presença deste fenilpropanoide. Entretanto, não foi detectado no extrato de LOM, apenas em LOVV e LOPC. Vale ressaltar, no entanto, que alguns destes sinais podem estar relacionados à isômeros de mesma massa deste fenilpropanoide, visto o tempo de retenção e fragmentação semelhante entre essas substâncias.

Dos sete padrões de flavonoides utilizados, apigenina-7-*O*-glucosídeo, sakuranetina e eridictiol não foram localizados em nenhum dos extratos analisados. Para os extratos das espécies *L. aristata* (acetato de etila) e *L. rubella* (acetato de etila) foi visto a presença de vitexina ou seu isômero isovitexina, flavonoides que ainda não possuem relatos de presença nestas espécies na literatura. Para os extratos da espécie de *L. origanoides* foram localizados quatro flavonoides com variação da presença destes em cada extrato. No extrato LOVV, foi detectada a presença dos flavonoides naringenina e pinocembrina. Em relação ao extrato de LOPC, foram localizados os flavonoides orientina/isoorientina, vitexina/isovitexina e

naringenina. Sendo este o único extrato com detecção dos flavonoides C-glicosilados em ambos modos de ionização. Para LOM, foi visto a presença dos quatro flavonoides detectados nos demais extratos de *L. origanoides*.

Fenilpropanoides, comumente encontrado em extratos em acetato de etila, são relatados como inibidores da agregação amiloide (SUN et al., 2020). Considerando os resultados obtidos nas análises de fibrilação amiloide onde os extratos em diclorometano, acetato de etila e etanólico de *L. origanoides* (LOVV) apresentaram resultados mais satisfatórios, verificamos a presença do verbascosideo em alguns destes extratos. Destacamos a presença nos extratos em acetato de etila de *L. aristata* (LAA), *L. rubella* (LRuA), *L. lacunosa* (LLA), *L. rotundifolia* (LRoA) e *L. brasiliensis* (LBA), além do extrato etanólico LOVV (**Tabela 2**). O verbascosideo (**Fig. 24A**) é relatado como inibidor da agregação de A β associada a metal ou livre, *in vitro*, e inibição de agregação de tau *in vivo* (camundongos) apresentando efeitos positivos significativos na regulação do estresse no retículo endoplasmático, levando a maior neuroproteção (KORSHAVN et al., 2015; WANG et al., 2020). O isoverbascosideo (**Fig. 24B**) também está relacionado à diminuição de depósitos amiloides *in vivo* (ratos), além de inibir e promover a degradação de A β *in vitro* (SHIAO et al., 2017). Esses resultados indicam um potencial de ação do verbascosideo e seus isômeros, comumente relatados no gênero *Lippia*, podendo estar relacionados ao perfil de inibição amiloide obtido nestes ensaios. Entretanto, o resultado de maior estabilidade na inibição da agregação amiloide obtido com o extrato LOVV parece estar mais relacionado à presença das flavanonas agliconas.

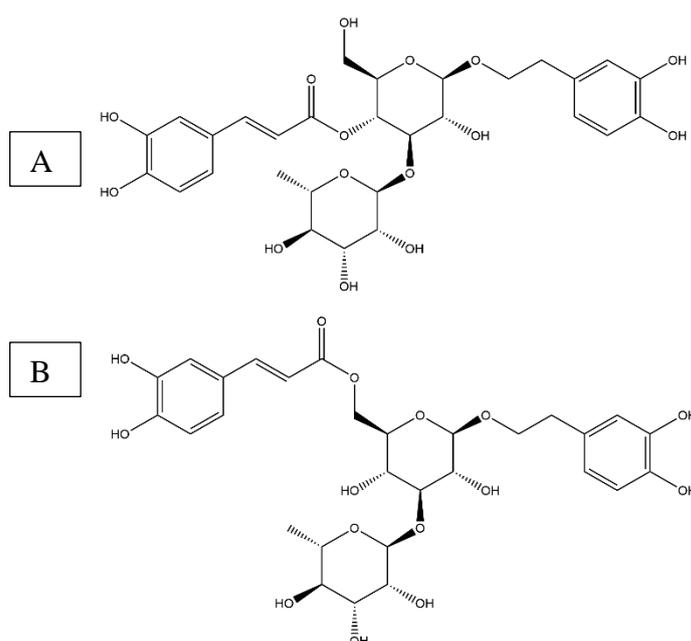


Figura 24 - Estrutura do verbascosideo (A) e do isoverbascosideo (B)

5.2.1 ANÁLISE POR LC-MS DOS EXTRATOS DE *L. origanoides* NO MODO POSITIVO

A análise dos cromatogramas dos extratos de *L. origanoides* obtidos com a fonte APCI no modo positivo demonstra significativa diferença entre eles (**Fig. 25**). Visualmente, os íons que se destacam como semelhantes entre os três extratos são $[M+H]^+$ m/z 288 e $[M+H]^+$ m/z 316 com tempos de retenção próximos entre si. Os íons $[M+H]^+$ m/z 502 e 501 foram vistos em todas as análises, mesmo naquelas utilizando apenas os solventes da fase móvel (branco), tornando dúbida a interpretação da presença destes íons nas amostras. Apesar do uso de mesmo solvente extrator para os extratos LOVV e LOM, existem diferenças visíveis entre os perfis químicos dos dois extratos como, por exemplo, a presença do íon $[M+H]^+$ m/z 621 em *L. origanoides* cultivada em Manaus. Apesar da menor riqueza de sinais no extrato de LOPC frente aos extratos etanólico, a maior intensidade total do cromatograma foi obtida nas análises deste extrato.

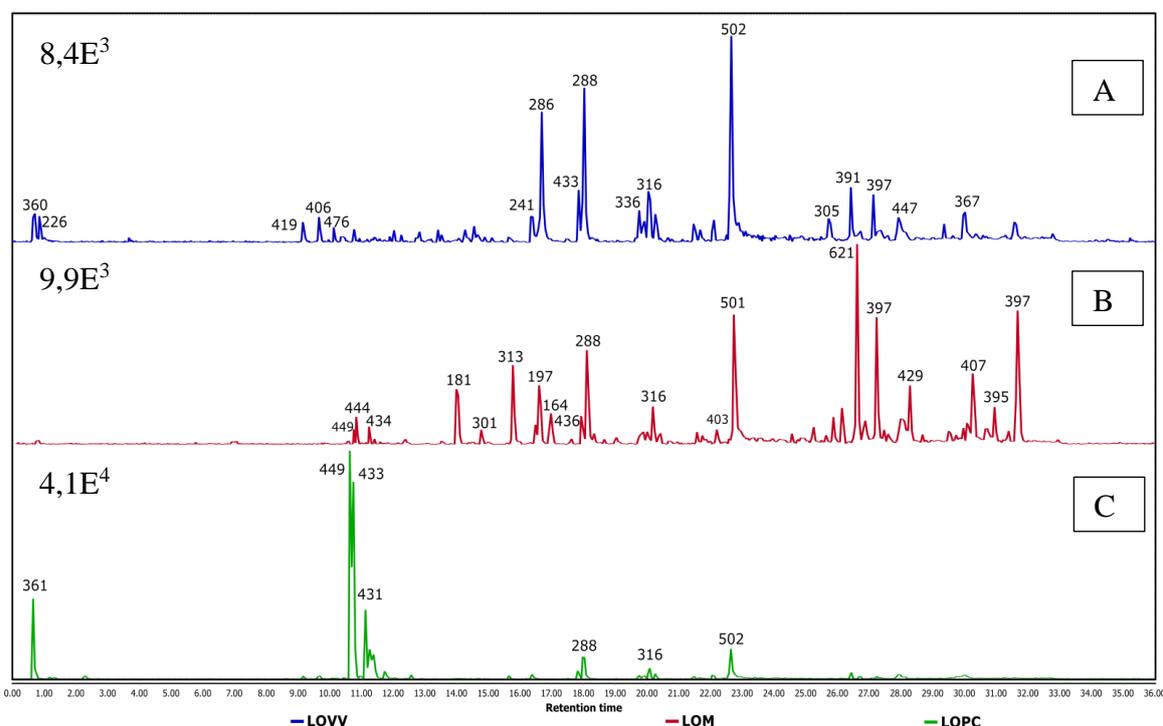


Figura 25 - Cromatogramas dos extratos de *L. origanoides* em APCI positivo: **A** - LOVV: *L. origanoides* (etanólico) coletado no Vale das Videiras; **B** - LOM: *L. origanoides* (etanólico) cultivada em Manaus. **C** - LOPC: *L. origanoides* (aquoso) cultivada em Petrópolis.

Para maior compreensão das diferenças entre os extratos desta espécie, foi realizado as análises de PCA. Esta é uma das ferramentas não-supervisionadas mais empregadas nos estudos quimiométricos por possibilitar a compreensão da forma como as amostras interagem entre si, bem como de padrões ou agrupamentos. (SMOLINSKA et al., 2012; PILON et al., 2020). O total de sinais obtidos após o processamento dos dados no *software* MZmine foi utilizado para estas análises. As separações obtidas na PCA (**Fig. 26**) corroboram as diferenças observadas visualmente nos cromatogramas com fonte operada no modo positivo (**Fig. 25**). As triplicatas de injeção agrupam-se por extrato, mas os mesmos se diferem entre si indicando uma diferença significativa na composição química destes.

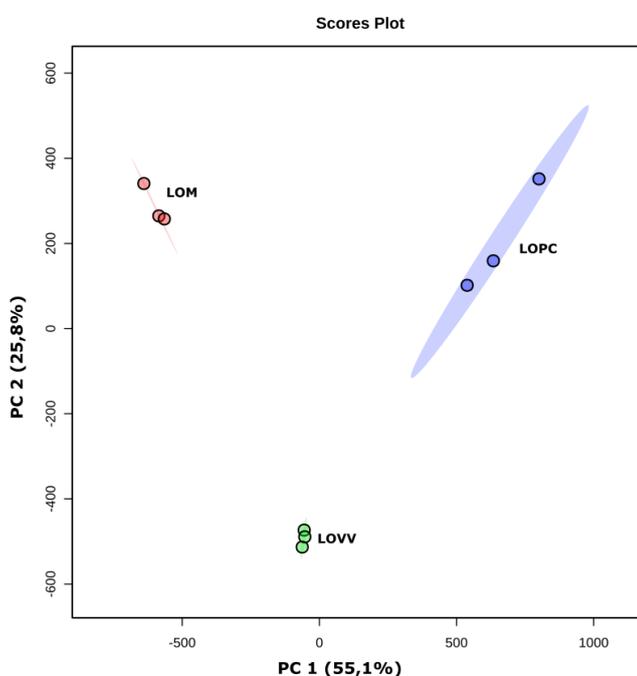


Figura 26 - Scores plot por PCA dos agrupamentos dos extratos após processamento em APCI positivo.

LOVV: *L. origanoides* (etanólico) coletado no Vale das Videiras em verde; LOM: *L. origanoides* (etanólico) cultivada em Manaus em vermelho; LOPC: *L. origanoides* (aquoso) cultivada em Petrópolis em azul.

Visto a separação obtida com a PCA, realizamos por PLS-DA visando indícios dos íons mais significativos para a diferenciação destes extratos. Este é um método supervisionado que permite maximizar a separação entre os grupos avaliados construindo um modelo que separa os diferentes grupos de amostras com base em suas variáveis, ou seja, as características dos metabólitos detectados nos diferentes extratos de *Lippia origanoides*. No gráfico de scores visualiza-se a separação dos grupos e no gráfico de loadings pode-se investigar os principais íons se destacam na discriminação das amostras, semelhante ao visto nas análises em PCA

(WANT; MASSON, et al., 2011; PILON *et al.*; 2020). Nos nossos resultados, verificamos uma significativa separação entre os extratos utilizando os dados do modo positivo (**Fig. 27**). Os 5 íons de maior destaque na separação de cada um dos extratos são: $[M+H]^+$ m/z 285, 285, 240, 307 e 336 para LOVV; $[M+H]^+$ m/z 449, 360, 433, 449 e 449 para LOPC; e $[M+H]^+$ m/z 397, 621, 409, 315 e 397 para LOM (**Fig. 27B**).

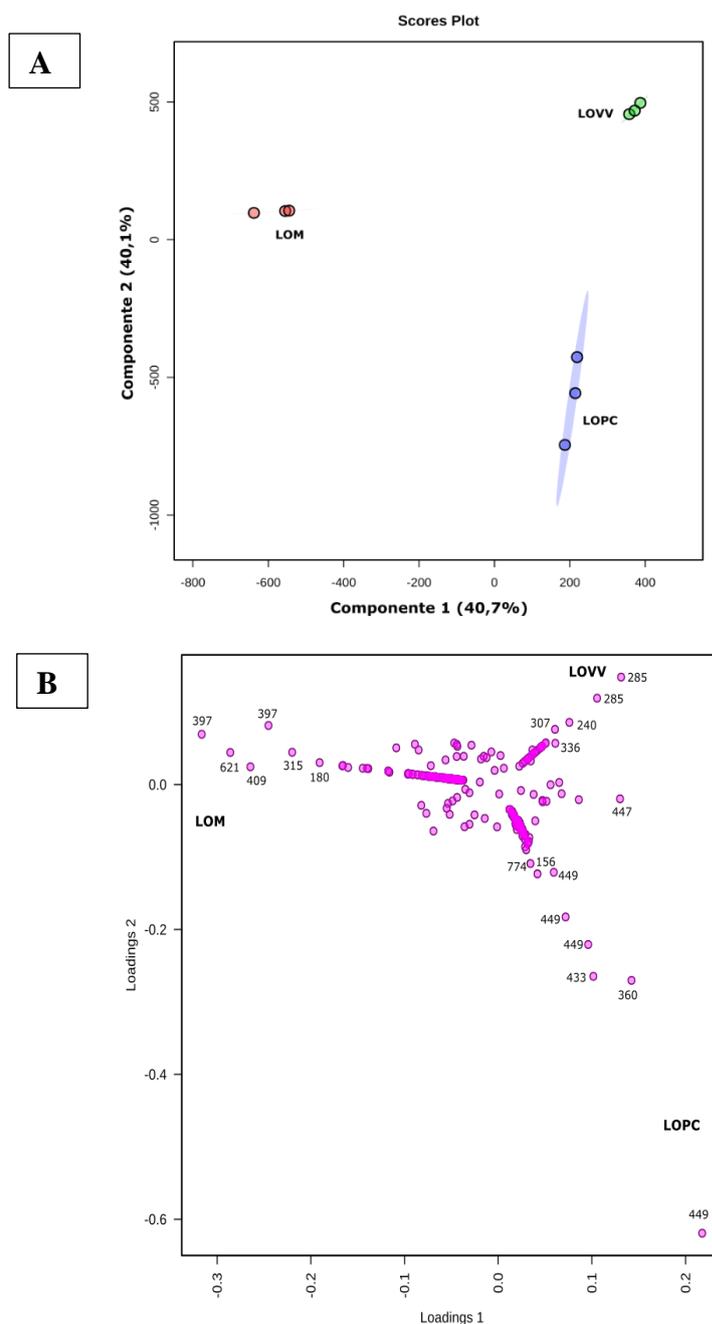


Figura 27 - Análises PLS-DA dos íons obtidos após processamento dos dados no modo positivo: **A** - *Scores plot* por PLS-DA dos agrupamentos dos extratos; **B** - gráfico de *loadings* em APCI positivo. LOVV: *L. origanoides* (etanólico) coletado no Vale das Videiras; LOM: *L. origanoides* (etanólico) cultivada em Manaus; LOPC: *L. origanoides* (aquoso) cultivada em Petrópolis.

No cromatograma do extrato LOM, o íon m/z 397 é detectado em dois diferentes tempos de retenção médio (T_{rm}) distintos: 27,12 min e T_{rm} : 31,57 min. Apesar desta diferença, o perfil de fragmentação é similar aos dois, com sinais $[M+H]^+$ m/z 315, 287, 261, 257, 243, 189, 147 e 161. Tal semelhança parece indicar se tratar de íons isóbaros com características compatíveis com a fragmentação de um fitoesterol. O β -sitosterol (peso molecular 414, **Fig. 28**), comumente apresenta pico base com perda de uma molécula de água em análises utilizando APCI em modo positivo, além de fragmento em $[M+H]^+$ m/z 161, correspondente à clivagem do anel C do esteroide (MO et al., 2013). A presença de outros íons diagnósticos é relatada no trabalho de Patel et al. (2021) utilizando mesma fonte de ionização como $[M+H]^+$ m/z 287, 257, 147. A presença deste fitoesteroide já foi relatada no extrato metanólico de *Phyla sidoides*, espécie pertencente à família Verbenaceae, e anteriormente pertencente ao gênero *Lippia* (MACAMBIRA et al., 1986). Além do mais, o β -sitosterol é de ocorrência comum no reino vegetal.

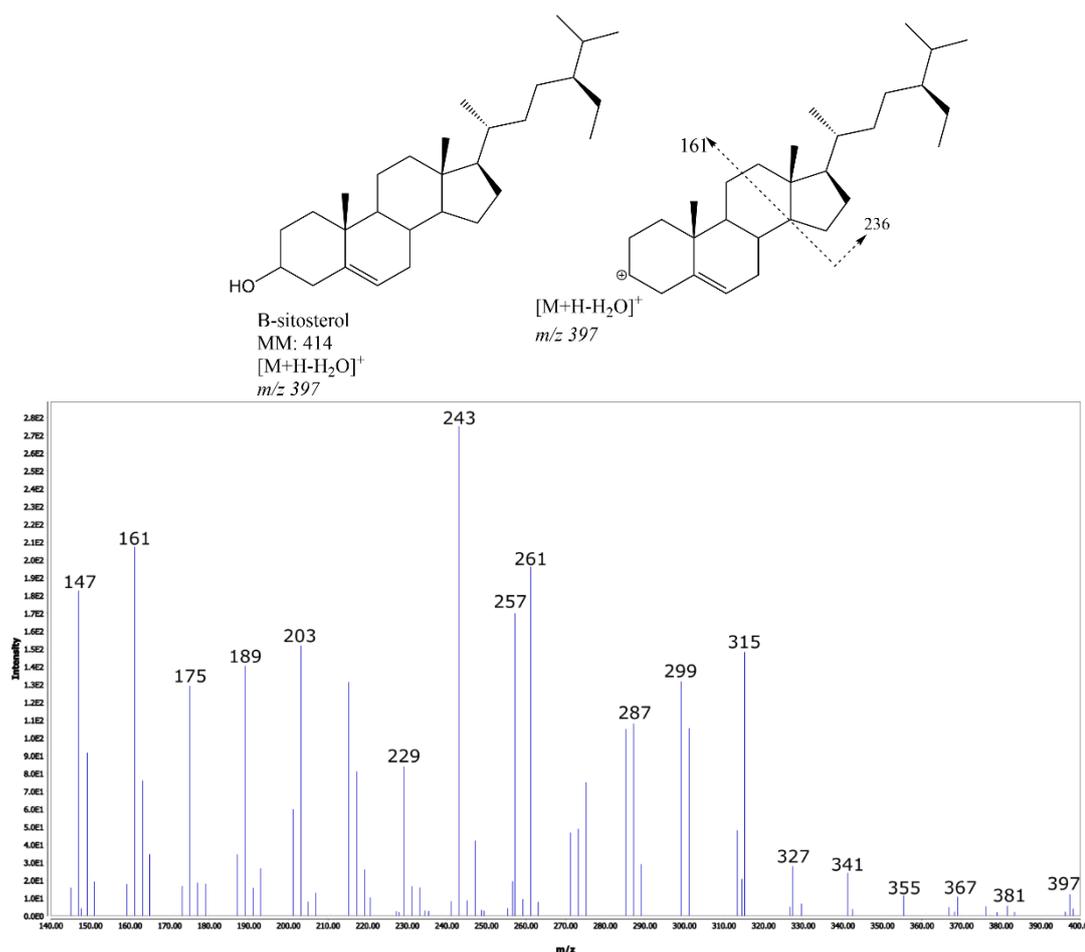


Figura 28 – Estrutura do β -sitosterol e perfil de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 397

O sinal de $[M+H]^+$ m/z 315 (T_{m} : 16,80 min) apresenta, como principal fragmento, $[M+H]^+$ m/z 300 e fragmentos menos intensos de $[M+H]^+$ m/z 297, 282, 269, 256 (**Fig. 29**). Esse padrão de fragmentação é compatível com flavonoides monometoxilados, com perda inicial de metila (-15, $[M+H-CH_3]^+$), sinal em $[M+H]^+$ m/z 300, como visto no trabalho de LEAL (2021) na fragmentação utilizando fonte APCI em modo positivo do flavonoide 3,7- di-*O*-metil-kaempferol ($[M+H]^+$ m/z 315). Entretanto, os demais fragmentos não são compatíveis aos apresentados neste trabalho, indicando se tratar de outra substância de mesma massa. Vale ressaltar, o indício de perda de molécula de água, indicando presença de grupo hidroxila nesta estrutura (-18, $[M+H-CH_3-H_2O]^+$), sinal em $[M+H]^+$ m/z 282.

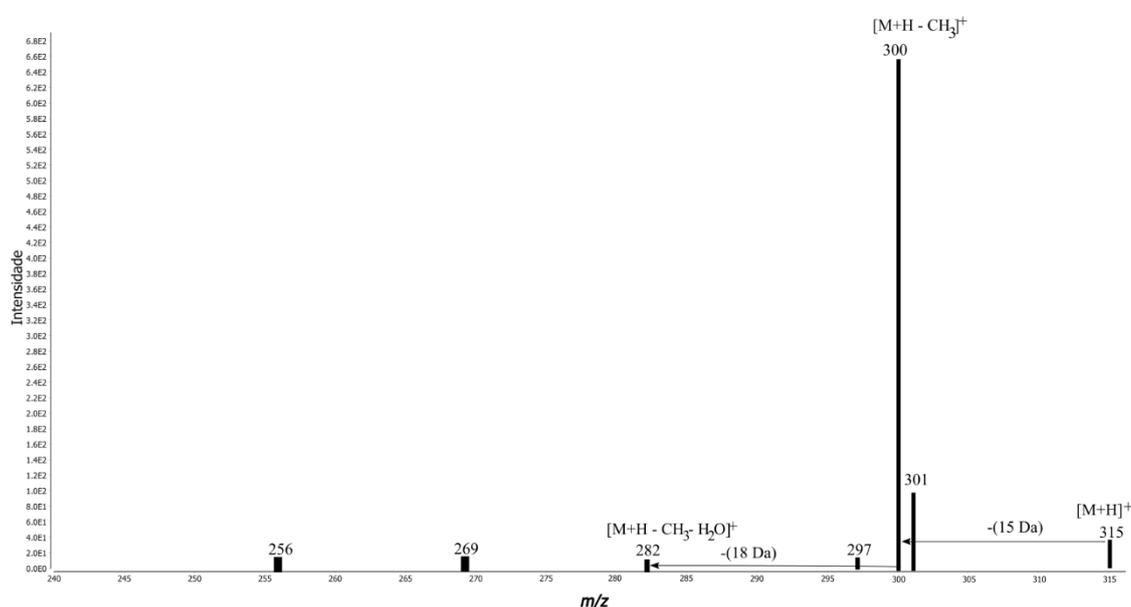


Figura 29 – Perfil de fragmentação do sinal de $[M+H]^+$ m/z 315

Ademais, este íon de $[M+H]^+$ m/z 315 apresenta semelhanças com o flavonoide circimaritina (peso molecular 314 Da) tendo perfil de comprimento de onda compatível (**Fig. 30**) com o demonstrado no trabalho de Grayer (2000), apresentando sinais em 275 e 336 nm. Entretanto não foi localizado trabalhos relatando o perfil de fragmentação deste flavonoide. Esta flavona é descrita para a espécie *L. graveolens* (LIN et al., 2007). Não foram encontrados trabalhos relatando a atividade inibidora de agregação amiloide para este flavonoide, entretanto foi demonstrado a capacidade de modulação do apoptose em células β pancreáticas (LEE et al., 2017).

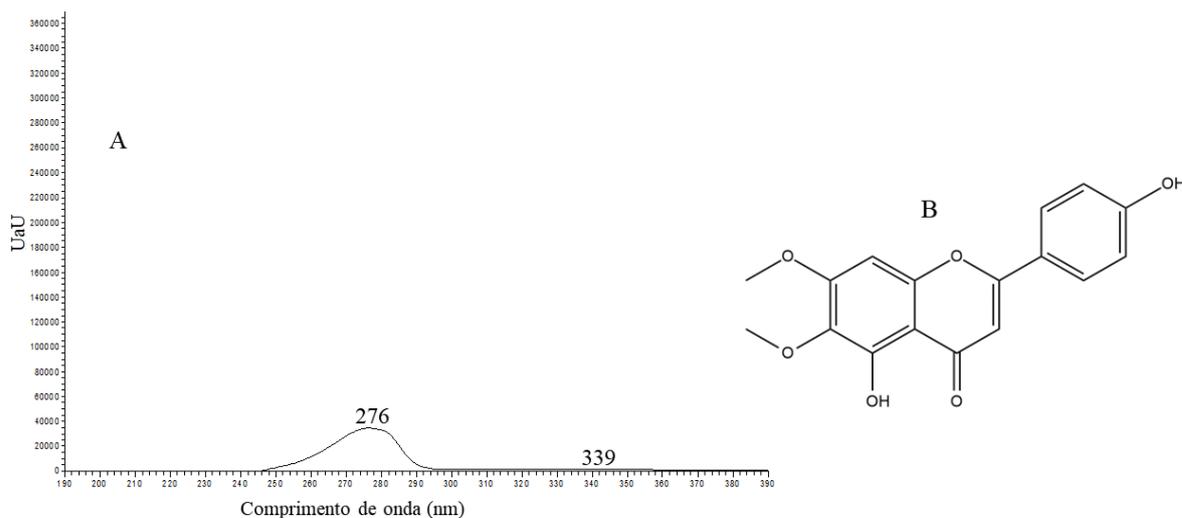


Figura 30 - Espectro ultravioleta do sinal de $[M+H]^+$ m/z 315 (A) e estrutura da cirsimaritina (B)

Os íons $[M+H]^+$ m/z 621 (T_{rm} : 26,50 min) e $[M+H]^+$ m/z 409 (T_{rm} : 29,86 min) de LOM não foram identificados.

Em LOPC, o íon que mais se destaca é o de $[M+H]^+$ m/z 449 (T_{rm} : 10,70 min). Este foi putativamente identificado como orientina (peso molecular: 448Da) (Fig. 31), ou seu isômero isoorientina, por similaridade do seu perfil de fragmentação em comparação com a mistura padrão destes flavonoides, utilizada como referência. Destacam-se os fragmentos $[M+H]^+$ m/z 431 (pico base), 413, 395, 383, 353, 329, 299 e 287.

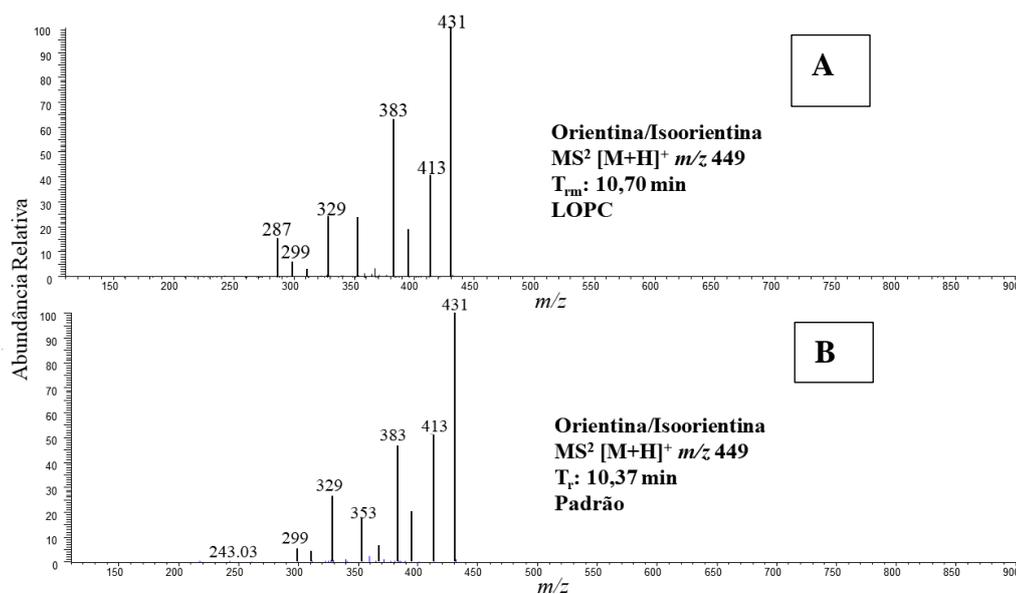


Figura 31 – Perfil de fragmentação do íon de $[M+H]^+$ m/z 449 no modo positivo: A – amostra LOPC; B – padrão orientina/isoorientina.

Com o uso do padrão contendo os flavonoides *C*-glicosilados vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina, foi possível a caracterização do íon $[M+H]^+$ m/z 433 (T_{rm} : 11,13 min) como vitexina ou seu isômero isovitexina (**Fig. 32**). Destacam-se os fragmentos $[M+H]^+$ m/z 415 (pico base), 397, 367, 313 e 285.

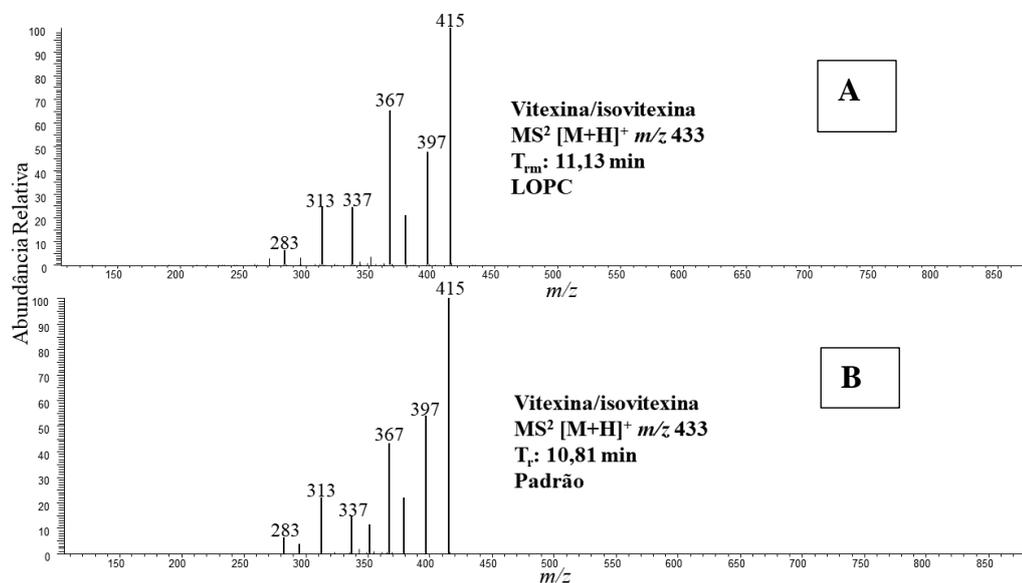


Figura 32 - Perfil de fragmentação do íon de $[M+H]^+$ m/z 433 no modo positivo: **A** - amostra LOPC; **B** - padrão vitexina/isovitexina.

O perfil de fragmentação destes flavonoides *C*-glicosilados caracteriza-se pela perda de moléculas de água inicialmente e da fragmentação da unidade glicosídica (**Fig. 33**) (WARIDEL et al., 2001).

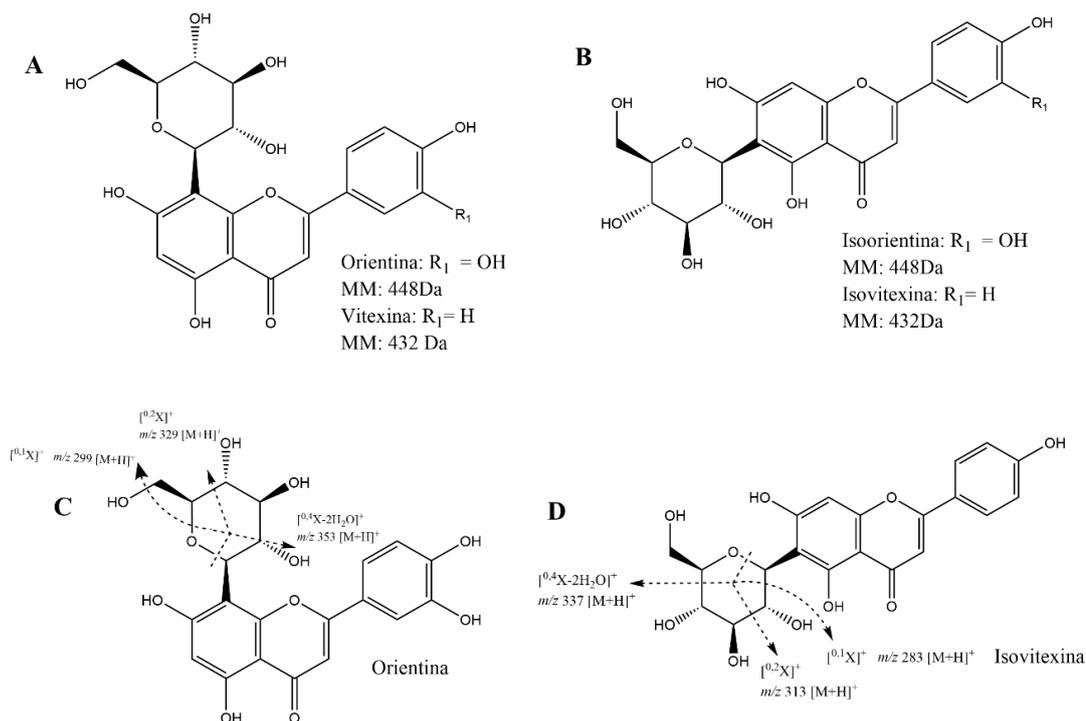


Figura 33 - Estrutura dos flavonoides C-glicosilados: **A**- orientina/vitexina, **B** – isovitexina/isoorientina, **C** – fragmentação da unidade glicosídica em orientina, **D** – fragmentação da unidade glicosídica em isovitexina.

Dentre as substâncias anotadas, algumas têm relato na literatura de interação com proteínas amiloidogênicas. A isoorientina, por exemplo, demonstrou capacidade de inibir enzimas relacionadas à fosforilação de proteínas envolvidas em agregados amiloides, tau, bem como inibir rotas apoptóticas desencadeadas por $A\beta$, apresentando, conseqüentemente, efeito neuroprotetor *in vitro* (LIANG et al., 2016; KIM et al., 2021). A orientina, igualmente, apresenta benefícios frente efeitos citotóxicos de agregados $A\beta$, apresentando melhora dos déficits cognitivos em camundongos, além da modulação dos níveis de estresse oxidativo e minimização da disfunção mitocondrial (YU et al., 2015). Tratamento de células com o flavonoide vitexina, antes de exposição à $A\beta$, levou ao aumento da viabilidade celular superior ao encontrado com o tratamento com quercetina e isovitexina (GUIMARÃES et al., 2015). Isso indica a ação positiva na inibição de citotoxicidade causada por agregados amiloides na presença de flavonoides glicosilados. Entretanto na investigação da inibição da conformação amiloide da proteína transtirretina, TTR, foi visto que o flavonoide luteolina apresenta efeito de estabilização da proteína, enquanto o mesmo não é visto com a substância glicosilada. Análises *in silico* demonstraram que a presença da porção glicosídica não permite a melhor conformação de ligação à proteína (IAKOVLEVA et al., 2015). Análises da interação entre a proteína e flavonoides glicosilados através de ressonância magnética nuclear demonstram que

a presença da unidade glicosídica, em especial C-glicosilação e a presença de dissacarídeos, levam à redução da afinidade de ligação em relação a oligômeros A β (GUZZI et al., 2017). Portanto, considerando a presença destes flavonoides neste extrato, a diferença no resultado obtido no ensaio de fibrilação amiloide entre LOVV e LOPC pode ser influenciada por estes flavonoides.

Por fim, o íon $[M+H]^+$ m/z 360 em LOPC, (T_{rm} : 0,66 min) não foi identificado.

Em LOVV, os íons de m/z 285 (T_{rm} : 16,66 min e 16,38 min) apresentam mesmo perfil de fragmentação, com destaque para os fragmentos $[M+H]^+$ m/z 285 (pico base), 270, 242, 225 e 167. Os fragmentos de $[M+H]^+$ m/z 270 $[M+H-CH_3]^+$ e $[M+H]^+$ m/z 242 $[M+H-CH_3-CO]^+$ são compatíveis com o relatado para o flavonoide genkwanina (**Fig. 34**) (LI et al., 2012), sendo este íon o mais relacionado à diferenciação do extrato LOVV. Este flavonoide é relatado em *L. origanoides* (sinonímia *L. rigida*), e foi anotado em trabalho recente do grupo analisando este mesmo extrato (OLIVEIRA, et al., 2013; LIANZA et al., 2022).

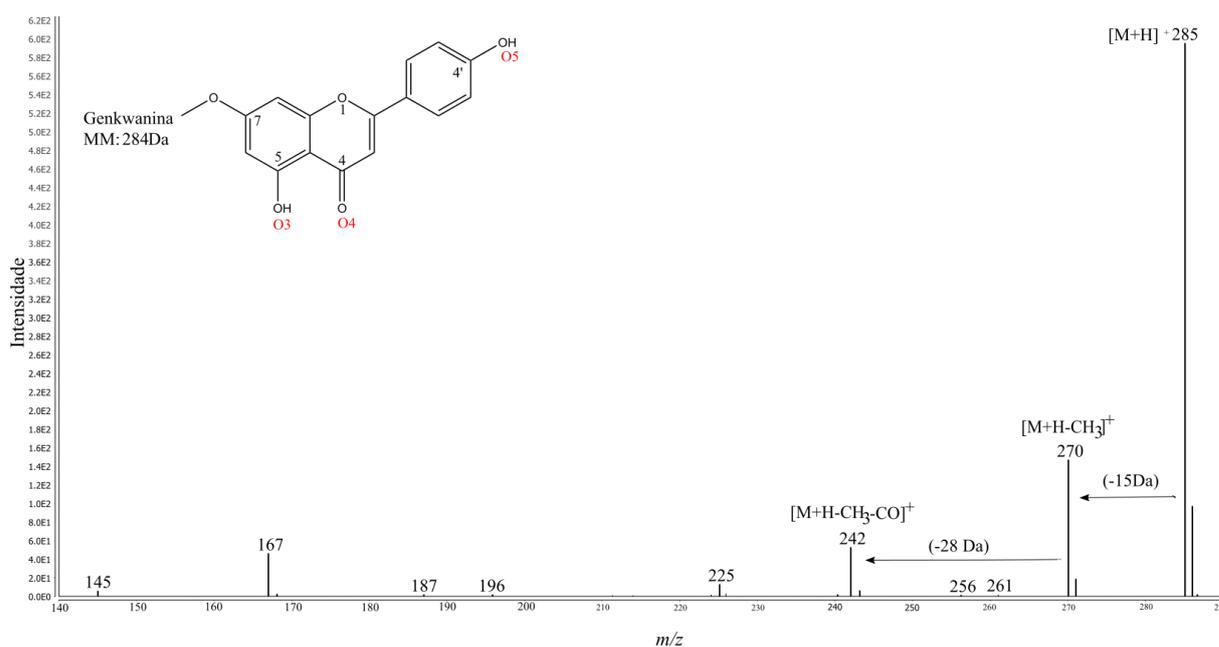


Figura 34 – Perfil de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 285 e estrutura da genkwanina.

Em trabalho de 2021, foi demonstrada a capacidade inibitória da agregação amiloide de amilina e A β pela genkwanina em ensaios de ThT, corroborada por análises de microscopia de força atômica. Além disso, ensaios de *docking* molecular demonstraram que a interação entre essa flavona e a porção amiloidogênica da amilina leva ao aumento de ligações de hidrogênio, com ação de doador ou acceptor para os átomos de oxigênio O3, O4, O5, interação π - π com o

aminoácido aromático fenilalanina (Phe23), e interação com os resíduos de asparagina (Asn22) e serina (Ser28) (XU et al., 2021).

Finalmente, os íons de $[M+H]^+$ m/z 240 (T_{rm} : 16,35 min), $[M+H]^+$ m/z 307 (T_{rm} : 25,74 min) e $[M+H]^+$ m/z 336 (T_{rm} : 19,74 min) de LOVV não foram identificados.

5.4 ANÁLISE POR LC-MS DOS EXTRATOS DE *L. origanoides* NO MODO NEGATIVO

Os cromatogramas obtidos por LC-MS utilizando a fonte APCI no modo negativo (**Fig. 35**) mostraram a presença de íons de maior peso molecular e mais apolares em LOM, quando comparado aos outros extratos. Em LOPC, destacam-se os íons de $[M-H]^-$ m/z 449 e 447, concentrados na região entre 10 e 12 minutos. Em LOVV, os sinais de maior intensidade são $[M-H]^-$ m/z 465, 287, 271 e 255, entre 10 e 16 minutos.

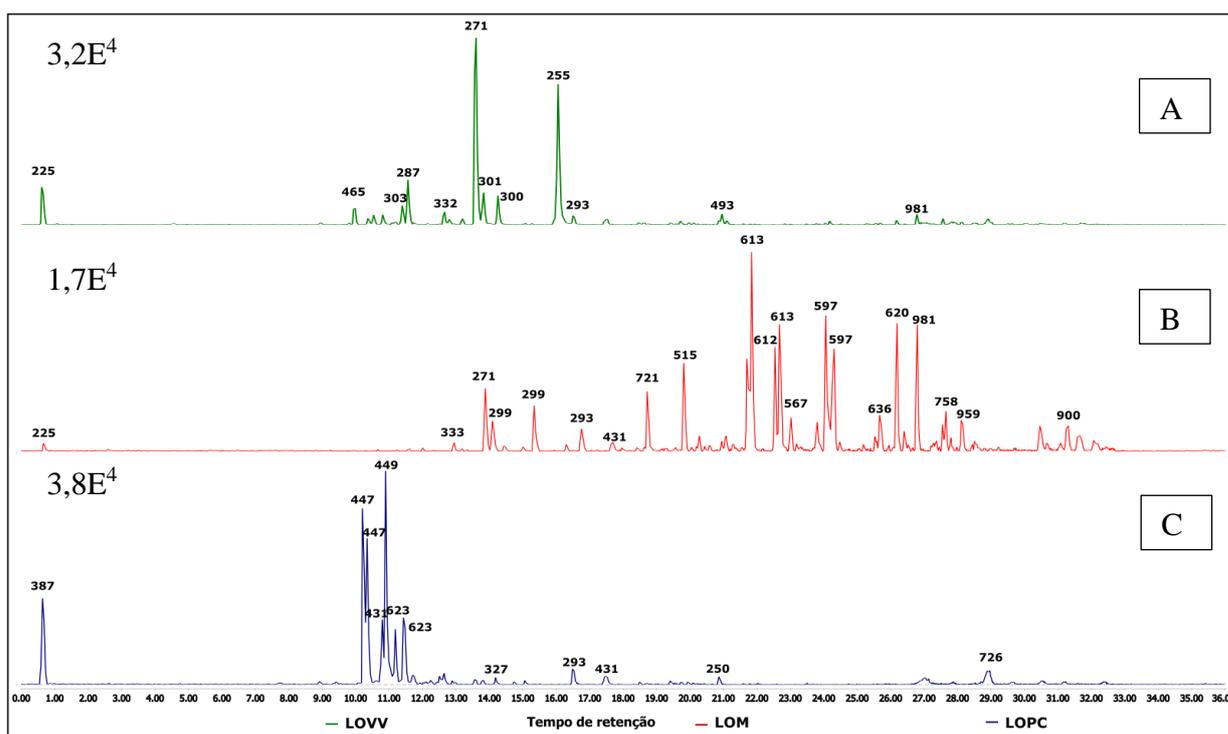


Figura 35 - Cromatogramas dos extratos de *L. origanoides* em APCI negativo: **A** - LOVV: *L. origanoides* (etanólico) coletado no Vale das Videiras; **B** - LOM: *L. origanoides* (etanólico) cultivado em Manaus; **C** - LOPC: *L. origanoides* (aquoso) cultivado em Petrópolis.

Considerando a diferença do perfil obtido com as análises no modo negativo, foi realizada as análises de PCA visando confirmar a separação destes extratos como visto no cromatograma. Assim como nas análises no modo positivo, o total de sinais obtidos após o processamento dos dados no *software MZmine* foi utilizada para estas análises. A PCA (**Fig.**

36) corrobora as diferenças observadas visualmente nos cromatogramas. As triplicatas de injeção agrupam-se por extrato e a separação obtida com as PC denotam uma diferenciação significativa entre os três extratos.

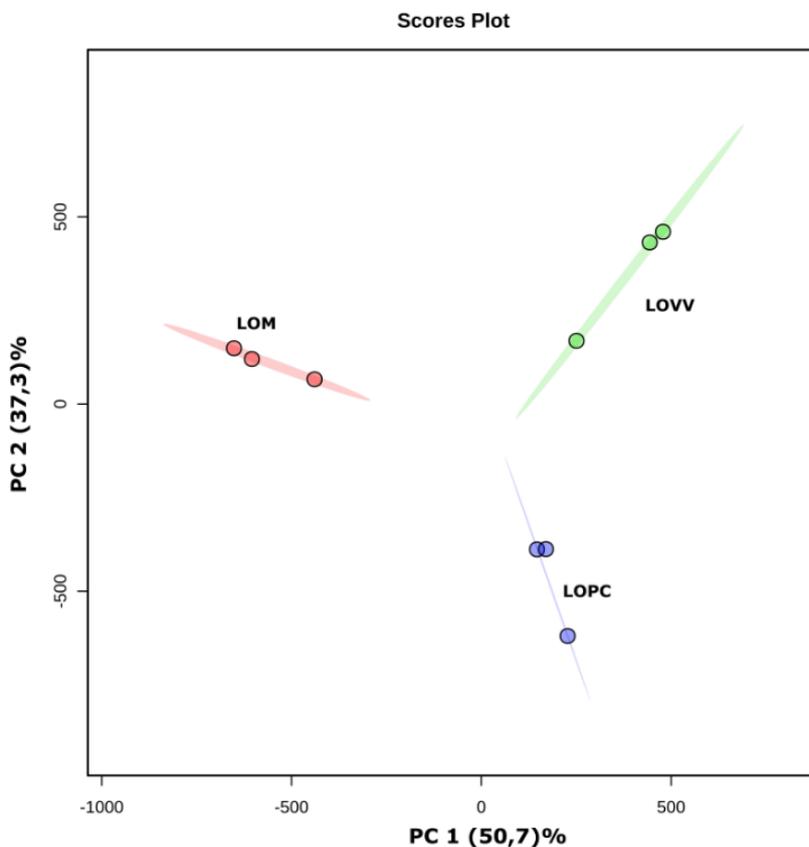


Figura 36 - Scores plot por PCA dos agrupamentos dos extratos após processamento em APCI negativo.

LOVV: *L. origanoides* (etanólico) coletado no Vale das Videiras em verde; LOM: *L. origanoides* (etanólico) coletado em Manaus em vermelho; LOPC: *L. origanoides* (aquoso) coletado em Petrópolis em azul.

Na análise por PLS-DA (**Fig. 37**), os extratos apresentam significativa separação, seguindo padrão visto na análise de PCA. No gráfico de *loadings*, indica-se maior relação dos íons de $[M-H]^-$ m/z 271, 255, 316, 283 e 287 ao extrato LOVV. Em LOPC, vemos os íons de $[M-H]^-$ m/z 447, 493, 387, 494 e 431. Para LOM, destacam-se os íons com $[M-H]^-$ m/z 597, 613, 612, 620 e 981. Esses dados reforçam a indicação visual da maior presença de íons com massa molecular mais elevadas em LOM frente aos outros dois extratos.

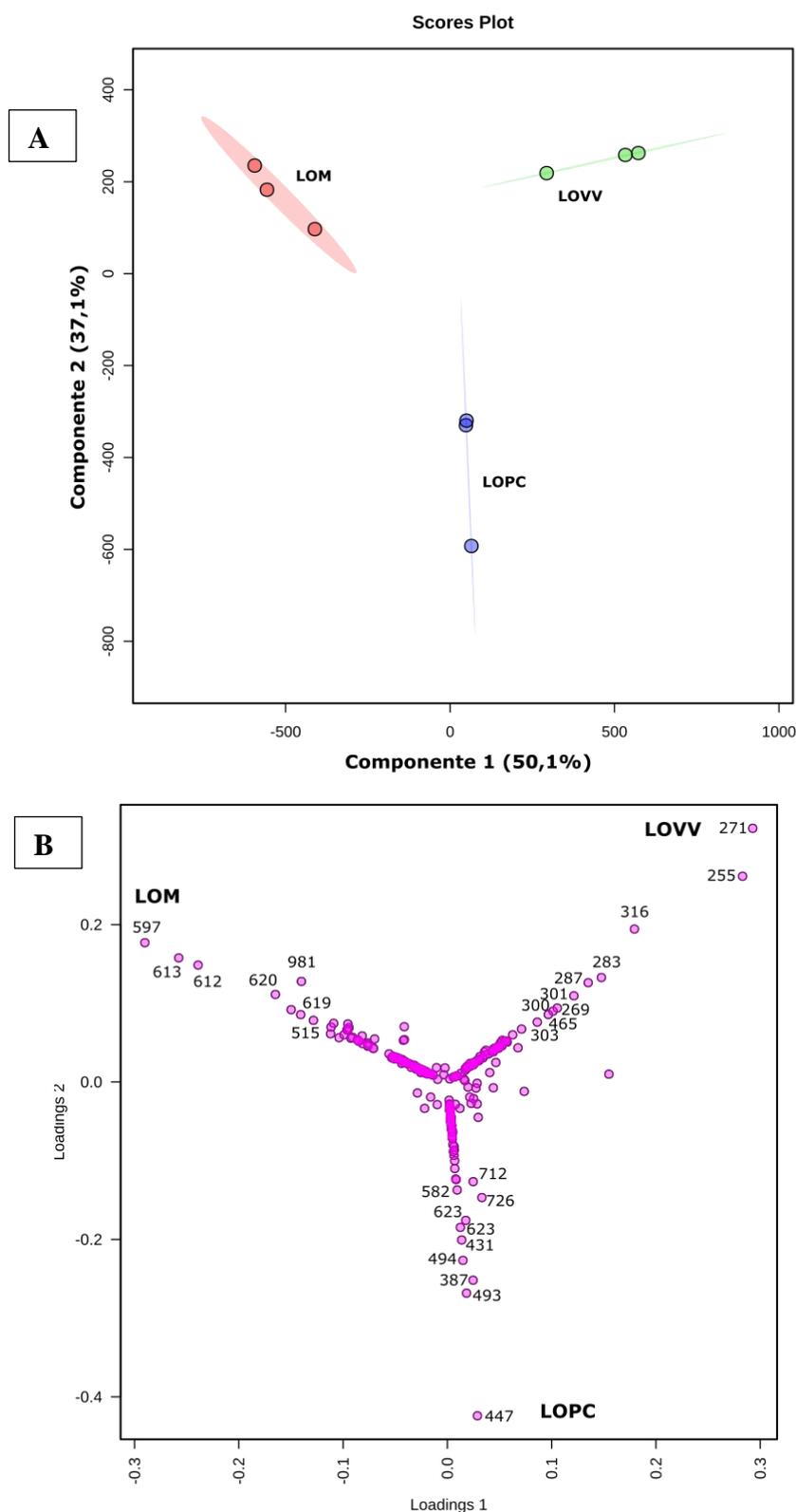


Figura 37 - Análises PLS-DA dos íons obtidos após processamento dos dados no modo negativo: **A** - Scores plot por PLS-DA dos agrupamentos dos extratos; **B** - gráfico de loadings em APCI negativo.

LOVV: *L. origanoides* (etanólico) coletado no Vale das Videiras; LOM: *L. origanoides* (etanólico) coletado em Manaus. LOPC: *L. origanoides* (aquoso) coletado em Petrópolis.

Assim como no modo positivo, destacam-se em LOPC, íons relacionados aos flavonoides C-glicosilados (**Fig. 38**). O íon de $[M-H]^-$ m/z 447 (T_{rm} : 10,25 min) é compatível com o tempo de retenção e fragmentação do padrão de isoorientina/orientina (T_r : 10,33 min). Assim como, o íon $[M-H]^-$ m/z 431 (T_{rm} : 10,79 min) é compatível com os resultados vistos com o padrão de isovitexina/vitexina (T_r : 10,78 min) (**Tabela 2**).

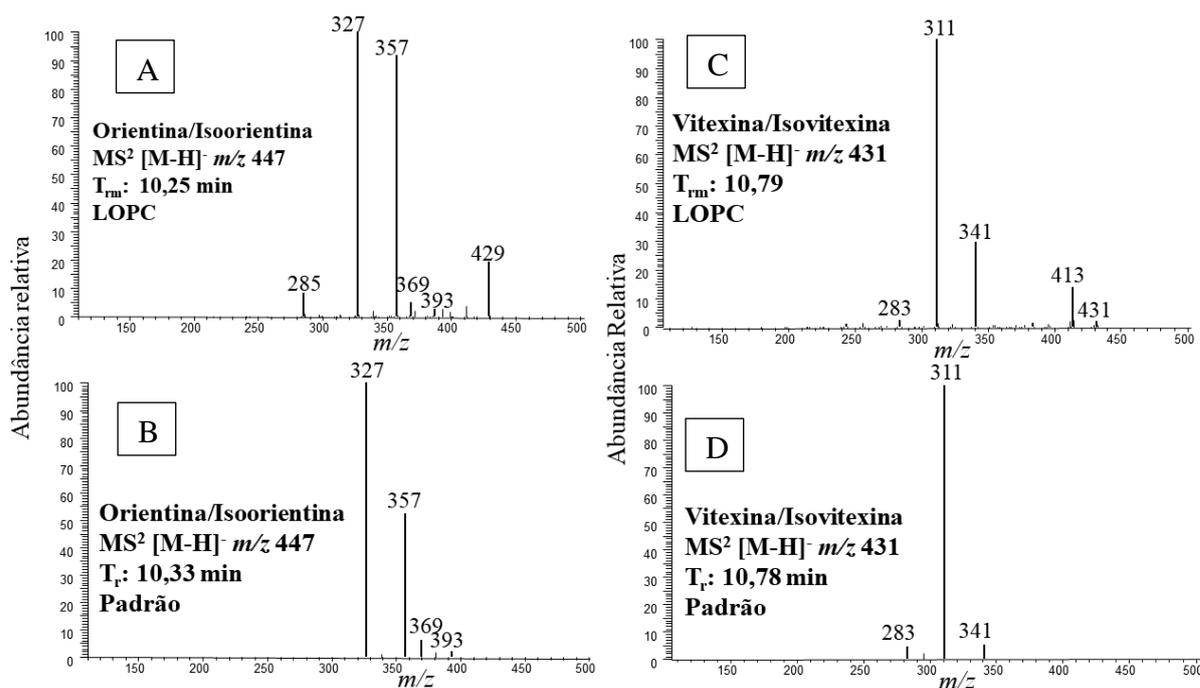


Figura 38 - Perfil de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 447 e 431 no modo negativo: **A**- Fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 447 na amostra LOPC; **B**- Fragmentação no padrão; **C**- Fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 431 na amostra LOPC; **D**- Fragmentação no padrão.

O íon m/z 493 apresenta fragmento $[M-H]^-$ m/z 447, podendo indicar a formação de aduto de ácido fórmico (MM: 46 Da) à isoorientina, $[447-H+46]^-$. Entretanto, não foi detectado a presença de outros sinais de fragmentação que pudessem subsidiar esta hipótese.

Não foi possível identificar o íon $[M-H]^-$ m/z 387 (T_{rm} : 0,65 min) com a presença dos fragmentos $[M-H]^-$ m/z 341 (-46 Da) e $[M-H]^-$ m/z 179 (-46Da -162Da), porém são fragmentos muito característicos de ácidos fenólicos (MARCHETI et al., 2019)

Apesar de não constar entre os 5 mais significativos no gráfico de *loadings* obtido a partir da análise de PLS-DA, o íon $[M-H]^-$ m/z 623 apresenta-se relacionado ao extrato LOPC. Este íon é detectado duas vezes em tempo de retenção distintos. O íon em T_{rm} : 11,17 min, referente ao fenilpropanoide glicosilado verbascosideo, identificado por comparação com o padrão (T_r : 11, 15 min; **Tabela 1**). Já o íon no T_{rm} : 11,43 min, apresenta fragmentação similar

à vista com verbascosideo, tendo fragmentos de $[M-H]^-$ m/z 461 (-162 Da), relativo a perda do ácido cafeico, e $[M-H]^-$ m/z 315 (-162Da -146Da) relacionado à perda da ramnose (**Fig. 39**). Esse perfil de fragmentação indica a possível presença de isóbaro, tal como forsitosideo A, ou o isoverbascosideo, ambos relatados em *Lippia* (MARTINS et al., 2019).

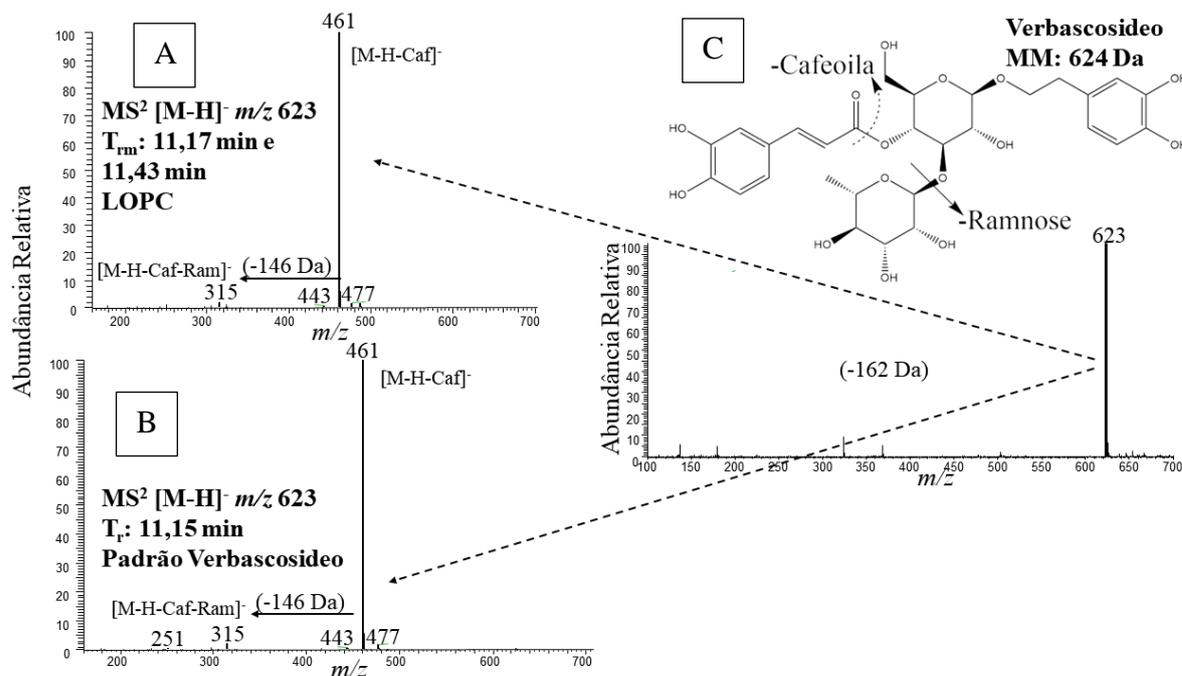


Figura 39 – Perfil de fragmentação do íon $[M-H]^-$ m/z 623: **A**- Fragmentação na amostra LOPC; **B**- Fragmentação no padrão; **C** – estrutura verbascosideo.

Como demonstrado no cromatograma de LOM, os íons mais significativos são de maior peso molecular e menor polaridade, quando comparados aos outros extratos, sendo $[M-H]^-$ m/z 597 (T_{rm}: 24,13 min), 613 (T_{rm}: 21,82 min), m/z 612 (T_{rm}: 22,67 min), m/z 620 (T_{rm}: 26,32) e m/z 981 (T_{rm}: 26,80 min). Entretanto, não foi possível identificar os íons selecionados.

Em relação aos íons mais destacados em LOVV, o íon de $[M-H]^-$ m/z 271 (T_{rm}: 13,65 min) foi identificado como flavonoide naringenina (**Fig. 40**) por comparação com o tempo de retenção e perfil de fragmentação do padrão (T_r: 13,56 min, **Tabela 2**).

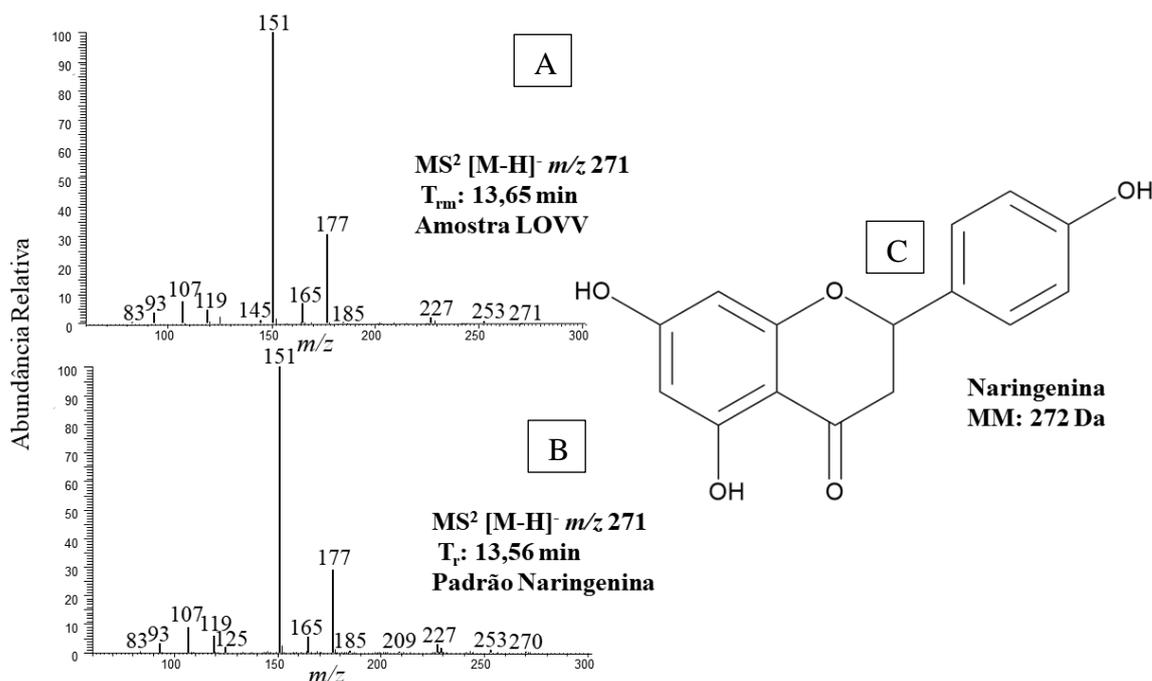


Figura 40 – Perfil de fragmentação do íon [M-H]⁻ m/z 271 e estrutura da naringenina: **A** – Fragmentação do íon [M-H]⁻ m/z 271 em LOVV; **B** – no padrão de naringenina; **C** – estrutura naringenina

Não há relatos, até o momento, da atividade deste flavonoide frente à amilina. Todavia, trabalhos demonstram que a naringenina inibe as enzimas envolvidas na agregação amiloide de A β reduzindo a toxicidade *in vitro* (MD et al., 2018; ALI et al., 2019). Também foi demonstrado que este flavonoide tem alta permeabilidade à barreira hematoencefálica, atuando na melhora do aprendizado e memória de ratos que receberam pré-tratamento, através da redução do nível de A β e dos processos inflamatórios, especialmente no hipocampo (GHOFRANI et al., 2015). Esses achados indicam o potencial de ação desta substância em doenças amiloidogênicas.

O íon [M-H]⁻ m/z 255 (T_{rm}: 16,09 min) foi igualmente identificado com uso de padrão como a pinocembrina (T_r: 16,04 min) (**Fig. 41, Tabela 2**). Foi demonstrado que este flavonoide é capaz de reduzir o dano causado por proteína amiloidogênica (fA β ₁₋₄₀), levando ao aumento da sobrevivência celular e inibindo vias de superprodução de citocinas pró-inflamatórias em células endoteliais cerebrais (LIU et al., 2014b). Também está associada à inibição do apoptose por via mitocondrial (WANG et al., 2016). Em modelo animal, foi visto que a pinocembrina está associada à melhora da cognição em camundongos, por promover proteção neurovascular com redução de mediadores inflamatórios e modulação de receptores envolvidos no processo da amiloidogênese A β (RAGE) (LIU et al., 2014a).

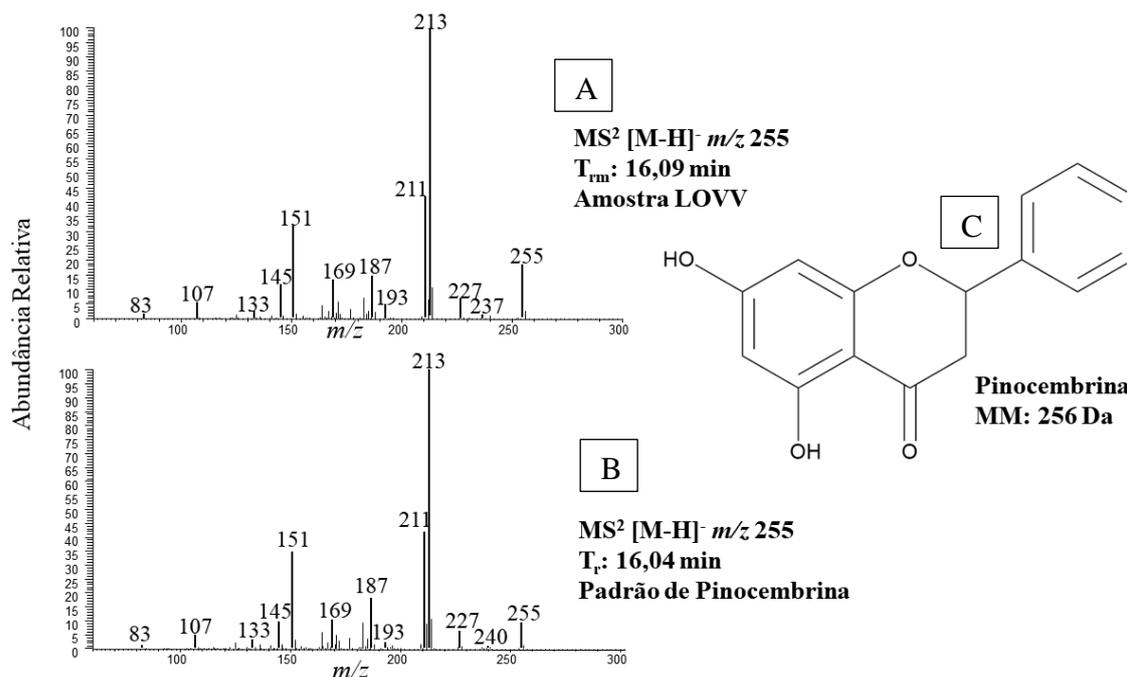


Figura 41 – Perfil de fragmentação do íon [M-H]⁻ *m/z* 255 e estrutura da pinocembrina: **A** – fragmentação do íon de [M-H]⁻ *m/z* 255 no extrato de LOVV; **B** - no padrão de pinocembrina; **C** - estrutura do flavonoide pinocembrina.

O íon de [M-H]⁻ *m/z* 283 (T_{rm}: 16,14 min) apresenta massa compatível com o flavonoide genkwanina, putativamente identificado nas análises no modo positivo. Apenas um fragmento foi detectado, [M-H]⁻ *m/z* 268 (**Fig. 42**), potencialmente relacionado à saída de um grupo metila (-CH₃). Este perfil é compatível com o relatado na literatura (LI et al., 2012).

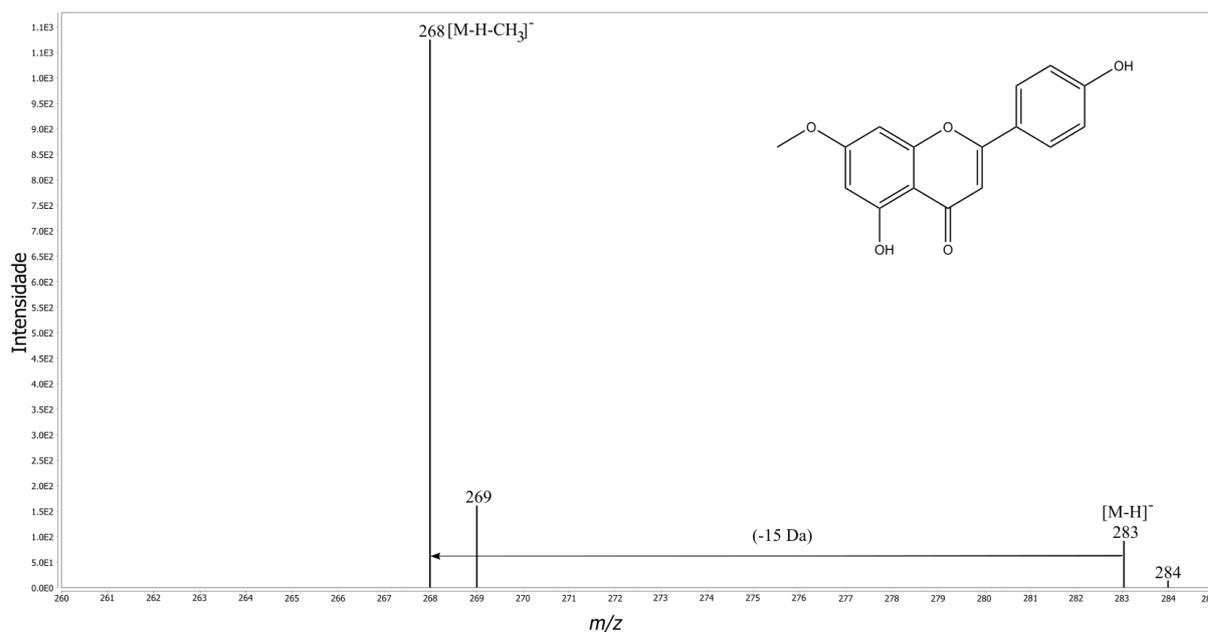


Figura 42 - Perfil de fragmentação do íon [M-H]⁻ *m/z* 283 e estrutura da genkwanina

O íon $[M-H]^-$ m/z 287, apesar de massa compatível com o flavonoide eriodictiol, não apresenta tempo de retenção similar ao visto com as análises utilizando o padrão, apresentando variação de 1 minuto (T_{rm} amostra: 11,62 min e T_r padrão: 12,65 min). Além disso, não apresenta sinais de fragmentação diferentes do padrão, sendo $[M-H]^-$ m/z 269, 259 (100), 243, 201, 180; enquanto o padrão de eriodictiol apresentou os sinais de $[M-H]^-$ m/z 269, 151 (100), 135.

5.5 PERFIL DOS EXTRATOS DE *L. origanoides*

Poucos íons destacados nas análises por PLS-DA se repetiram em ambos os modos de ionização, indicando a relevância da análise em modo positivo e negativo de ionização para melhor caracterização do extrato por LC-MS.

Das substâncias identificadas, vemos predominância de flavonoides glicosilados no extrato aquoso de LOPC, indicando que a extração por decocção leva a uma maior presença de substâncias glicosiladas (hidrofílicas) e que não aparentam contribuir positivamente para a inibição da agregação amiloide. Contudo, trabalhos indicam o potencial destas substâncias na modulação de outros fatores relacionados a danos citotóxicos decorrentes da agregação amiloide (CHOI et al., 2014). Vale ressaltar, no entanto, que flavonoides glicosilados, como rutina (YU et al., 2015), e fenilpropanoides glicosilados como verbascosideo e isoverbascosideo são relatados como inibidores da agregação amiloide ou, ainda, promotores da degradação das fibras formadas, sendo este um importante mecanismo para o remodelamento de conformações tóxicas em atóxicas (KORSHAVN et al., 2015; SHIAO et al., 2017; SUN et al., 2020; WANG et al., 2020).

Em LOM, a maior predominância de substâncias como fitoesteróis pode estar relacionada à diferença entre o resultado obtido com este extrato e ao visto em LOVV nos ensaios de inibição da fibrilação amiloide. Apesar das possíveis interações hidrofóbicas com a proteína, são as interações por ligação de hidrogênio e entre resíduos aromáticos que estabilizam mais adequadamente a região amiloidogênica da amilina (PATEL et al., 2017; XU et al., 2017; ALKAHTANE et al., 2021).

A presença de flavonoides não glicosilados e com presença de grupos hidroxilas disponíveis para formar ligações de hidrogênio com a amilina em LOVV, pode ser um dos principais fatores envolvidos na ação observada com possível inibição da agregação amiloide, apresentando até mesmo fluorescência inferior ao visto com o controle de curcumina (MAHBOOB et al., 2023). Apesar de estudos relacionarem os flavonoides naringenina e

pinocembrina a diferentes efeitos benéficos revertendo efeitos tóxicos causados por agregados amiloides, não foram encontrados trabalhos relatando a propriedade de inibição da agregação amiloide por estes flavonoides (LIU et al., 2014A; GHOFrani et al., 2015).

Resumo das substâncias destacadas nas análises de PLS-DA está disposto na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Substâncias destacadas no PLS-DA identificadas nos extratos de *L. origanoides*.

Extrato	Substâncias	Tr (min)	m/z	Aduto	MS ²	Atividade relacionada
LOVV	Genkwanina	16,66	285	[M+H] ⁺	285 (100), 270, 242, 225, 167	Inibe agregação amiloide (A β e amilina)
		16,14	283	[M-H] ⁻	268 (100)	
	N.I.	16,35	240	[M+H] ⁺	240, 223, 212, 196, 183 (100), 165	-
	N.I.	25,74	307	[M+H] ⁺	261 (100), 243, 218, 177, 163	-
	N.I.	19,74	336	[M+H] ⁺	319 (100)	-
	N.I.	13,56	316	[M-H] ⁻	317, 289 (100)	-
	Naringenina	13,65	271	[M-H] ⁻	227, 177, 151 (100)	Redução sinais inflamatórios e inibição enzimática
	Pinocembrina	16,09	255	[M-H] ⁻	255, 213 (100), 187, 151, 145	Redução sinais inflamatórios e inibição enzimática
	N.I.	11,62	287	[M-H] ⁻	269, 259 (100), 243, 201, 180	-
	LOM	β -sitosterol	27,12	397	[M+H] ⁺	315, 287, 261, 257, 243 (100), 189, 161, 147
N.I.		26,50	621	[M+H] ⁺	589, 561 (100), 515, 461	-
N.I.		24,84	409	[M+H] ⁺	393, 339, 299, 285, 271, 231, 243, 217 (100), 203, 191	-
Flavonoide metoxilado		16,81	315	[M+H] ⁺	300 (100), 269	-
Fitoesterol		31,57	397	[M+H] ⁺	315, 287, 257 (100), 243, 189, 161, 147	-
N.I.		24,13	597	[M-H] ⁻	444 (100)	-
N.I.		21,82	613	[M-H] ⁻	580 (100), 548	-
N.I.		22,67	612	[M-H] ⁻	594 (100)	-
N.I.		26,32	620	[M-H] ⁻	620, 519 (100), 504, 461, 446	-
N.I.		26,80	981	[M-H] ⁻	933 (100)	-

Tabela 3. Substâncias destacadas no PLS-DA identificadas nos extratos de *L. origanoides*. (continuação)

LOPC	Orientina/ Isoorientina	10,70	449	[M+H] ⁺	431 (100), 413, 395, 383, 353, 329, 299, 287	
		10,25	447	[M-H] ⁻	369, 357 (100), 327	
	N.I.	0,66	360	[M+H] ⁺	343, 324 (100), 307, 288, 276, 259, 163	
	Vitexina/ Isovitexina	11,13	433	[M+H] ⁺	415 (100), 397, 379, 367, 351, 337, 313, 295	
		10,79	431	[M-H] ⁻	413, 395, 341, 311 (100), 283	
	N.I.	11,39	449	[M+H] ⁺	431, 413, 395, 383, 353, 329, 299, 287 (100)	
	N.I.	10,35	493	[M-H] ⁻	447 (100), 375	-
	N.I.	0,65	387	[M-H] ⁻	341 (100)	-
	N.I.	10,89	494	[M-H] ⁻	448 (100), 405	-

Legenda: N.I. – não identificado; LOVV: *L. origanoides* (etanólico) coletado no Vale das Videiras; LOM: *L. origanoides* (etanólico) coletado em Manaus. LOPC: *L. origanoides* (aquoso) coletado em Petrópolis

A influência da ação destas substâncias está bem correlacionada com a maior presença em cada extrato. Visto a identificação dos flavonoides com uso do padrão nestes três extratos e o destaque para a presença de flavonoides no extrato LOM, avaliamos a porcentagem relativa visando compreender a proporção destas substâncias nestes extratos (**Tabela 4**). Vemos, primeiramente, uma corroboração dos resultados obtidos nas análises de PLS-DA, com maior presença dos flavonoides C-glicosilados em LOPC, e das agliconas naringenina e pinocembrina no extrato LOVV. Apesar da detecção de todos os flavonoides em LOM, estes não são representativos na composição total do extrato em nossas análises por LC-MS. Reforçando a maior diferença deste extrato frente aos demais da mesma espécie. Apesar da abundante distribuição do verbascosideo nas espécies de *Lippia*, vemos que nestes três extratos a presença deste fenilpropanoide glicosilado não se apresenta com destaque na composição destes extratos.

Considerando a maior presença dos flavonoides C-glicosilados no extrato de LOPC comparado aos demais, bem como a concentração mais significativa de agliconas em LOVV e baixa em LOM, levantam indícios que a presença destas substâncias podem estar relacionadas aos diferentes perfis vistos no ensaio de fibrilação amiloide e que as agliconas podem influenciar mais positivamente na inibição da agregação amiloide de amilina humana como demonstrado em trabalhos na literatura (GUZZI et al., 2017; IAKOLEVA et al., 2015). Vale

ressaltar, no entanto, que estas substâncias glicosiladas apresentam diversos efeitos positivos na melhora da solubilidade em água e estabilidade química, bem como efeitos biológicos de minimização de efeitos tóxicos gerados por agregados amiloides (GUZZI et al., 2017). São necessários mais estudos visando a maior compreensão da interação tanto das agliconas, quanto destes flavonoides glicosilados com agregados amiloide da amilina humana.

Tabela 4 - Proporção das substâncias identificadas com os padrões nos extratos de *L. origanoides*

Substância	LOVV (%) ^a	LOM (%) ^a	LOPC (%) ^a
Vitexina/ isovitexina	-	0,3% (+)	35,5% (+) 4,3% (-)
Orientina/isoorientina	0,09% (+)	0,6% (+)	9% (+) 19,8% (-)
Naringenina	22,7% (-)	2,3 % (-)	0,4% (-)
Pinocembrina	18,4% (-)	0,2% (-)	-
Verbascosideo	0,1% (-)	-	0,7% (+) 3% (-)

Legenda: LOVV: *L. origanoides* (etanólico) coletado no Vale das Videiras; LOM: *L. origanoides* (etanólico) coletado em Manaus. LOPC: *L. origanoides* (aquoso) coletado em Petrópolis.

^a Porcentagem relativa calculada pela área de cada pico em relação ao somatório da área total de todos os picos no cromatograma no modo positivo e negativo de ionização. +: identificada no modo positivo; -: identificado no modo negativo.

Estes resultados corroboram resultados anteriores acerca dos diferentes resultados de atividade biológica encontrados com os extratos de *L. origanoides*. O extrato de LOM apresentou maior capacidade de inibição da enzima α -glucosidase em relação ao extrato de LOVV (LIANZA et al., 2021). Resultado oposto ao encontrado em nossas análises de fibrilação amiloide. Estes resultados reforçam o potencial deste gênero para a busca de novas substâncias ativas para diversas finalidades, mas também demonstram necessidade de maior compreensão da influência de fatores externos na composição metabólica de *L. origanoides*.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho reforça o potencial de espécies nativas brasileiras para a descoberta de potenciais fontes de substâncias com atividade anti-amiloide frente à amilina humana, sendo este o primeiro relato de trabalho relacionado a amiloidoses com espécies do gênero *Lippia*.

Os resultados mais satisfatórios na inibição amiloide estão relacionados aos extratos de média polaridade, com destaque para extratos em etanol, diclorometano e acetato de etila. O extrato etanólico de *L. origanoides* coletado em região de altitude apresentou os menores valores de incremento na fluorescência de ThT, além de um perfil mais linear indicando maior estabilização da amilina em sua conformação não fibrilar.

As diferentes regiões de coleta demonstraram um impacto significativo na composição química dos espécimes de *L. origanoides*, além do solvente extrator. Através das análises por LC-MS foi observada a presença de substâncias de maior peso molecular nos extratos de LOM, quando comparado aos demais, bem como sinais relacionados a substâncias de caráter mais apolares como β -sitosterol. Para LOPC, foi identificada presença mais significativa de flavonoides C-glicosilados na composição deste extrato. No extrato de LOVV, a presença das agliconas naringenina, pinocembrina e genkwanina são mais relacionadas, indicando que a região de altitude influencia na produção metabólica de flavonoides não glicosilados que parecem ser melhor relacionados à inibição da agregação amiloide.

Este é o primeiro relato do estudo com espécies do gênero *Lippia* na busca de potenciais inibidores da agregação amiloide da amilina humana. A observação da atividade nestes extratos, em especial em LOVV, indicam uma promissora fonte de agentes anti-amiloidogênicos, sendo necessário, no entanto, estudos posteriores por técnicas de microscopias que permitam a confirmação da atividade inibitória destes extratos e/ou estas substâncias potencialmente mais relacionadas à atividade de inibição da formação de fibras, bem com a toxicidade dos complexos formados entre as substâncias e a amilina. Tais abordagens continuam sendo investigadas pelo grupo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDINI, A.; CAO, P.; PLESNER, A.; ZHANG, J.; HE, M.; DERK, J.; PATIL, S. A.; ROSARIO, R.; LONIER, J.; SONG, F.; KOH, H.; LI, H.; RALEIGH, D. P.; SCHMIDT, A. M. RAGE binds preamyloid IAPP intermediates and mediates pancreatic β cell proteotoxicity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 2, p. 682–698, 2018. <https://doi.org/10.1172/JCI85210>
- ALBERT, S.G.; OBADIAH, J.; PARSEGHIAN, S.A.; YADIRA HURLEY, M.; MOORADIAN, A.D. Severe insulin resistance associated with subcutaneous amyloid deposition. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 75, n. 3, p. 374-6, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2006.07.013>
- ALBINO, R.D.C.; SIMAS, R.C.; MARTINS, K.S.; BIZZO, H.R.; SILVA, E. R.; DAL SASSO, M.A.; SILVA R.V.S.; LEITÃO, S.G.; OLIVEIRA, D.R. Differentiation of black and white pitch (Burseraceae) oleoresins: A mass spectrometry-based chemoethnotaxonomic study. **J Ethnopharmacol.**, v. 259:112968, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112968>
- ALI, M.Y.; JANNAT, S.; EDRAKI, N.; DAS, S.; CHANG, W.K.; KIM, H.C.; PARK, S.K.; CHANG, M.S. Flavanone glycosides inhibit β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 and cholinesterase and reduce A β aggregation in the amyloidogenic pathway. **Chem Biol Interact.**, v. 25, n. 309, 108707, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.06.020>
- ALPIEVA, K.; KORKINA, L.; ORHAN, I.E.; GEORGIEV, M.I. Verbascoside--a review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. **Biotechnol Adv.**, v. 32, n. 6, p. 1065-1076, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.001>
- ALKAHTANE, A.A.; ALGHAMDI, H.A.; ALMUTAIRI, B.; KHAN, M.M.; HASNAIN, M.S.; ABDEL-DAIM, M.M.; ALGHAMDI, W.M.; ALKAHTANI, S. Inhibition of human amylin aggregation by Flavonoid Chrysin: An in-silico and in-vitro approach. **Int J Med Sci.**, v. 18, n. 1, p. 199-206, 2021. <https://doi.org/10.7150%2Fijms.51382>
- ANGUIANO, M.; NOWAK, R. J.; LANSBURY, P. T. Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. **Biochemistry**, v. 41, n. 38, p. 11338–11343, 2002. <https://doi.org/10.1021/bi020314u>
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, Supl. 1, p. S81-90, 2014. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
- ARUN, N.; NALINI, N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. **Plant Foods Hum Nutr.**, v. 57, n. 1, p. 41-52, 2002. <https://doi.org/10.1023/a:1013106527829>
- BAKER, K.R.; RICE, L. The amyloidoses: clinical features, diagnosis and treatment. **Methodist Debaquey Cardiovasc J.**, v. 8, n. 3, p. 3-7, 2012. <https://doi.org/10.14797/mdcj-8-3-3>
- BARRETO, H. M.; COELHO, B. R. C.; MENEZES-SILVA, S. M. P.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; LEMOS, I. C. S.; SOUSA, T. O.; SILVA, R. A. C.;

MEDEIROS, M. DAS G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Light-mediated antibacterial activity of *Lippia origanoides* H.B.K. *in vitro*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.13, n. 12, p. 1650–1654, 2014. <https://doi.org/10.1039/c4pp00334a>

BATZLI, K.M.; LOVE, B.J. Agitation of amyloid proteins to speed aggregation measured by ThT fluorescence: a call for standardization. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v. 48, p. 359-64, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.09.015>

BAUTISTA-HERNÁNDEZ, I.; AGUILAR, C. N.; MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C. G.; TORRES-LEÓN, C.; ILINA, A.; FLORES-GALLEGOS, A. C.; VERMA, D. K.; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L. Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) as Source of Bioactive Compounds: A Review. **Molecules**, v. 26, ed. 17, 5156, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26175156>

BENSON, M.D.; BUXBAUM, J.N.; EISENBERG, D.S.; MERLINI, G.; SARAIVA, M.J.M.; SEKIJIMA, Y.; SIPE, J.D.; WESTERMARK, P. Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. **Amyloid**, v. 27, n. 4, p. 217-222, 2020. <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1835263>

BEERY, M.L.; JACOBSEN, L.M.; ATKINSON, M.A.; BUTLER, A.E.; CAMPBELL-THOMPSON, M. Islet amyloidosis in a child with type 1 diabetes. **Islets**; v. 11, n. 2, p. 44-49, 2019. <https://doi.org/10.1080/19382014.2019.1599707>

BHOWMICK, D.C.; KUDAIBERGENOVA, Z.; BURNETT, L.; JEREMIC, A.M. Molecular Mechanisms of Amylin Turnover, Misfolding and Toxicity in the Pancreas. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 1021, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27031021>

BOSCARI, F.; AVOGARO, A. Current treatment options and challenges in patients with Type 1 diabetes: Pharmacological, technical advances and future perspectives. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 22, p. 217–240, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11154-021-09635->

BOGUN, M.M.; BUNDY, B.N.; GOLAND, R.S.; GREENBAUM, C.J. C-peptide levels in subjects followed longitudinally before and after type 1 diabetes diagnosis in TrialNet. **Diabetes Care**, v. 43, p. 1836–1842, 2020. <https://doi.org/10.2337/dc19-2288>

BÖTTGER, R.; KNAPPE, D.; HOFFMANN, R. PEGylated prodrugs of antidiabetic peptides amylin and GLP-1. **J Control Release**, v. 28; n. 292, p. 58-66, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.001>

BRAGA, R.R.; ALMEIDA, L.; GUERREIRO, L.H.; TINOCO, P.; MIRANDA, K.R.; BRAGA, C.A.; GADELHA, A.P.; GARCIA, S.; LIMA, L.M.T.R.. Molecular confinement of human amylin in lipidic nanoparticles. **Liposome Res.**, v. 26, nº 3, pp. 188–198, 2015. <https://doi.org/10.3109/08982104.2015.1076462>

BRASIL. Ministério da Saúde. Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: *Lippia sidoides* Cham., Verbenaceae (Alecrim-pimenta) / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 72 p.,

2018. Disponível em:

https://bvsm.sau.de.gov.br/bvs/publicacoes/informacoes_sistematizadas_relacao_nacional_plantas_medicinais_interesse_sus_alecrim_pimenta.pdf. Acesso em: 03 Mar. 2023

BRASIL. Formulário de fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, ed 2º, p.222, 2021. Disponível em:

<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/arquivos/2021-fffb2-final-c-cap2.pdf>. Acesso em: 03 Mar. 2023

BRECHT, D.; UTESCHIL, F.; SCHMITZ, O.J. Development of a fast-switching dual (ESI/APCI) ionization source for liquid chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, n. 17, e8845, 2020.

<https://doi.org/10.1002/rcm.8845>

BUXBAUM, J.N.; DISPENZIERI, A.; EISENBERG, D.S.; FÄNDRICH, M.; MERLINI, G.; SARAIVA, M.J.M.; SEKIJIMA, Y.; WESTERMARK, P. Amyloid nomenclature 2022: update, novel proteins, and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee. **Amyloid**, v. 29, n. 4, p. 213-219, 2022.

<https://doi.org/10.1080/13506129.2022.2147636>

CAMILO, C.J.; LEITE, D.O.D.; NONATO, C.F.A.; CARVALHO, N. K.G.; RIBEIRO, D.A.; COSTA, J G. M. Traditional use of the genus *Lippia* sp. and pesticidal potential: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 40:102296, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102296>

CARDOSO, P. H., O'LEARY, N.; OLMSTEAD, R.; MORONI, P.; THODE, V. An update of the Verbenaceae genera and species numbers. **Plant Ecology and Evolution**, p. 80–86, 2021.

<https://doi.org/10.5091/plecevo.2021.1821>

CASAS, S.; NOVIALS, A.; REIMANN, F.; GOMIS, R.; GRIBBLE, F. M. Calcium elevation in mouse pancreatic beta cells evoked by extracellular human islet amyloid polypeptide involve activation of the mechanosensitive ion channel TRPV4. **Diabetologia**, v. 51, n. 12, p. 2252–2262, 2008.

<https://doi.org/10.1007/s00125-008-1111-z>

CASTELLAR, A.; COELHO, T.S.; SILVA, P.E.A.; RAMOS, D.F.; LOURENÇO, M.C.S.; LAGE, C.L.S.; JULIÃO, L.S.; BARBOSA, Y.G.; LEITÃO, S.G. The activity of flavones and oleanolic acid from *Lippia lacunosa* against susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 21, n. 5, p. 835-840, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000076>

CHAWLA, A.; CHAWLA, R.; JAGGI, S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? **Indian J Endocrinol Metab.**, v.20, n. 4, p. 546-51, 2016.

<https://doi.org/10.4103%2F2230-8210.183480>

CHEBARO, Y.; JIANG, P.; ZANG, T.; MU, Y.; NGUYEN, P.H.; MOUSSEAU, N.; DERREUMAUX, P. Structures of A β 17–42 trimers in isolation and with five small-molecule drugs using a hierarchical computational procedure. **J. Phys. Chem. B.**, v.116, p. 8412–8422, 2012.

<https://doi.org/10.1021/jp2118778>

CHEN, H.C.; CAO, J.X.; CAI, Y.T.; DU, H.L.; XI, X.X.; SUN, J.; YIN, J.; GAO, L.P.; JING, Y.H. Interaction of human IAPP and A β 1-42 aggravated the AD-related pathology and impaired the cognition in mice. **Exp Neurol.**, v. 334, 113490, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113490> .

CHU, K. Y.; LI, H.; WADA, K.; JOHNSON, J. D. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 is required for pancreatic beta cell survival and function in lipotoxic conditions. **Diabetologia**, v. 55, n. 1, p. 128–140, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2323-1>

CHUENGSAAMARN, S.; RATTANAMONGKOLGUL, S.; LUECHAPUDIPORN, R.; PHISALAPHONG, C.; JIRAWATNOTAI, S. Curcumin extract for prevention of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 35, n. 11, p. 2121-7, 2012. <https://doi.org/10.2337%2Fdc12-0116>

COSTES, S.; HUANG, C.; GURLO, T.; DAVAL, M.; MATVEYENKO, A. V.; RIZZA, R. A.; BUTLER, A. E.; BUTLER, P. C. β -cell dysfunctional ERAD/ubiquitin/proteasome system in type 2 diabetes mediated by islet amyloid polypeptide-induced UCH-L1 deficiency. **Diabetes**, v. 60, n. 1, p. 227–238, 2011. <https://doi.org/10.2337/db10-0522>

COURTADE, J. A.; WANG, E. Y.; YEN, P.; DAI, D. L.; SOUKHATCHEVA, G.; ORBAN, P. C.; VERCHERE, C. B. Loss of prohormone convertase 2 promotes beta cell dysfunction in a rodent transplant model expressing human pro-islet amyloid polypeptide. **Diabetologia**, v. 60, n. 3, p. 453–463, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4174-2>

CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A.; ANDRADE, C.H.S.; MACHADO, M.I.L. Essential oils from brazilian Verbenaceae. Genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, v.44, n. 5, p.598-601, 1981. <https://doi.org/10.1021/np50017a018>

DAVAL, M.; BEDROOD, S.; GURLO, T.; HUANG, C.J.; COSTES, S.; BUTLER, P.C.; LANGEN, R. The effect of curcumin on human islet amyloid polypeptide misfolding and toxicity. **Amyloid**, v. 17, n. 3-4, p.118-28, 2010. <https://doi.org/10.3109/13506129.2010.530008>

DENROCHE, H. C.; VERCHERE, C. B. IAPP and type 1 diabetes: Implications for immunity, metabolism and islet transplants. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 60, n. 2, p. R57–R75, 2018. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0138>

DESPA, S.; SHARMA, S.; HARRIS, T.R.; DONG, H.; LI, N.; CHIAMVIMONVAT, N.; TAEGTMEYER, H.; MARGULIES, K.B.; HAMMOCK, B.D.; DESPA, F. Cardioprotection by controlling hyperamylinemia in a "humanized" diabetic rat model. **J Am Heart Assoc.**, v. 3, n. 4, e001015, 2014. <https://doi.org/10.1161/jaha.114.001015>

DHOUAFI, Z.; CUANALO-CONTRERAS, K.; HAYOUNI, E.A.; MAYS, C.E.; SOTO, C.; MORENO-GONZALEZ, I. Inhibition of protein misfolding and aggregation by natural phenolic compounds. **Cell Mol Life Sci.**, v.75, n. 19, p. 3521-3538, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2872-2>

DUARTE, ALINE CASTELLAR. "Aspectos Biotecnológicos de duas espécies vegetais do cerrado: cultura de tecidos, isolamento e identificação de produtos bioativos de *Lippia lacunosa* e *Lippia rotundifolia* (Verbenaceae)". Doutorado (Tese) em Biotecnologia vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, p.139, 2010.

DUBEY, R.; KULKARNI, S.H.; DANTU, S.C.; PANIGRAHI, R.; SARDESAI, D.M.; MALIK, N.; ACHARYA, J.D.; CHUGH, J.; SHARMA, S.; KUMAR, A. Myricetin protects pancreatic β -cells from human islet amyloid polypeptide (hIAPP) induced cytotoxicity and restores islet function. **Biol Chem.**, v. 402, n. 2, p. 179-194, 2020.

<https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0176>

EHRNHOFER, D.E.; BIESCHKE, J.; BOEDDRICH, A.; HERBST, M.; MASINO, L.; LURZ, R.; ENGEMANN, S.; PASTORE, A.; WANKER, E.E. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 15, n. 6, p. 558-66, 2008. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1437>

ELSAYED, N.A.; ALEPPO, G.; ARODA, V.R.; BANNURU, R.R.; BROWN, F.M.; BRUEMMER, D.; COLLINS, B.S.; HILLIARD, M.E.; ISAACS, D.; JOHNSON, E.L.; KAHAN, S.; KHUNTI, K.; LEON, J.; LYONS, S.K.; PERRY, M.L.; PRAHALAD, P.; PRATLEY, R.E.; SELEY, J.J.; STANTON, R.C.; GABBAY, R.A.; ON BEHALF OF THE AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. **Diabetes Care.**, v. 46, Supl 1, pp. S19-S40, 2023.

<https://doi.org/10.2337/dc23-s002>

ENGEL, M. F.; YIGITTOP, H.; ELGERSMA, R. C.; RIJKERS, D. T.; LISKAMP, R. M.; DE KRUIJFF, B.; HÖPPENER, J. W.; ANTOINETTE KILLIAN, J. Islet amyloid polypeptide inserts into phospholipid monolayers as monomer. **Journal of Molecular Biology**, v. 356, n. 3, p. 783–789, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.020>

EZE, F.N.; INGKANINAN, K.; RAPUNPOJ, P. Transthyretin Anti-Amyloidogenic and Fibril Disrupting Activities of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst (Brahmi). **Extract. Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 845, 2019. <https://doi.org/10.3390%2Fbiom9120845>

FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; MOREIRA, J.R.; BOUZADA, M.L.M.; SCIO, E. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. **Journal of Medicinal Food**, v.14, p.1-7, 2011.

<https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0141>

FOLL, C.L.; LUTZ, T.A. Systemic and Central Amylin, Amylin Receptor Signaling, and Their Physiological and Pathophysiological Roles in Metabolism. **Compr Physiol.**, v. 10, n. 3, p. 811-837, 2020. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190034>

FONSECA, THAMIRYS SILVA DA. “Isolamento e identificação de fenilpropanoides com ação antifúngica de *Lippia rubella* (Moldenke) T.R. Silva & Salimena (Verbenaceae)”. Trabalho de conclusão de curso (monografia) em Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, p. 75, 2019.

FRANKO, A.; RODRIGUEZ CAMARGO, D.C.; BODDRICH, A.; GARG, D.; RODRIGUEZ CAMARGO, A.; RATHKOLB, B.; JANIK, D.; AICHLER, M.; FEUCHTINGER, A.; NEFF, F.; et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) reduces the intensity of pancreatic amyloid fibrils in human islet amyloid polypeptide (hIAPP) transgenic mice. **Sci. Rep.**, v. 8, 1116, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18807-8>

FROKJAER, S.; OTZEN, D. Protein drug stability: a formulation challenge. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 4, p. 298–306, 2005. <https://doi.org/10.1038/nrd1695>

FUNARI, C.S.; GULLO, F.P.; NAPOLITANO, A.; CARNEIRO, R.L.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; PLACENTE, S.; PIZZA, C.; SIQUEIRA SILVA, D.H. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**. v. 135, p. 2086–2094, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.077>

GASA, R.; GOMIS, R.; CASAMITJANA, R.; NOVIALS, A. High glucose concentration favors the selective secretion of islet amyloid polypeptide through a constitutive secretory pathway in human pancreatic islets. **Pancreas**, v. 22, n. 3, p. 307–310, 2001. <https://doi.org/10.1097/00006676-200104000-00013>

GBIF Backbone Taxonomy. *Lippia* in GBIF Secretariat. Checklist dataset, 2022. Global Biodiversity Information Facility. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/2925383>. Acesso em: 02 Mar. 2023a.

GBIF Backbone Taxonomy. *Lippia origanoides* Kunth in GBIF Secretariat. Checklist dataset, 2022. <https://doi.org/10.15468/39omei>. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/7297353>. Acesso em: 04 Mar. 2023b.

GHOFRANI, S.; JOGHATAEI, M.T.; MOHSENI, S.; BALUCHNEJADMOJARAD, T.; BAGHERI, M.; KHAMSE, S.; ROGHANI, M. Naringenin improves learning and memory in an Alzheimer's disease rat model: Insights into the underlying mechanisms. **Eur J Pharmacol.**, v. 764, p. 195-201, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.07.001>

GLENNER, G.G.; EANES, E.D.; BLADEN, H.A.; et al. β -pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. **J Histochem Cytochem.**, v. 22, n. 12, p. 1141–1158, 1974. <https://doi.org/10.1177/22.12.1141>

GOTZ, J.; LIM, Y.A.; ECKERT, A. Lessons from two prevalent amyloidosis—What amylin and Abeta have in common. **Front. Aging Neurosci.**, v. 5, n. 38, 2013. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00038>

GRAYER, R.J.; KITE, G.C.; ABOU-ZAID, M.; ARCHER, L.J. The application of atmospheric pressure chemical ionisation liquid chromatography–mass spectrometry in the chemotaxonomic study of flavonoids: characterisation of flavonoids from *Ocimum gratissimum* var. *gratissimum*. **Phytochem. Anal.**, v. 11, p. 257-267, 2000. <https://doi.org/10.1002/1099-1565>

GUERREIRO, L.H.; DA SILVA, D.; RICCI-JUNIOR, E.; GIRARD-DIAS, W.; MASCARENHAS, C.M.; SOLA-PENNA, M.; MIRANDA, K.; LIMA, L.M. Polymeric particles for the controlled release of human amylin. **Colloids Surf B Biointerfaces.**, v. 94, p. 101-6, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.021>

GUIMARÃES, C.C.; OLIVEIRA, D.D.; VALDEVITE, M.; SALTORATTO, A.L.; PEREIRA, S.I.; FRANÇA, S.D.E.C.; PEREIRA, A.M.; PEREIRA, P.S. The glycosylated flavonoids vitexin, isovitexin, and quercetrin isolated from *Serjania erecta* Radlk

(Sapindaceae) leaves protect PC12 cells against amyloid- β 25-35 peptide-induced toxicity. **Food Chem Toxicol.**, v. 86, p. 88-94, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.09.002>

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E.P.; ANGULO-ESCALANTE, M.A.; LEÓN-FÉLIX, J.; HEREDIA, J.B. Effect of *in vitro* Digestion on the Total Antioxidant Capacity and Phenolic Content of 3 Species of Oregano (*Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*). **J Food Sci.**, v. 82, n. 12, p. 2832-2839, 2017. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13954>

GUZZI, C.; COLOMBO, L.; LUIGI, A.; SALMONA, M.; NICOTRA, F.; AIROLDI, C. Flavonoids and Their Glycosides as Anti-amyloidogenic Compounds: A β 1-42 Interaction Studies to Gain New Insights into Their Potential for Alzheimer's Disease Prevention and Therapy. **Chem Asian J.**, v. 12, n. 1, p. 67-75, 2017. <https://doi.org/10.1002/asia.201601291>

HAY, D.L.; CHEN, S.; LUTZ, T.A.; PARKES, D.G.; ROTH, J.D. Amylin: Pharmacology, Physiology, and Clinical Potential. **Pharmacol Rev.**, v. 67, n. 3, p. 564-600, 2015. <https://doi.org/10.1124/pr.115.010629>

HE, H.J.; WANG, G.Y.; GAO, Y.; LING, W.H.; YU, Z.W.; JIN, T.R. Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. **World J Diabetes**, v. 3, n. 5, p. 94-104, 2012. <https://doi.org/10.4239%2Fwj.d.v3.i5.94>

HULL, R. L.; ZRAIKA, S.; UDAYASANKAR, J.; ASTON-MOURNEY, K.; SUBRAMANIAN, S. L.; KAHN, S. E. Amyloid formation in human IAPP transgenic mouse islets and pancreas and human pancreas is not associated with endoplasmic reticulum stress. **Diabetologia**, v. 52, n. 6, p. 1102-1111, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1329-4>

Hutton, J. C.; Penn, E. J.; Peshavaria, M. Isolation and characterisation of insulin secretory granules from a rat islet cell tumour. **Diabetologia**, v. 23, n. 4, p. 365-373, 1982. <https://doi.org/10.1007/BF00253746>

IAKOVLEVA, I.; BEGUM, A.; POKRZYWA, M.; WALFRIDSSON, M.; SAUER-ERIKSSON, A.E.; OLOFSSON, A. The flavonoid luteolin, but not luteolin-7-O-glucoside, prevents a transthyretin mediated toxic response. **PLoS One**, v. 10, n. 5, e0128222, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128222>

ICHIMATA, S.; KATOH, N.; ABE, R.; et al. A case of novel amyloidosis: glucagon-derived amyloid deposition associated with pancreatic neuroendocrine tumour. **Amyloid**, v.28, n. 1, p. 72-73, 2021. <https://doi.org/10.1080/13506129.2020.1785417>

IDF DIABETES ATLAS 10TH EDITION SCIENTIFIC COMMITTEE. MAGLIANO, D.J.; BOYKO, E.J. (org.). **IDF DIABETES ATLAS** [Internet]. ed. 10°. Brussels: International Diabetes Federation; 2021. <http://www.diabetesatlas.org>

JURGENS, C.A.; TOUKATLY, M.N.; FLIGNER, C.L.; UDAYASANKAR, J.; SUBRAMANIAN, S.L.; ZRAIKA, S.; ASTON-MOURNEY, K.; CARR, D.B.; WESTERMARK, P.; WESTERMARK, G.T. et al. beta-Cell loss and beta-cell apoptosis in human type 2 diabetes are related to islet amyloid deposition. **American Journal of Pathology**, v. 178, p. 2632-2640, 2011. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ajpath.2011.02.036>

KANATSUKA, A.; KOU, S.; MAKINO, H. IAPP/amylin and B-cell failure: implication on the risk factors of type 2 diabetes. **Diabetology International**, v. 9, n. 4, p. 266, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13340-018-0347-1>

KARANDISH, M.; MOZAFFARI-KHOSRAVI, H.; MOHAMMADI, S.M.; CHERAGHIAN, B.; AZHDARI, M. The effect of curcumin and zinc co-supplementation on glycemic parameters in overweight or obese prediabetic subjects: A phase 2 randomized, placebo-controlled trial with a multi-arm, parallel-group design. **Phytother Res.**, v. 35, n. 8, p. 4377-4387, 2021. <https://doi.org/10.1002/ptr.7136> .

KIM, J.H.; LEE, S.; CHO, E.J. The Protective Effects of *Acer okamotoanum* and Isoquercitrin on Obesity and Amyloidosis in a Mouse Model. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1353, 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12051353>

KIM, B.; LEE, K.Y.; PARK, B. Isoorientin Inhibits Amyloid β 25-35-Induced Neuronal Inflammation in BV2 Cells by Blocking the NF- κ B Signaling Pathway. **Molecules**, v. 26, n. 22, 7056, 2021. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules26227056>

KIM, J.H.; QUILANTANG, N.G.; KIM, H.Y.; LEE, S.; CHO, E.J. Attenuation of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells by three flavonoids from *Acer okamotoanum*. **Chem. Pap.**, v. 73, p. 1135–1144, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0664-7>

KING, K.M.; BEVAN, D.R.; BROWN, A.M. Molecular Dynamics Simulations Indicate Aromaticity as a Key Factor in the Inhibition of IAPP (20-29) Aggregation. **ACS Chem Neurosci.**, v. 13, n. 11, p. 1615-1626, 2022. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.2c00025>

KORSHAVN, K.J.; JANG, M.; KWAK, Y.J.; KOCHI, A.; VERTUANI, S.; BHUNIA, A.; MANFREDINI, S.; RAMAMOORTHY, A.; LIM, M.H. Reactivity of Metal-Free and Metal-Associated Amyloid- β with Glycosylated Polyphenols and Their Esterified Derivatives. **Sci Rep.**, v. 5, 17842, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep17842>

KRIZHANOVSKII, C.; FRED, R. G.; OSKARSSON, M. E.; WESTERMARK, G. T.; WELSH, N. Addition of exogenous sodium palmitate increases the IAPP/insulin mRNA ratio via GPR40 in human EndoC- β H1 cells. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 122, n. 3, p. 149–159, 2017. <https://doi.org/10.1080/03009734.2017.1368745>

KRUSE, T.; HANSEN, J.L.; DAHL, K.; SCHÄFFER, L.; SENSFUSS, U.; POULSEN, C.; SCHLEIN, M.; HANSEN, A.M.K.; JEPPESEN, C.B.; DORNONVILLE DE LA COUR, C.; CLAUSEN, T.R.; JOHANSSON, E.; FULLE, S.; SKYGGEBJERG, R.B.; RAUN, K. Development of Cagrilintide, a Long-Acting Amylin Analogue. **J Med Chem.**, v. 64, n. 15, p. 11183-11194, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00565>

LEAL, C.M.; LEITÃO, S.G.; SAUSSET, R.; MENDONÇA, S.C.; NASCIMENTO, P.H.A.; DE ARAUJO, R.; CHEOHEN, C.F.; ESTEVES, M.E.A.; LEAL DA SILVA, M.; GONDIM, T.S.; MONTEIRO, M.E.S.; TUCCI, A.R.; FINTELMAN-RODRIGUES, N.; SIQUEIRA, M.M.; MIRANDA, M.D.; COSTA, F.N.; SIMAS, R.C.; LEITÃO, G.G. Flavonoids from *Siparuna cristata* as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Replication. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 31, n. 5, p. 658-666, 2021. <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00162-5> .

LEE, D.; KIM, K.H.; LEE, J.; HWANG, G.S.; LEE, H.L.; HAHM, D.H.; HUH, C.K.; LEE, S.C.; LEE, S.; KANG, K.S. Protective effect of cirsimaritin against streptozotocin-induced apoptosis in pancreatic beta cells. **J Pharm Pharmacol.**, v.69, n° 7, p.875-883, 2017. <https://doi.org/10.1111/jphp.12719>

LEITÃO, S.G.; CASTRO, O.; FONSECA, E. N.; JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LEO, R. R.T.; VIEIRA, R. C.; OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; MARTINO, V.; SULSEN, V.; BARBOSA, Y. A.G.; PINHEIRO, D. P.G.; SILVA, P. E. A.; TEIXEIRA, D. F.; JUNIOR, I. N.; LOURENÇO, M. C. S. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n. 1, p. 6-11, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100003>

LEITÃO, S.G.; DELLE MONACHE, F. 2''-*O*-caffeoylorientin from *Vitex polygama*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 2167-2169, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00416-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00416-6)

LEITÃO, S.G., LEITÃO, G.G., VICCO, D.K.T., PEREIRA, J.P. B., SIMÃO, G.M., OLIVEIRA, D.R., CELANO, R., CAMPONE, L., PICCINELLI, A.L., RASTRELLI, L. Counter-current chromatography with off-line detection by ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry in the study of the phenolic profile of *Lippia origanoides*. **Journal of Chromatography A**, v. 1520, p. 83-90, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.004>

LEITÃO, S. G.; MARTINS, G.R.; MARTÍNEZ-FRUCTUOSO, L.; SILVA, D.S.; FONSECA, T.S.; CASTILHO, C.V.V.; BARATTO, L.C.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; LEITÃO, G.G.; Pereda-Miranda, R. Absolute Stereochemistry of Antifungal Limonene-1,2-diols from *Lippia rubella*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.30, p. 537-543, 2020. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00081-x>

LEITAO, S. G.; OLIVEIRA, D.R.; SÜLSEN, V.; MARTINO, V.; BARBOSA, Y.G.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; VICCINI, L. F.; SALIMENA, F.R.G.; PEIXOTO, P.H.P.; LEITÃO, G.G. Analysis of the chemical composition of the essential oils extracted from *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p. 1388-1393, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532008000700023>

LI, J.; WANG, Y.H.; SMILLIE, T.J.; KHAN, I.A. Identification of phenolic compounds from *Scutellaria lateriflora* by liquid chromatography with ultraviolet photodiode array and electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 63, p. 120-7, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.01.027>

LI, X.; CHEN, T.; WONG, Y.-S.; XU, G.; FAN, R.-R.; ZHAO, H.-L.; CHAN, J. C. N. Involvement of mitochondrial dysfunction in human islet amyloid polypeptide-induced apoptosis in INS-1E pancreatic beta cells: An effect attenuated by phycocyanin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, n. 4, p. 525–534, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.12.008>

LI, X.; MA, L.; ZHENG, W.; CHEN, T. Inhibition of islet amyloid polypeptide fibril formation by selenium-containing phycocyanin and prevention of beta cell apoptosis.

Biomaterials, v. 35, n. 30, p. 8596–8604, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06>.

LIANG, Y.; LEE, D.Y.W.; ZHEN, S.; SUN, H.; ZHU, B.; LIU, J.; LEI, D.; LIN, C.J.; ZHANG, S.; JACQUES, N.A.; QUINTI, L.; RAN, C.; WANG, C.; GRICIUC, A.; CHOI, S.H.; DAI, R.H.; EFFERTH, T.; TANZI, R.E.; ZHANG, C. Natural medicine HLXL targets multiple pathways of amyloid-mediated neuroinflammation and immune response in treating alzheimer's disease. **Phytomedicine**, v. 104, 154158, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154158>

LIANG, Z.; ZHANG, B.; SU, W.W.; WILLIAMS, P.G.; LI, Q.X. C-Glycosylflavones Alleviate Tau Phosphorylation and Amyloid Neurotoxicity through GSK3 β Inhibition. **ACS Chem Neurosci.**, v. 7, n. 7, p. 912-23, 2016.

<https://doi.org/10.1021%2Facschemneuro.6b00059>

LIANZA, M.; POLI, F.; NASCIMENTO, A.M.; SILVA, A.S.; FONSECA, T.S.; TOLEDO, M.V.; SIMAS, R.C.; CHAVES, A.R.; LEITÃO, G.G.; LEITÃO, S.G. *In vitro* α -glucosidase inhibition by Brazilian medicinal plant extracts characterised by ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.37, n.1, p. 554–562, 2022.

<https://doi.org/10.1080/14756366.2021.2022658>

LIMA, L.M.T.R.; ICART, L.P. Amyloidogenicity of peptides targeting diabetes and obesity. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 209 (Pt 1), 112157, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112157>

LIN, L.Z.; MUKHOPADHYAY, S.; ROBBINS, R.J.; HARNLY, J.M. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. **J Food Compos Anal.**, v. 20, n. 5, p. 361-369, 2007.

<https://doi.org/10.1016%2Fj.jfca.2006.09.005> .

LIU, F.F.; DONG, X.Y.; HE, L.; MIDDELBERG, A.P.; SUN, Y. Molecular insight into conformational transition of amyloid β -peptide 42 inhibited by (-)-epigallocatechin-3-gallate probed by molecular simulations. **J Phys Chem B.**, v. 115, n. 41, p. 11879-87, 2011.

<https://doi.org/10.1021/jp202640b>

LIU, R.; LI, J.Z.; SONG, J.K.; ZHOU, D.; HUANG, C.; BAI, X.Y.; XIE, T.; ZHANG, X.; LI, Y.J.; WU, C.X.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHANG, T.T.; DU, G.H. Pinocembrin improves cognition and protects the neurovascular unit in Alzheimer related deficits. **Neurobiol Aging.**, v. 35, n. 6, p. 1275-85, 2014a.

<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.031>

LIU, R.; LI, J.Z.; SONG, J.K.; SUN, J.L.; LI, Y.J.; ZHOU, S.B.; ZHANG, T.T.; DU, G.H. Pinocembrin protects human brain microvascular endothelial cells against fibrillar amyloid- β (1-40) injury by suppressing the MAPK/NF- κ B inflammatory pathways. **Biomed Res Int.**, 2014:470393, 2014b.

<https://doi.org/10.1155%2F2014%2F470393>

LOLICATO, F.; RAUDINO, A.; MILARDI, D.; LA ROSA, C. Resveratrol interferes with the aggregation of membrane-bound human-IAPP: A molecular dynamics study. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 92, p. 876–881, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.01.047>

LU, L.; FU, D.L.; LI, H.Q.; LIU, A.J.; LI, J.H.; ZHENG, G.Q. Diabetes and risk of Parkinson's disease: An updated meta-analysis of case-control studies. **PLoS ONE**, v. 9, e85781, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085781>

LUTZ, T.A. Creating the amylin story. **Appetite**, v. 172:105965, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2022.105965>

LYNAM, A.; MCDONALD, T.; HILL, A.; et al. Development and validation of multivariable clinical diagnostic models to identify type 1 diabetes requiring rapid insulin therapy in adults aged 18–50 years. **BMJ Open**, v. 9:e031586, 2019. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-031586>

MACAMBIRA, L.M.A.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; CRAVEIRO, A.A.; BRAZ FILHO, R. Naphthoquinoids from *Lippia sidoides*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 2, p. 310-312, 1986. <https://doi.org/10.1021/np50044a019>

MACINDOE, I.; KWAN, A.H.; REN, Q.; et al. Self-assembly of functional, amphipathic amyloid monolayers by the fungal hydrophobin EAS. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 109, n. 14, p. E804–E811, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114052109>

MACK, C.; SOARES, C.; WILSON, J.; et al. Davalintide (AC2307), a novel amylin-mimetic peptide: enhanced pharmacological properties over native amylin to reduce food intake and body weight. **Int J Obes**, v. 34, p. 385–395, 2010. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.238>

MAHBOOB, A.; SENEVIRATHNE, D.K.L.; PAUL, P.; NABI, F.; KHAN, R.H.; CHAARI, A. An investigation into the potential action of polyphenols against human Islet Amyloid Polypeptide aggregation in type 2 diabetes. **Int J Biol Macromol.**, v. 225, p. 318-350, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.038>

MARI, A.; MONTORO P, D'URSO G, MACCHIA M, PIZZA C, PIACENTE S. Metabolic profiling of *Vitex agnus castus* leaves, fruits and sprouts: analysis by LC/ESI/(QqQ)MS and (HR) LC/ESI/(Orbitrap)/MS n. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 102, p. 215-21, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.018>

MARMENTINI, C.; BRANCO, R.C.S.; BOSCHERO, A.C.; KURAUTI, M.A. Islet amyloid toxicity: From genesis to counteracting mechanisms. **J Cell Physiol.**, v. 237, n. 2, p. 1119-1142, 2022. <https://doi.org/10.1002/jcp.30600>

MARTINS, G. R.; FONSECA, T.S.; MARTÍNEZ-FRUCTUOSO, L.; SIMAS, R.C.; SILVA, F.T.; SALIMENA, F.R.G.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; LEITÃO, G.G.; PEREDA-MIRANDA, R.; LEITÃO, S.G. Antifungal phenylpropanoid glycosides from *Lippia rubella*. **Journal of Natural Products**, v. 82, p. 566-572, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00975>

MARTINEZ-VALBUENA, I.; VALENTI-AZCARATE, R.; AMAT-VILLEGAS, I.; MARCILLA, I.; MARTI-ANDRES, G.; CABALLERO, M.C.; RIVEROL, M.; TUNON, M.T.; FRASER, P.E.; LUQUIN, M.R. Mixed pathologies in pancreatic beta cells from subjects with neurodegenerative diseases and their interaction with prion protein. **Acta Neuropathol. Commun.**, v. 9, n. 64, 2021. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01171-0>

MARTINEZ-VALBUENA, I.; VALENTI-AZCARATE, R.; AMAT-VILLEGAS, I.; RIVEROL, M.; MARCILLA, I.; et al. Amylin as a potential link between type 2 diabetes and alzheimer disease. **Annals of Neurology**, v. 86, n. 4, 2019. <https://doi.org/10.1002/ana.25570>

MARZBAN, L.; TRIGO-GONZALEZ, G.; ZHU, X.; RHODES, C.J.; HALBAN, P.A.; STEINER, D.F.; VERCHERE, C.B. Role of beta-cell prohormone convertase (PC)1/3 in processing of pro-islet amyloid polypeptide. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p.141-8, 2004. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.1.141>

MATHIESEN, D.S.; LUND, A.; HOLST, J.J.; KNOP, F.K.; LUTZ, T.A.; BAGGER, J.I. THERAPY OF ENDOCRINE DISEASE: Amylin and calcitonin - physiology and pharmacology. **Eur J Endocrinol**, v. 86, n° 6, p. R93-R111, 2022.

MD, S.; GAN, S.Y.; HAW, Y.H.; HO, C.L.; WONG, S.; CHOUDHURY, H. *In vitro* neuroprotective effects of naringenin nanoemulsion against β -amyloid toxicity through the regulation of amyloidogenesis and tau phosphorylation. **Int J Biol Macromol.**, v. 118(Pt A), p. 1211-1219, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.190>

MO, S.; DONG, L.; HURST, W.J.; VAN BREEMEN, R.B. Quantitative analysis of phytosterols in edible oils using APCI liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Lipids**, v. 48, n. 9, p. 949-56, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3813-3>

MONTANARI, R.M.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; SILVA, C.J.; CARVALHO, L.S.; ANDRADE, N.J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: alternative sourcer of (*E*)- caryophyllene and germacrene-D. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1550-1555, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000900013>

NA, L.X.; LI, Y.; PAN, H.Z.; ZHOU, X.L.; SUN, D.J.; MENG, M.; LI, X.X.; SUN, C.H. Curcuminoids exert glucose-lowering effect in type 2 diabetes by decreasing serum free fatty acids: a double-blind, placebo-controlled trial. **Mol Nutr Food Res.**, v. 57, n. 9, p. 1569-77, 2013. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200131>

NA, L.X.; ZHANG, Y.L.; LI, Y.; LIU, L.Y.; LI, R.; KONG, T.; SUN, C.H. Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, v. 21, n. 7, p. 526-33, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.11.009>

NAGASE, T.; IWAYA, K.; IWAKI, Y.; KOTAKE, F.; UCHIDA, R.; OH-I, T.; SEKINE, H.; MIWA, K.; MURAKAMI, S.; ODAKA, T.; KURE, M.; NEMOTO, Y.; NORITAKE, M.; KATSURA, Y. Insulin-derived amyloidosis and poor glycemic control: a case series. **Am J Med.**, v. 127, n. 5, p. 450-4, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2013.10.029>

NASCIMENTO, A.M., FONSECA, T.S., CAMPOS, M.F. et al. *Ziziphus joazeiro*, a Saponin-Rich Brazilian Medicinal Plant: Pharmacognostic Characterization of Bark and Leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 30, p. 756–764, 2020. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00109-2>

NASCIMENTO, C.V.M.F.; SINEZIA, C.; SISNANDE, T.; LIMA, L.M.T.R.; LACATIVA, P.G.S. BZ043, a novel long-acting amylin analog, reduces gastric emptying, food intake,

glycemia and insulin requirement in streptozotocin-induced diabetic rats. **Peptides**, v. 114, p. 44-49, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.04.004>

NASSAR, S.Z.; BADAIE, N.M.; ISSA, Y.A. Effect of amylin on memory and central insulin resistance in a rat model of Alzheimer's disease. **Arch Physiol Biochem.**, v. 126, n. 4, p. 326-334, 2020. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1534244>

NIER, T.; COOPER, G. J. S. Mechanisms Underlying the Antidiabetic Activities of Polyphenolic Compounds: A Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12:708329, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.798329>

NILSSON, M.R. Insulin amyloid at injection sites of patients with diabetes. **Amyloid**, v. 23, n. 3, p. 139-147, 2016. <https://doi.org/10.1080/13506129.2016.1179183>

NOWOTNY, K.; JUNG, T.; HÖHN, A.; WEBER, D.; GRUNE, T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 194-222, 2015. <https://doi.org/10.3390/biom5010194>

OGURTSOVA. K.; GUARIGUATA, L.; BARENGO, N.C.; RUIZ, P.L.; SACRE, J.W.; KARURANGA, S.; SUN, H.; BOYKO, E.J.; MAGLIANO, D.J. IDF diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 183:109118, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109118>

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; FERNANDES, P.D.; LEITÃO, S.G. Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides*. **Revista Brasileira Farmacognosia**; v.24, p. 206-214, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.03.001>

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; SANTOS, S.S., BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S.; LEITÃO, S.G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 103-108, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.018>

OLIVEIRA, F.C.; BARBOSA, F.G.; MAFEZOLI, J.; OLIVEIRA, M. C. F.; NETO, M. A.; GUEDES, M. L. S. Chemical constituents of *Lippia rigida* Schauer (Verbenaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.51, p. 328-330, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2013.09.009>

OMAR, S.H.; SCOTT, C.J.; HAMLIN, A.S.; OBIED, H.K. Olive Biophenols Reduces Alzheimer's Pathology in SH-SY5Y Cells and APP^{sw} Mice. **Int J Mol Sci.**, v. 20, n. 1, p. 125, 2018. <https://doi.org/10.3390%2Fijms20010125>

OUYANG, Q.; STANDIFER, N. E.; QIN, H.; GOTTLIEB, P.; VERCHERE, C. B.; NEPOM, G. T.; TAN, R.; PANAGIOTOPOULOS, C. Recognition of HLA class I-restricted beta-cell epitopes in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 56, n. 11, p. 3068–3074, 2006. <https://doi.org/10.2337/db06-0065>

PANG, Z.; CHONG, J.; ZHOU, G.; MORAIS D.; CHANG, L.; BARRETTE, M.; GAUTHIER, C.; JACQUES, P.E.; LI, S.; XIA, J. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucl. Acids Res**, v. 9(W1), p. W388-W396, 2021. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J Ethnopharmacol.**, v. 76, n. 3, p. 201-14, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00234-3)

PATEL, P.; PARMAR, K.; VYAS, V.K.; PATEL, D.; DAS, M. Combined *in silico* approaches for the identification of novel inhibitors of human islet amyloid polypeptide (hIAPP) fibrillation. **J Mol Graph Model.**, v. 77, p. 295-310, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.09.004>

PATEL, V.S.; CHHALOTIYA, U.K.; PATEL, S.B.; NURUDDIN, J. Simultaneous Quantification of Betulinic Acid, Lupeol, and β -Sitosterol in *Madhuca longifolia* Methanolic Extract of Bark by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Method. **J AOAC Int.**, v.104, n. 2, p. 498-505, 2021. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa128>

PARK, Y. J.; WARNOCK, G. L.; AO, Z.; SAFIKHAN, N.; MELOCHE, M.; ASADI, A.; KIEFFER, T. J.; MARZBAN, L. Dual role of interleukin-1 β in islet amyloid formation and its β -cell toxicity: Implications for type 2 diabetes and islet transplantation. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 682–694, 2017. <https://doi.org/10.1111/dom.12873>

PEILA, R.; RODRIGUEZ, B.L.; LAUNER, L.J. Honolulu-Asia Aging, S. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. **Diabetes**, v. 51, p. 1256–1262, 2002. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.4.1256>

PITHADIA, A.; BRENDER, J.R.; FIERKE, C.A.; RAMAMOORTHY, A. Inhibition of IAPP Aggregation and Toxicity by Natural Products and Derivatives. *Journal of Diabetes Research*, v. 2016, p. 1 – 12, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2046327>

PILON, A. C.; SELEGATO, D. M.; FERNANDES, R. P.; BUENO, P. C. P.; PINHO, D. R.; CARNEVALE NETO, F.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. Metabolômica de Plantas: Métodos e Desafios. **Quím. Nova**, v. 43, n.3, p. 329–354, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170499>

RAIMUNDO, A.F.; FERREIRA, S.; MARTINS, I.C.; MENEZES, R. Islet Amyloid Polypeptide: A Partner in Crime With A β in the Pathology of Alzheimer's Disease. **Front Mol Neurosci.**; v. 13, p. 35, 2020. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00035>

RALEIGH, D.; ZHANG, X.; HASTOY, B.; CLARK, A. The beta-cell assassin: IAPP cytotoxicity. **J Mol Endocrinol**, v. 59, p. 121–140, 2017. <https://doi.org/10.1530/jme-17-0105>

RIGACCI, S.; GUIDOTTI, V.; BUCCIANINI, M.; PARRI, M.; NEDIANI, C.; CERBAI, E.; STEFANI, M.; BERTI, A. Oleuropein aglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin. **J Nutr Biochem.**, v. 21, n. 8, p. 726-35, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.04.010>

RIVERA, J. F.; GURLO, T.; DAVAL, M.; HUANG, C. J.; MATVEYENKO, A. V.; BUTLER, P. C.; COSTES, S. Human-IAPP disrupts the autophagy/lysosomal pathway in pancreatic β -cells: Protective role of p62-positive cytoplasmic inclusions. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 3, p. 415–426, 2011. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.111>

ROCHET, J.C.; LANSBURY, P.T.J. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. **Curr Opin Struct Biol**, v. 10, p. 60–68, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(99\)00049-4](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(99)00049-4)

RUSHING, P.A.; HAGAN, M.M.; SEELEY, R.J.; LUTZ, T.A.; WOODS, S.C. Amylin: a novel action in the brain to reduce body weight. **Endocrinology**, v. 141, n. 2, p. 850–853, 2000. <https://doi.org/10.1210/endo.141.2.7378>

RYAN, G.J.; JOBE, L.J.; MARTIN, R. Pramlintide in the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Clin Ther.**, v. 27, n. 10, p. 1500-12, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.10.009>

SALIMENA, F.R.G.; MULGURA, M. Notas sobre o gênero *Lippia* (Verbenaceae) no Brasil. **Boletim Botânica Universidade de São Paulo**, v. 33, p. 45-49, 2015. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9052.v33i0p45-49>

SALIMENA, F.R.G., MÚLGURA, M.E. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. **Rodriguésia**, v.66, n. 1, p. 191-197, 2015. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566110>

SALIMENA, F.R.G.; CARDOSO, P.H. *Lippia* in Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB15170> . Acesso em: 03 Mar. 2023a.

SALIMENA, F.R.G.; CARDOSO, P.H. *Lippia* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB21430>. Acesso em: 03 Mar. 2023b

SALIMENA, F.R.G.; CARDOSO, P.H. *Lippia* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB15174>. Acesso em: 03 Mar. 2023c.

SALIMENA, F.R.G.; CARDOSO, P.H. *Lippia* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB33207> . Acesso em: 03 Mar. 2023d.

SALIMENA, F.R.G.; CARDOSO, P.H. *Lippia* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB26157> . Acesso em: 03 Mar. 2023e

SALIMENA, F.R.G.; CARDOSO, P.H. *Lippia* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB26162> . Acesso em: 04 Mar. 2023f

SALIMENA, F.R.G.; CARDOSO, P.H. *Lippia* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB21449> . Acesso em: 04 Mar. 2023g

SANCHEZ-GOMEZ, A.; ALCARRAZ-VIZÁN, G.; FERNANDÉZ, M.; FERNÁNDEZ-SANTIAGO, R.; EZQUERRA, M.; et al. Peripheral insulin and amylin levels in Parkinson's

disease. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 79, p. 91–96, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2020.08.018>

SANCHEZ-GOMEZ, A.; DIAZ, Y.; DUARTE-SALLES, T.; COMPTA, Y.; MARTI, M.J. Prediabetes, type 2 diabetes mellitus and risk of Parkinson's disease: A population-based cohort study. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 89, p. 22–27, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2021.06.002>

SCIACCA, M.F.M.; CHILLEMI, R.; SCIUTO, S.; GRECO, V.; MESSINEO, C.; KOTLER, S.A.; LEE, D.K.; BRENDER, J.R.; RAMAMOORTHY, A.; LA ROSA, C.; et al. A blend of two resveratrol derivatives abolishes hIAPP amyloid growth and membrane damage.

Biochim. Biophys. Acta Biomembr., v. 1860, p. 1793–1802, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.03.012>

SEO, K.I.; CHOI, M.S.; JUNG, U.J.; KIM, H.J.; YEO, J.; JEON, S.M.; LEE, M.K. Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic db/db mice. **Mol Nutr Food Res.**, v. 52, n. 9, p. 995-1004, 2008.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.200700184>

SHIAO, Y.J.; SU, M.H.; LIN, H.C.; WU, C.R. Acteoside and Isoacteoside Protect Amyloid β Peptide Induced Cytotoxicity, Cognitive Deficit and Neurochemical Disturbances *in vitro* and *in vivo*. **Int J Mol Sci.**, v. 18, n. 4, p. 895, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18040895>

SHIGIHARA, N.; FUKUNAKA, A.; HARA, A.; KOMIYA, K.; HONDA, A.; UCHIDA, T.; ABE, H.; TOYOFUKU, Y.; TAMAKI, M.; OGIHARA, T.; MIYATSUKA, T.; HIDDINGA, H. J.; SAKAGASHIRA, S.; KOIKE, M.; UCHIYAMA, Y.; YOSHIMORI, T.;

EBERHARDT, N. L.; FUJITANI, Y.; WATADA, H. Human IAPP-induced pancreatic β cell toxicity and its regulation by autophagy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 8, p. 3634–3644, 2014. <https://doi.org/10.1172/JCI69866>

SILVA, D.C.; LIMA, L.M.T.R. Physico-chemical properties of co-formulated fast-acting insulin with pramlintide. **Int J Pharm.**, v. 547, n. 1-2, p. 621-629, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.039>

SILVA, S. G.; OLIVEIRA, M. S.; CRUZ, J. N.; COSTA, W. A.; SILVA, S. H. M.; MAIA, A. A. B.; SOUSA, R. L.; CARVALHO JUNIOR, R. N.; ANDRADE, E.H.A. Supercritical CO₂ extraction to obtain *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae) essential oil rich in thymol and evaluation of its antimicrobial activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 168: 105064, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105064>

SILVA, P.S.; VICCINI, L.F.; SINGULANI, J.L.; SIQUEIRA, E.P.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A. Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of *Lippia* and *Lantana* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n°6, p. 843-849, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105064>

SILVA, T. R. S. **Redelimitação do gênero *Lantana* L. (Verbenaceae) no Brasil**. 1999. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo.

SILVA, T.R.S.; SALIMENA, F.R.G. Novas Combinações e Novos Sinônimos em *Lippia* e *Lantana* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v. 40, n. ¼, p. 57-59, 2002.

<http://www.jstor.org/stable/23225165>

SINGULANI, J.L.; SILVA, P.S.; RAPOSO, N.R.B.; SIQUEIRA, E.P.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A.; VICCINI, L.F. Chemical composition and antioxidant activity of *Lippia* species.

Journal of Medicinal Plants Research, v. 6, n. 27, p. 4416-4422, 2012. DOI:

10.5897/JMPR12.533

SMOLINSKA, A.; BLANCHET, L.; BUYDENS, L.M.; WIJMENGA, S.S. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: from data acquisition to biomarker discovery: a review. **Anal Chim Acta.**, v. 750, p. 82-97, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.049>

SORIA, N.; RAMOS, P.; VIVEROS, G.; ESTIGARRIBIA, G.; RÍOS, P.; ORTÍZ, A.

Etnobotánica y uso de plantas medicinales en unidades familiares de salud de Caaguazú, Paraguay. **Caldasia**, v. 42, n. 2, p.263-277, 2020.

<https://doi.org/10.15446/caldasia.v42n2.76907>

SPARKS, S.; LIU, G.; ROBBINS, K. J.; LAZO, N. D. Curcumin modulates the self-assembly of the islet amyloid polypeptide by disassembling α -helix. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 422, n. 4, p. 551-555, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.013>

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; CALA, M.P.; DURÁN, D.C.; CABALLERO, D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 1, p. 192-202, 2013. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200877>

STROO, E.; KOOPMAN, M.; NOLLEN, E.A.; MATA-CABANA, A. Cellular Regulation of Amyloid Formation in Aging and Disease. **Front Neurosci.**, v. 11, p. 64, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00064>

SUN, J.; MURATA, T.; SHIGEMORI, H. Inhibitory activities of phenylpropanoids from *Lycopus lucidus* on amyloid aggregation related to Alzheimer's disease and type 2 diabetes. **J Nat Med.**, v. 74, n. 3, p. 579-583, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11418-020-01398-6>

TAN, S.Y.; MEI WONG, J.L.; SIM, Y.J.; WONG, S.S.; MOHAMED ELHASSAN, S.A.; TAN, S.H.; LING LIM, G.P.; RONG TAY, N.W.; ANNAN, N.C.; BHATTAMISRA, S.K.; CANDASAMY, M. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. **Diabetes Metab Syndr.**, v. 13, n. 1, p. 364-372, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.008>

TERBLANCHÉ, F.C.; KORNELIUS, G. J. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – A literature review. **Essential Oil Research**, v. 8, p. 471-485, 1996.

<https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9700673>

THOTA, R.N.; ROSATO, J.I.; DIAS, C.B.; BURROWS, T.L.; MARTINS, R.N.; GARG, M.L. Dietary Supplementation with Curcumin Reduce Circulating Levels of Glycogen Synthase Kinase-3 β and Islet Amyloid Polypeptide in Adults with High Risk of Type 2

Diabetes and Alzheimer's Disease. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1032, 2020.
<https://doi.org/10.3390/nu12041032>

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Disponível em:
<https://tropicos.org/name/33702803>. Acesso em: 4 Mar. 2023a.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Disponível em:
<https://tropicos.org/name/33700262>. Acesso em: 4 Mar. 2023b.

UMPIERREZ, G.; KORYTKOWSKI, M. Diabetic emergencies - ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 12, n. 4, p. 222-32, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.15>

WANG C, CAI X, WANG R, ZHAI S, ZHANG Y, HU W, ZHANG Y, WANG D. Neuroprotective effects of verbascoside against Alzheimer's disease via the relief of endoplasmic reticulum stress in A β -exposed U251 cells and APP/PS1 mice. **J Neuroinflammation.**, v.17, n.1, p. 309, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01976-1> .

WANG, M.; CARVER, J.J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828, 2016.

WANT, E.; MASSON. P. Processing and analysis of GC/LC-MS-based metabolomics data. **Methods Mol Biol.**, v.708, p. 277-98, 2011. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-985-7_17

WANG Y, MIAO Y, MIR AZ, CHENG L, WANG L, ZHAO L, CUI Q, ZHAO W, WANG H. Inhibition of beta-amyloid-induced neurotoxicity by pinocembrin through Nrf2/HO-1 pathway in SH-SY5Y cells. **J Neurol Sci.**, v. 368, p. 223-30, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.07.010>

WESTERMARK, P. Fine structure of islets of Langerhans in insular amyloidosis. **Virchows Archiv**, v. 359, p. 1–18, 1973.<http://dx.doi.org/doi:10.1007/BF00549079>

WESTERMARK P, ANDERSSON A, WESTERMARK GT. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. **Physiol Rev**, v. 91, p. 795–826, 2011.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2009>

WESTERMARK, G.T.; DAVALLI, A.M.; SECCHI, A.; FOLLI, F.; KIN, T.; TOSO, C.; SHAPIRO, A.M.J.; KORSGREN, O.; TUFVESON, G.; ANDERSSON, A.; *et al.* Further evidence for amyloid deposition in clinical pancreatic islet grafts. **Transplantation**, v. 93, p. 219–223, 2012. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31823e46ef>

WESTERMARK, P., LI, Z.-C., WESTERMARK, G. T., LECKSTRÖM, A., & STEINER, D. F. Effects of beta cell granule components on human islet amyloid polypeptide fibril formation. **FEBS Letters**, v. 379, n. 3, p. 203–206, 1996. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01512-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01512-4)

WESTWELL-ROPER, C., DENROCHE, H. C., EHSES, J. A., & VERCHERE, B. C. Differential activation of innate immune pathways by distinct islet amyloid polypeptide

(IAPP) aggregates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 17, p. 8908–8917, 20016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.712455>

XU, Z.X.; MA, G.L.; ZHANG, Q.; CHEN, C.H.; HE, Y.M.; XU, L.H.; ZHOU, G.R.; LI, Z.H.; YANG, H.J.; ZHOU, P. Inhibitory mechanism of epigallocatechin gallate on fibrillation and aggregation of amidated human islet amyloid polypeptide. **ChemPhysChem**, v.18, p. 1611–1619, 2017. <https://doi.org/10.1002/cphc.201700057>

XU, J.; ZHENG, T.; ZHAO, C.; HUANG, X.; DU, W. Resistance of nepetin and its analogs on the fibril formation of human islet amyloid polypeptide. **Int J Biol Macromol.**, v.166, p.435-447, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.202>

YANG, C.; MO, Y.S.; CHEN, H.F.; HUANG, Y.H.; LI, S.L.; WANG, H.; HUANG, S.Q.; CHANG, X.; DU, Q.; WANG, Q. The effects of Danggui-Shaoyao-San on neuronal degeneration and amyloidosis in mouse and its molecular mechanism for the treatment of Alzheimer's disease. **J Integr Neurosci.**, v. 20, n. 2, p. 255-264, 2021. <https://doi.org/10.31083/j.jin2002025>

YU, L.; WANG, S.; CHEN, X.; YANG, H.; LI, X.; XU, Y.; ZHU, X. Orientin alleviates cognitive deficits and oxidative stress in A β 1-42-induced mouse model of Alzheimer's disease. **Life Sci.**, v. 121, p. 104-109, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.11.021>

YU, X.L.; LI, Y.N.; ZHANG, H.; SU, Y.J.; ZHOU, W.W.; ZHANG, Z.P.; WANG, S.W.; XU, P.X.; WANG, Y.J.; LIU, R.T. Rutin inhibits amylin-induced neurocytotoxicity and oxidative stress. **Food Funct.**, v. 6, p. 3296–3306, 2015. <https://doi.org/10.1039/c5fo00500k>

ZIEGLER, A.G.; REWERS, M.; SIMELL, O.; et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. **JAMA**, v. 309, p. 2473–2479, 2013. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.6285>

ZRAIKA, S.; HULL, R. L.; UDAYASANKAR, J.; CLARK, A.; UTZSCHNEIDER, K. M.; TONG, J.; GERCHMAN, F.; KAHN, S. E. Identification of the amyloid-degrading enzyme neprilysin in mouse islets and potential role in islet amyloidogenesis. **Diabetes**, v. 56, n. 2, p. 304–310, 2007. <https://doi.org/10.2337/db06-0430>